

**Untersuchung der physiologischen Rolle des
Wilms-Tumorgens 1 (*WT1*) im Rahmen der
Generierung muriner *in vivo*-Modelle für die
Wilms-Tumorerkrankung**

Dissertation zur Erlangung des Grades
,Doktor der Naturwissenschaften‘

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Christoph D. Steinwender
geboren am 03.01.1981 in Wiesbaden

Mainz, 2012

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung:

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	VI
Tabellenverzeichnis.....	X
Abkürzungen.....	XI

1. Einleitung	1
1.1 Embryonale Tumorerkrankungen	1
1.2 Der Wilms-Tumor	2
1.2.1 Allgemeines zum Wilms-Tumor.....	2
1.2.2 Wilms-Tumor assoziierte Syndrome.....	3
1.2.3 Ursprung und Histologie des Wilms-Tumors.....	5
1.2.4 Die Genetik des Wilms-Tumors.....	8
1.3 Das Wilms-Tumorgen 1 (WT1)	9
1.3.1 Allgemeines zum <i>WT1</i>	9
1.3.2 Expression und Funktion von WT1 in embryonalen und adulten Geweben.....	11
1.3.3 Die Rolle von <i>WT1</i> im Wilms-Tumor und anderen tumorösen Erkrankungen.....	13
1.4 Das Gen <i>CTNNB1</i> und dessen Protein β-Catenin	15
1.4.1 Allgemeines zum <i>CTNNB1</i> -Gen und dessen Protein β -Catenin.....	15
1.4.2 Die Rolle von <i>CTNNB1</i> und dessen Protein β -Catenin im Wilms-Tumor und anderen Tumorerkrankungen.....	18
1.5 Ziel der Arbeit	20
2. Material und Methoden	22
2.1 Material und Reagenzien	22
2.1.1 Chemikalien.....	22
2.1.2 Puffer und Lösungen.....	23
2.1.3 Enzyme.....	26
2.1.4 Antikörper.....	27
2.1.5 Sera.....	27
2.1.6 Kits.....	28
2.1.7 Größenstandards.....	28
2.1.8 Verbrauchsmaterial.....	28
2.1.9 Histologie.....	28
2.1.10 Zellkulturmaterial.....	29
2.1.11 Tiere.....	29
2.1.12 Geräte.....	35
2.1.13 Oligonukleotidsequenzen.....	38

2.2	DNA-Standardmethoden	39
2.2.1	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	39
2.2.2	Aufreinigung von DNA-Fragmenten	40
2.2.3	Fällung von DNA	40
2.2.4	Agarose-Gelelektrophorese	41
2.3	RNA-Standardmethoden	41
2.3.1	Isolierung von RNA aus murinen Gewebe	41
2.3.2	Entfernung genomischer DNA aus RNA-Präparationen	42
2.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)-Techniken	43
2.4.1	Standard- <i>Polymerase Chain-Reaction</i> (PCR)	43
2.4.2	Reverse Transkriptions (RT)-PCR	44
2.4.3	Semiquantitative PCR	45
2.5	Arbeiten mit Proteinen	45
2.5.1	Isolierung von Proteinen aus murinen Gewebe	45
2.5.2	Quantifizierung von Proteinen	46
2.5.3	Fällung von Proteinen	46
2.5.4	SDS-Polyakrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	47
2.5.5	<i>Western blot</i> -Analyse	47
2.6	Zellbiologische Arbeiten	49
2.6.1	Verwendete Zellen	49
2.6.2	Arbeiten mit Zellen	50
2.6.3	Kultivieren und Passagieren von Zellen	50
2.6.4	Einfrieren und Auftauen von Zellen	50
2.6.5	Bestimmung der Zellzahl in der Neubauer-Kammer	51
2.6.6	Durchflusszytometrie von murinen embryonalen Zellen und murinen adulten Knochenmarkzellen	51
2.6.7	Stammzellassay von murinen embryonalen Zellen	53
2.7	Arbeiten mit Mäusen	54
2.7.1	Durchführung	54
2.7.2	Präparation von murinen Organen	54
2.7.3	Altersbestimmung und Präparation pränataler Mausembryonen	54
2.7.4	Isolierung genomischer DNA aus Mausschwanz-Biopsien, Amnia und murinen Organen	55
2.7.5	Fixierung von murinen Embryonen und Organen	56
2.7.6	Überführung muriner Embryonen und Organe in Paraffin	56
2.7.7	X-Gal-Färbung von murinen Embryonen und Organen	56
2.7.8	Behandlung von X-Gal gefärbten Embryonen mit Benzylbenzoat	57
2.7.9	Herstellung von Zellsuspensionen aus einzelnen murinen Embryonen zur Kultivierung und Durchflusszytometrie-Analyse	58
2.7.10	Herstellung einer Zellsuspension aus mehreren murinen Embryonen für Transplantationsversuche bzw. Stammzellassays	58
2.7.11	Herstellung von Zellsuspensionen aus murinem Knochenmark	59
2.7.12	Transplantation muriner embryonaler Zellen aus adulten Mäusen	60

2.8	Histologische Methoden	61
2.8.1	Herstellung von Paraffinschnitten	61
2.8.2	Herstellung von Kryoschnitten	61
2.8.3	Hämatoxyclin/Eosin (HE)-Färbung	62
2.8.4	Kernechtrot-Färbung	62
2.8.5	Immunhistochemische-Analysen auf Paraffinschnitten	63
2.8.6	Immunfluoreszenz-Analysen von Paraffinschnitten	65
2.8.7	Immunfluoreszenz-Analysen von Kyroschnitten	66
3.	Ergebnisse	68
3.1.	Charakterisierung der <i>KI-Wt1-tTA</i> Effektor-Mauslinie (WE2)	68
3.1.1	Embryonale Wt1-tTA Expression	72
3.1.1.1	Embryonale Wt1-tTA Expression im WE2 EZ-Modell	72
3.1.1.2	Embryonale Wt1-tTA Expression im WE2 TC RR-Modell	74
3.1.2	Adulte Wt1-tTA Expression	77
3.1.2.1	Adulte Wt1-tTA Expression im WE2 EZ-Modell	77
3.1.2.2	Adulte Wt1-tTA Expression im WE2 TC RR-Modell	79
3.2	Herstellung und Charakterisierung von konditional reversiblen Wilms-Tumor-Modellen	83
3.2.1	Herstellung und Analyse des WE2 DDS-Modells	83
3.2.1.1	Auswertung der Genotypen und Geschlechterverteilung von Nachkommen des WE2 DDS-Modells	85
3.2.1.2	Phänotyp der Mäuse des WE2 DDS-Modells	86
3.2.1.3	Histologische und molekulare Analysen der Nieren von WE2 DDS-positiven Tieren	86
3.2.1.3.1	Histologische Analyse von WE2 DDS-positiven Nieren	87
3.2.1.3.2	Molekulare Analyse von WE2 DDS-positiven Nieren	88
3.2.2	Herstellung und Analyse der Wilms-Tumor-Modelle WE2 TC bCat Δ Ex3 und WE2 LC bCat Δ Ex3	91
3.2.2.1	Auswertung der <i>timed matings</i> tripeltransgener Tiere	94
3.2.2.2	Auswertung der Präparation tripeltransgener Tiere	98
3.2.2.3	Phänotyp der Mäuse des WE2 TC bCat Δ Ex3- und WE2 LC bCat Δ Ex3-Modells	101
3.2.2.4	Histologische und molekulare Analyse von veränderten, tripeltransgenen Organen	103
3.2.2.4.1	Histologische Analyse von veränderten, tripeltransgenen Organen	104
3.2.2.4.2	Molekulare Analyse von veränderten, tripeltransgenen Organen	110
3.2.3	Herstellung und Analyse des Wilms-Tumor-Modells WE2 Wnt1	113
3.2.3.1	Auswertung der <i>timed matings</i> des WE2 Wnt1-Modells	115

3.2.3.2	Auswertung der Präparation doppeltransgener Tiere	117
3.2.3.3	Phänotyp der Mäuse des WE2 Wnt1-Modells	118
3.2.3.4	Histologische und molekulare Analyse von veränderten, WE2 Wnt1-positiven Organen	119
3.2.3.4.1	Histologische Analyse von veränderten, WE2 Wnt1-positiven Organen	119
3.2.3.4.2	Molekulare Analyse von veränderten, WE2 Wnt1-positiven Organen	126
3.3	Analyse Wt1-tTA exprimierender Zellen der Aorta-Gonaden-Mesonephros (AGM)-Region	128
3.3.1	Immunfluoreszenz-Analysen Wt1-exprimierender Zellen der AGM-Region in WE2 EZ-positiven und -negativen Embryonen	129
3.3.2	Charakterisierung der Wt1-tTA positiven Zellen mittels Durchflusszytometrie-Analysen	133
3.3.3	Transplantation Wt1-tTA positiver Zellen in radioaktiv bestrahlte Mäuse	136
3.3.4	Hämatopoetische Stammzellassays Wt1-tTA positiver Zellen	140
4.	Diskussion	143
4.1	Charakterisierung der WE2-Effektor-Mauslinie	144
4.1.1	Embryonale und adulte Wt1-tTA Expression im WE2 EZ-Modell	144
4.1.2	Embryonale und adulte Wt1-tTA Expression im WE2 TC RR-Modell	147
4.2	Herstellung und Charakterisierung von konditional reversiblen Wilms-Tumor-Modellen	150
4.2.1	Versuch der Simulation eines Denys-Drash-Syndroms (DDS) zur Generierung eines Wilms-Tumors: Das WE2 DDS-Modell	151
4.2.2	Versuch der Generierung eines Wilms-Tumors durch Wt1- analoge Aktivierung von β -Catenin: Die Modelle WE2 Wnt1, WE2 TC bCat Δ Ex3 und WE2 LC bCat Δ Ex3	153
4.2.2.1	Induktion der Wilms-Tumorgenese durch Aktivierung von β -Catenin während der Nierenentwicklung	153
4.2.2.2	Entstehung von polyzystischen Nieren durch eine Wt1 tTA-vermittelte Deregulation der kanonischen Wnt-Signalkaskade	156
4.2.2.3	Die Wt1 tTA-vermittelte Deregulation der kanonischen Wnt-Signalkaskade induziert die Tumorgenese eines Granulosazelltumors	161
4.2.2.4	WE2 Wnt1-positive Männchen entwickeln fehlgebildete Hoden	163

4.3	Analyse Wt1-exprimierender Zellen der AGM-Region	166
4.3.1	Die Rolle von Wt1 während der frühen Hämatopoese	167
4.4	Ausblick	172
5. Zusammenfassung		175
6. Literaturverzeichnis		177
7. Anhang		195
7.1	Lebenslauf	195
7.2	Publikationen	197
7.3	Danksagung	198
7.4	Erklärung	200

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungen:

Abb. 1.1:	Das klinische Bild des Wilms-Tumors.....	3
Abb. 1.2:	Veränderungen der Glomeruli in Patienten mit DDS.....	5
Abb. 1.3:	Der Ablauf der Nephrogenese.....	6
Abb. 1.4:	Die triphasische Histologie des Wilms-Tumors.....	7
Abb. 1.5:	Das Wilms-Tumorgen 1 und sein Protein.....	10
Abb. 1.6:	Die Rolle von <i>WT1</i> als Tumorsuppressor und Onkogen.....	15
Abb. 1.7:	Der kanonische Wnt-Signalweg.....	17
Abb. 1.8:	Die Rolle von <i>WT1</i> und <i>CTNNB1</i> in der Wilms-Tumorgenese.....	19
Abb. 2.1:	Schematische Darstellung des WE2-Transgens.....	30
Abb. 2.2:	Schematische Darstellung des TC-Transgens.....	30
Abb. 2.3:	Schematische Darstellung des LC- Transgens.....	31
Abb. 2.4:	Schematische Darstellung des EZ-Transgens.....	31
Abb. 2.5:	Schematische Darstellung des V1ko-Transgens.....	32
Abb. 2.6:	Schematische Darstellung des RR-Transgens.....	32
Abb. 2.7:	Schematische Darstellung des RG-Transgens.....	33
Abb. 2.8:	Schematische Darstellung des bCat Δ Ex3-Transgens.....	34
Abb. 2.9:	Schematische Darstellung des Wnt1-Transgens.....	34
Abb. 2.10:	Schematisch Darstellung des DDS2-Transgens.....	35
Abb. 3.1:	Schematische Darstellung des <i>Tet off</i> -Systems.....	69
Abb. 3.2:	Schematische Darstellung des <i>Cre/loxP</i> -Systems.....	69
Abb. 3.3:	Schematische Darstellung des WE2 EZ-Mausmodells.....	70

Abb. 3.4:	Schematische Darstellung des WE2 TC RR-Modells.....	71
Abb. 3.5:	Nachweis der Wt1-tTA Expression durch X-Gal-Färbung WE2 EZ-positiver Embryonen (Tag 11,5 <i>d.p.c.</i>).....	72
Abb. 3.6:	Expressionsdomäne von Wt1-tTA in WE2 EZ-positiven Embryonen (Tag 11,5 <i>d.p.c.</i>).....	73
Abb. 3.7:	Vergleich der endogenen Wt1-Expression mit EGFP in WE2 EZ-positiven und -negativen Embryonen (Tag 11,5 <i>d.p.c.</i>) nach Immunfluoreszenz-Färbung.....	74
Abb. 3.8:	Nachweis der Wt1-tTA Expression durch X-Gal-Färbung WE2 TC RR-positiver Embryonen (Tag 12,5 <i>d.p.c.</i>).....	75
Abb. 3.9:	Expressionsdomäne von Wt1-tTA in WE2 TC RR-positiven Embryonen (Tag 12,5 <i>d.p.c.</i>).....	76
Abb. 3.10:	Expressionsdomäne von Wt1-tTA in adulten Nieren (3 Monate) von WE2 EZ-positiven und -negativen Mäusen.....	77
Abb. 3.11:	Expressionsdomäne von Wt1-tTA in adulten Hoden (3 Monate) von WE2 EZ-positiven und -negativen Mäusen.....	78
Abb. 3.12:	Expressionsdomäne von Wt1-tTA in adulten Ovarien (3 Monate) von WE2 EZ-positiven und -negativen Mäusen.....	79
Abb. 3.13:	Expressionsdomäne von Wt1-tTA in adulten Nieren (3 Monate) von WE2 TC RR-positiven und -negativen Mäusen.....	80
Abb. 3.14:	Expressionsdomäne von Wt1-tTA in adulten Hoden (3 Monate) von WE2 TC RR-positiven und -negativen Mäusen.....	81
Abb. 3.15:	Expressionsdomäne von Wt1-tTA in adulten Ovarien (3 Monate) von WE2 TC RR-positiven und -negativen Mäusen.....	82
Abb. 3.16:	Schematische Darstellung des Wilms-Tumor-Modells WE2 DDS.....	83
Abb. 3.17:	Verpaarungsschema und Versuchsablauf zur Herstellung eines Wilms-Tumors durch das murine WE2 DDS-Modell.....	84
Abb. 3.18:	Unauffällige Histologie der Nieren von WE2 DDS2 (mit Doxycyclin)- und WE2 DDS4 (ohne Doxycyclin)-positiven Tieren.....	87
Abb. 3.19:	Nachweis der Expression der Transgene des WE2 DDS-Modells auf RNA-Ebene.....	89
Abb. 3.20:	Die Expression des DDS2-Transgens bewirkt keinen dominant-negativen Effekt auf Protein-Ebene.....	90
Abb. 3.21:	Schematische Darstellung des WE2 TC bCat Δ Ex3-Modells.....	92

Abb. 3.22:	Verpaarungsschema zur Herstellung des WE2 TC bCatΔEx3-Modells.....	93
Abb. 3.23:	Verpaarungsschema zur Herstellung des WE2 LC bCatΔEx3-Modells.....	94
Abb. 3.24:	Zunahme der Anzahl WE2 TC bCatΔEx3-positiver Tiere bei längerer Doxycyclingabe während der Schwangerschaft.....	95
Abb. 3.25:	Zunahme der Anzahl WE2 LC bCatΔEx3-positiver Tiere und Abnahme der Anzahl von Aborten bei längerer Doxycyclingabe während der Schwangerschaft.....	96
Abb. 3.26:	Unauffällige Histologie tripeltransgener Nieren der WE2 TC bCatΔEx3- <i>timed matings</i>	97
Abb. 3.27:	Darstellung des WE2 TC bCatΔEx3- und WE2 LC bCatΔEx3-Phänotyps.....	101
Abb. 3.28:	Bei WE2 LC bCatΔEx3- und WE2 TC bCatΔEx3-positiven Tieren entwickeln sich nach sechsmonatigem Doxycyclinentzug Veränderungen der Milz, der Nieren und der Ovarien.....	103
Abb. 3.29:	PCR-Nachweis der Deletion des Exons 3 von <i>Cttnb1</i> in phänotypisch auffälligen Organen von WE2 TC bCatΔEx3- und WE2 LC bCatΔEx3-positiven Tieren.....	104
Abb. 3.30:	Polyzystische Nieren WE2 TC bCatΔEx3- und WE2 LC bCatΔEx3-positiver Mäuse.....	105
Abb. 3.31:	Veränderte Ovarien von WE2 TC bCatΔEx3- und WE2 LC bCatΔEx3-positiven Tieren ähneln Granulosazelltumoren.....	106
Abb. 3.32:	Nachweis von β-Catenin in polyzystischen Nieren von WE2 TC bCatΔEx3-positiven und WE2 LC bCatΔEx3-positiven Mäusen.....	107
Abb. 3.33:	Nachweis von β-Catenin in veränderten Ovarien von WE2 TC bCatΔEx3-positiven und WE2 LC bCatΔEx3-positiven Mäusen.....	109
Abb. 3.34:	In polyzystischen Nieren von WE2 TC bCatΔEx3-positiven Mäusen kann eine Aktivierung von β-Catenin und dessen Zielgenen kaum nachgewiesen werden.....	111
Abb. 3.35:	In veränderten Ovarien von WE2 TC bCatΔEx3-positiven Mäusen ist die Aktivierung von β-Catenin und eine Überexpression von c-myc und Cyclin D1 nachweisbar.....	112
Abb. 3.36:	Schematische Darstellung des Wilms-Tumor-Modells WE2 Wnt1.....	114
Abb. 3.37:	Verpaarungsschema zur Herstellung des WE2 Wnt1-Modells.....	115
Abb. 3.38:	Bei WE2 Wnt1-positiven Tieren entwickeln sich nach sechsmonatigem Doxycyclinentzug Veränderungen der Nieren, der Ovarien und der Hoden.....	118

Abb. 3.39:	Polyzystische Nieren WE2 Wnt1-positiver Mäuse.....	120
Abb. 3.40:	Hoden WE2 Wnt1-positiver Mäuse weisen eine veränderte Struktur der Hodenkanälchen und ein vergrößertes Interstitium auf.....	121
Abb. 3.41:	Veränderte Ovarien des WE2 Wnt1-Modells ähneln der beginnenden Tumorgenese von Granulosazelltumoren.....	122
Abb. 3.42:	Nachweis von β -Catenin in polyzystischen Nieren von WE2 Wnt1-positiven Mäusen.....	123
Abb. 3.43:	Nachweis von β -Catenin in veränderten Hoden von WE2 Wnt1-positiven Mäusen.....	124
Abb. 3.44:	Nachweis von β -Catenin in veränderten Ovarien von WE2 Wnt1-positiven Mäusen.....	125
Abb. 3.45:	Stabilisierung von β -Catenin und Überexpression seiner Zielgenen in Organen von WE2 Wnt1-positiven Mäusen.....	127
Abb. 3.46:	Koexpression von EGFP, CD31, CD144 und CD309 im hämatopoetischen Endothel von WE2 EZ-positiven Embryonen (Tag 11,5 <i>d.p.c.</i>).....	130
Abb. 3.47:	Koexpression von EGFP, c-kit, RUNX1 und CD49d im hämatopoetischen Endothel von WE2 EZ-positiven Embryonen (Tag 11,5 <i>d.p.c.</i>).....	131
Abb. 3.48:	Wt1 ist direkt an der Entstehung von hämatopoetischen Stammzellen beteiligt.....	132
Abb. 3.49:	WE2 EZ-positive Embryonen besitzen eine größere Anzahl an EGFP-positiven Zellen als WE2 EZ-negative Embryonen (Tag 11,5 <i>d.p.c.</i>).....	134
Abb. 3.50:	EGFP-exprimierende Zellen von WE2 EZ-positiven Embryonen (Tag 11,5 <i>d.p.c.</i>) weisen eine Koexpression mit CD49d und CD309 auf.....	134
Abb. 3.51:	EGFP-exprimierende Zellen von WE2 EZ-positiven Embryonen (Tag 11,5 <i>d.p.c.</i>) weisen eine Koexpression mit CD41, CD45 und CD144 auf.....	135
Abb. 3.52:	Schematische Darstellung des WE2 TC RAGE-Modells.....	137
Abb. 3.53:	PCR-Nachweis von Wt1-tTA im Blut von injizierten Mäusen.....	138
Abb. 3.54:	PCR-Nachweis von Wt1-tTA in verschiedenen blutbildenden bzw. blutdifferenzierten Organen von injizierten Mäusen.....	139
Abb. 3.55:	Wt1-tTA positive Zellen von WE2 EZ-positiven Embryonen (Tag 11,5 <i>d.p.c.</i>) scheinen hämatopoetische Stammzell-Eigenschaften zu besitzen.....	141

Abb. 3.56:	PCR-Nachweis von Wt1-tTA in differenzierten, hämatopoetischen Zellen des Stammzellassays	142
Abb. 4.1:	Expressionsdomäne der WE2-Effektor-Mauslinie	150
Abb. 4.2:	Effekte der „Wilms-Tumor-Modelle“	166
Abb. 4.3:	Wt1-Funktionen während der frühen Hämatopoese	171

Tabellen:

Tabelle 1.1:	Häufigkeit embryonaler Tumorerkrankungen	1
Tabelle 1.2:	Syndrome mit assoziierter Wilms-Tumorerkrankung	4
Tabelle 3.1:	Zusammenfassung der Analysen der Zuchten WE2 x DDS2 (mit Doxycyclin) und WE2 x DDS4 (ohne Doxycyclin)	85
Tabelle 3.2:	Zusammenfassung der Genotyp-Analyse und Präparation WE2 TC bCat Δ Ex3-positiver Männchen und Weibchen nach sechs Monaten ohne Doxycyclingabe	99
Tabelle 3.3:	Zusammenfassung der Genotyp-Analyse und Präparation WE2 LC bCat Δ Ex3-positiver Männchen und Weibchen nach sechs Monaten ohne Doxycyclingabe	100
Tabelle 3.4:	Bei den <i>timed matings</i> des WE2 Wnt1-Modells werden keine doppeltransgenen Tiere geboren	116
Tabelle 3.5:	Zusammenfassung der Präparation WE2 Wnt1-positiver Männchen und Weibchen nach sechs Monaten ohne Doxycyclingabe	117

Abkürzungen

A	Adenin
Abb.	Abbildung
ad	zu
AG	Arbeitsgruppe
AGM	Aorta-Gonaden-Mesonephros
AML	Akute myeloische Leukämie
bp	Basenpaare
bCat Δ Ex3	<i>βCat-Flox-Ex3</i>
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CD31	<i>platelet-endothelial cell adhesion molecule 1</i>
CD41	<i>integrin alpha-2B</i>
CD45	<i>Leukocyte-common antigen</i>
CD49d	<i>integrin alpha-4</i>
CD144	<i>VE-Cadherin</i>
CD309	<i>tyrosine kinase growth factor receptor</i>
cDNA	<i>copy deoxyribonucleic acid</i>
cm	Zentimeter
c-myc	<i>c-myc binding protein</i>
c-kit	<i>kit oncogene</i>
CTNNB1	<i>catenin, cadherin-associated protein, beta 1</i>
Cyclin D1	<i>G1/S-specific Cyclin-D1</i>
DAPI	4'-6 Diamidin-2-phenylindol
DDS	Denys-Drash-Syndrom
DDS2	<i>mWt1/DDS-2</i>
DDS4	<i>mWt1/DDS-4</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DNaseI	Desoxyribonuklease I
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
<i>d.p.c</i>	<i>days post coitum</i>
E.coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat-Dinatriumsalz
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
EMT	epitheliale-mesenchymale Transition
<i>et. al.</i>	et aliae = und andere
EZ	<i>TetO-EGFP-LacZ</i>
Fa.	Firma
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FITC	<i>Fluorescein</i>
g	Gramm
G	Guanin
HE	Hämatoxylin-Eosin
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
IHC	Immunhistochemie
ILNR	<i>intralobar nephrogenic rests</i>

K	Lysin
Kap.	Kapitel
KER	Kernechtrot
kb	Kilobasen
kDa	Kilo-Dalton
<i>k.o.</i>	<i>knock out</i>
l	Liter
LC	<i>LC-1</i>
LEF	<i>Lymphoid Enhancer Factor</i>
<i>loxP</i>	<i>locus of crossing-over of P1</i>
M	Molar
mA	Milliamper
MET	mesenchymale-epitheliale Transition
mg	Mikrogramm
ml	Milliliter
mm	Millimeter
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
p21	<i>CDK-Inhibitor 1</i>
PBS	<i>phosphat buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PFA	Paraformaldehyd
RG	<i>RAGE</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
RR	<i>KI-Rosa 26</i>
Runx1	<i>runt-related transcription factor 1</i>
S	Serin
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
T	Thymin
TC	<i>TetO-Cre</i>
TCF	<i>T-Cell Factor</i>
Tet	Tetrazyklin
TetR	Tet-Responder
TetO	Tet-Operator
TGF-β	<i>Transforming Growth Factor-β</i>
TRITC	<i>Tetramethyl Rhodamine Isothiocyanate</i>
tTA	Tetrazyklin-abhängiger Transaktivator
U	Uracil
u.a.	unter anderen
V	Volt
Vlko	<i>KI-Vhlh-F1</i>
v/v	<i>volume per volume</i>
v/w	<i>volume per weight</i>
WE2	<i>KI-Wt1-tTA</i>
Wnt1	<i>TetO-Wnt1</i>
WT1	Wilms Tumorgen 1
WTX	<i>Wilms-tumor gene on chromosome X</i>
z.B.	zum Beispiel
ZVTE	Zentrale Versuchstier-Einrichtung

1. Einleitung

1.1 Embryonale Tumorerkrankungen

Embryonale Tumorerkrankungen manifestieren sich zwischen dem 0. und 15. Lebensjahr und haben mit 33 % einen großen Anteil an den gesamten Tumorerkrankungen dieser Altersgruppe (Eder und Gutjahr, 2010). Man spricht dabei von embryonalen Tumoren, da sie aus frühembryonalen Organanlagen entstehen, die sich in Form von undifferenzierten Mesenchymverdichtungen präsentieren (Blastem). Zu dieser Gruppe gehören u. a. die in Tabelle 1.1 aufgelisteten Neuroblastome, Nephroblastome (Wilms-Tumore), Retinoblastome, Hepatoblastome und Medulloblastome (Scotting *et. al.*, 2005). Sie unterscheiden sich grundlegend von soliden, adulten Tumorerkrankungen. Dies soll im Folgenden genauer erläutert werden.

Tabelle 1.1: Häufigkeit embryonaler Tumorerkrankungen

In dieser Tabelle sind die häufigsten embryonalen Tumorerkrankungen aufgelistet. Die Angaben sind in Prozent angegeben und beziehen sich immer auf die gesamten malignen Tumorerkrankungen, die zwischen dem Alter von 0. bis 15. Jahren auftreten (Angaben entnommen aus Pizzo *et. al.*, 1993 bzw. Eder und Gutjahr, 2010).

Embryonale Tumorerkrankung	Anteil an malignen, kindlichen Tumoren
Medulloblastome	~ 15 %
Neuroblastome	~ 8 %
Nephroblastome	~ 6 %
Retinoblastome	~ 2-3 %
Hepatoblastome	~ 1,5-2 %

Generell besitzen Tumorzellen mehrere Merkmale. Diese sind u. a. eine gesteigerte Proliferations- und Migrationsfähigkeit, eine Resistenz gegen Apoptose und Wachstumshemmer, sowie die Fähigkeit zur verstärkten Angiogenese und Selbsterneuerung (Hanahan und Weinberg, 2011). Eine noch undifferenzierte mesenchymale Zelle einer embryonalen Organanlage besitzt viele dieser Eigenschaften, wie z. B. eine gesteigerte Proliferations- und Migrationsaktivität, sowie die Fähigkeit der Selbsterneuerung und der Resistenz gegen Apoptose. Sie weist also schon viele Charakteristika einer Tumorzelle auf, so dass nur wenige zusätzliche genetische Ereignisse auftreten müssen, um eine tumoröse Veränderung entstehen zu lassen. Im Gegensatz dazu müssen differenzierte adulte Zellen eines Organs erst durch mehrere Mutationen diese

Fähigkeiten erlangen, damit sich aus ihnen ein solider, adulter Tumor bilden kann. Generell ist also der Ursprung einer Tumorerkrankung einer der wesentlichen Unterschiede zwischen embryonalen und adulten, soliden Tumoren (Scotting *et. al.*, 2005).

Ein weiterer bedeutender Unterschied zwischen den beiden Erkrankungen ist das umliegende Gewebe in dem die Tumore entstehen. So sind z.B. noch undifferenzierte mesenchymale Zellen einer embryonalen Organanlage von vielen undifferenzierten Vorläuferzellen ihrer Art umgeben, die sich gegenseitig beeinflussen und stimulieren. Zuvor entartete Zellen können daher im Laufe der Organogenese z. B. durch Wachstumsfaktoren, Chemokine oder Hormone, die durch das umliegende sich differenzierende Gewebe gebildet werden, positiv in ihrer Migration und Proliferation beeinflussen werden, so dass einfacher Tumore entstehen. Im Gegensatz dazu beeinflussen sich differenzierte adulte Zellen eines Organs kaum noch, wodurch eine Tumorgenese erst im fortgeschrittenen Krankheitsverlauf durch umliegendes Gewebe stimuliert wird (Scotting *et. al.*, 2005).

Generell bleibt also festzuhalten, dass in embryonalen Tumorerkrankungen eine normale Organogenese eng mit einer Tumorgenese dieser Organe verknüpft ist. Doch im Gegensatz zu vielen soliden, adulten Tumorerkrankungen weiß man über die genetischen Ursachen und die genauen Mechanismen der Entstehung dieser embryonalen Tumore noch sehr wenig. Dies trifft auch auf die Erkrankung des Wilms-Tumors (Nephroblastome) zu. Dieser embryonale Tumor soll im nächsten Abschnitt beschrieben werden.

1.2 Der Wilms-Tumor

1.2.1 Allgemeines zum Wilms-Tumor

Tumore der Niere sind die am häufigsten auftretenden Tumorerkrankungen bei Kindern. Zu dieser Gruppe gehört die embryonale Tumorerkrankung des Wilms-Tumors (Nephroblastom), wobei sie den größten Anteil der kindlichen, renalen Tumore darstellt (Varan *et. al.*, 2008).

1814 wurde diese Tumorerkrankung das erste Mal von Rance beschrieben (Rance, 1814) und erhielt ihren Namen 1899 durch den Chirurgen Max Wilms (Wilms, 1899). Es handelt sich dabei um einen hochmalignen, embryonalen Misch tumor, der sein Hauptmanifestationsalter zwischen dem zweiten und dritten Lebensjahr zeigt. Die Inzidenz liegt bei 1 : 8000 Kindern und es ist keine Geschlechtsprävalenz bekannt (Eder und Gutjahr, 2010). Als erste und häufigste Symptome treten schmerzlose Schwellung des Bauchraums (siehe Abb. 1.1), sowie Gewichtsverlust auf (Varan *et. al.*, 2008). Wesentlich seltener begleiten diese Symptome eine

Hämaturie (Green, 1985) und eine renale Hypertonie (Coppes, 1993). Nachfolgend stehen im Vordergrund der Diagnostik meist bildgebende Verfahren, wie CT (Computertomographie) und Ultraschall (Damgaard-Pedersen, 1980). Mit Hilfe dieser Verfahren entdeckt man bis zu 50 % aller Wilms-Tumore im Krankheitsstadium I und II (Eder und Gutjahr, 2010). Jeweils abhängig vom Stadium der Erkrankung wird therapiert, wobei eine Tumornephrektomie, sowie eine präoperative Chemotherapie im Falle des Krankheitsstadiums I und II durchgeführt werden. Ist die Tumorgenese des Wilms-Tumors schon weiter fortgeschritten (Stadium III und IV), kombiniert man die zuvor beschriebenen Therapieformen mit radioaktiver Bestrahlung (Davidoff *et. al.*, 2009). In diesem Zusammenhang versucht man gegen Metastasen vorzugehen, die oft in der Leber und den Lymphknoten anzutreffen sind. Aufgrund der Verbesserung der Therapien konnte in den letzten Jahren die Überlebensrate von anfangs 30 % auf 90 % erhöht werden (Varan *et. al.*, 2008).

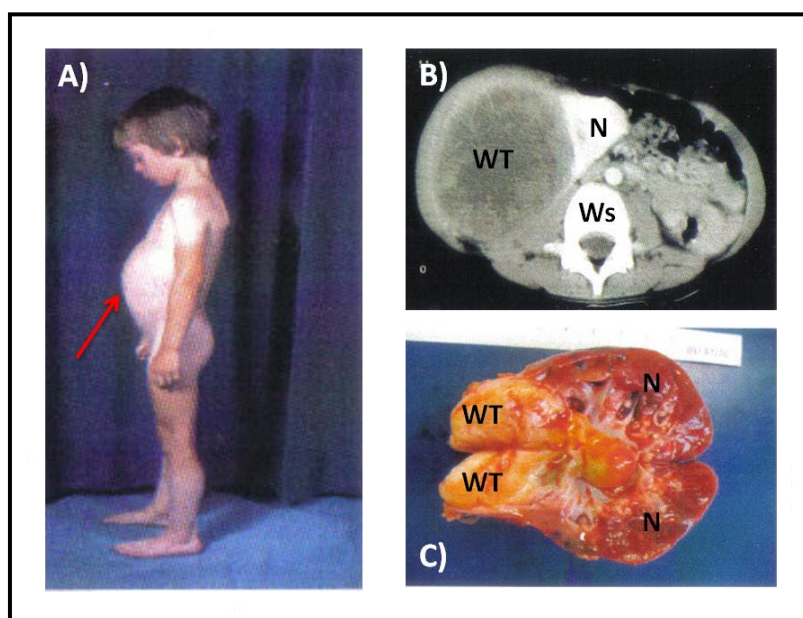


Abbildung 1.1: Das klinische Bild des Wilms-Tumors

A) Zu sehen ist ein junger Patient mit einer für die Wilms-Tumorerkrankung typischen Schwellung des Bauchraums (roter Pfeil). B) CT-Aufnahme eines großen, raumgreifenden Wilms-Tumors (WT), der die gesunde Niere (N) verdrängt. Als Orientierung ist die Wirbelsäule (Ws) erkennbar. C) Querschnitt durch einen Wilms-Tumor nach Nephrektomie. Das gesunde, rötliche Nierengewebe (N) unterscheidet sich deutlich vom gelblichen Wilms-Tumorgewebe (WT) (Abbildungen entnommen aus Eder und Gutjahr, 2010).

Oft treten Wilms-Tumore im Zusammenhang mit syndromalen Erkrankungen auf (siehe Einleitung 1.2.2). Zudem gibt es einige Genmutationen und Chromosomaberrationen, die mit der Entstehung des Tumors in Verbindung gebracht werden (siehe Einleitung 1.2.4). Die oben angesprochenen Punkte sollen zusammen mit dem zellulären Ursprung und der Histologie des Wilms-Tumors (siehe Einleitung 1.2.3) in den folgenden Kapiteln erläutert werden.

1.2.2 Wilms-Tumor assoziierte Syndrome

Wilms-Tumore treten im Zusammenhang mit vielen syndromalen Erkrankungen auf (Pendergrass *et. al.*, 1976). Dazu gehören u.a. die in Tabelle 1.2 aufgelisteten Syndrome WAGR

(*Wilms' tumor, aniridia, genitourinary abnormalities and mental retardation*), Denys-Drash, Frasier, Beckwith-Wiedemann, Simpson-Golabi-Behmel, Sotos und Perlman (Rivera und Haber, 2005). In dieser Dissertation wird nur näher auf das Denys-Drash-Syndrom (DDS) eingegangen.

Tabelle 1.2: Syndrome mit assoziierter Wilms-Tumorerkrankung

Viele Syndrome sind mit einem Auftreten eines Wilms-Tumors verbunden. In der Tabelle sind diese zusammen mit dem Risiko einer Wilms-Tumorerkrankung (in Prozent) und ihrer genetischen Aberration dargestellt (Daten entnommen aus Rivera und Haber, 2005 bzw. Varan *et. al.*, 2008).

Syndrom	Aberranter Locus (Gen)	Wilms-Tumor Risiko
Denys-Drash	11p13 (<i>WT1</i>)	90 %
WAGR	11p13 (<i>WT1</i>)	30 %
Perlman	nicht bekannt	30 %
Simpson-Golabi-Behmel	Xq26 (<i>GPC3</i>)	7,5 %
Beckwith-Wiedemann	11p15 (<i>IGF2/H19/LIT</i>)	5 %
Sotos	5q35 (<i>NSD1</i>)	< 5 %
Frasier	11p13 (<i>WT1</i>)	< 1 %

Das DDS wurde zuerst von Denys und Drash im Jahre 1967 bzw. 1970 beschrieben (Denys *et. al.*, 1967; Drash *et. al.*, 1970). Heterozygote Keimbahnmutationen von *WT1* (*Wilms-Tumorgen 1*) konnten als Ursache der Entstehung identifiziert werden (Pelletier *et. al.*, 1991). Bei diesen *WT1*-Mutationen handelt es sich um Punktmutationen, die meist in Exon 8 bzw. 9 dieses Gens anzutreffen sind (Mueller, 1994). Die häufigste dieser Mutationen ist eine Transition von Cytosin zu Thymin an Position 1180, die einen Aminosäureaustausch von Arginin zu Tryptophan zur Folge hat (R394W). Alle diese *WT1*-Punktmutationen verändern die strukturelle Organisation der Zinkfinger 2 und 3 von *WT1*, wodurch die Fähigkeit des Transkriptionsfaktors an DNA zu binden vermindert oder unterbunden wird (Little *et. al.*, 1997). Des Weiteren scheinen sie einen dominant-negativen Effekt auf funktionsfähiges *WT1* auszuüben (Hastie, 1992; Little *et. al.*, 1993; Bardeesy *et. al.*, 1994 a; Moffet *et. al.*, 1995). Als Folge der eingeschränkten *WT1*-Aktivität (siehe Einleitung 1.3.2) kommt es zu schwerwiegenden Urogenitaldefekten, Glomerulopathien (mesangiale Sklerose bzw. fokal segmentale Glomerulosklerose; siehe Abb. 1.2), XY-Hermaphroditismus und in ~ 90 % der betroffenen Patienten zur Wilms-Tumorerkrankung (Pelletier *et. al.*, 1991 a).

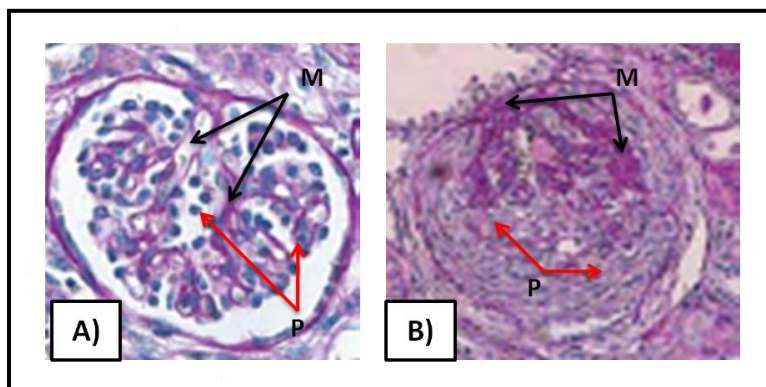


Abbildung 1.2: Veränderungen der Glomeruli in Patienten mit DDS

Die Abbildung zeigt eine Lichtmikroskop-Aufnahme eines HE-gefärbten, gesunden Glomerulus (A) und eines veränderten Glomerulus eines Patienten mit DDS (B). A) Im nicht veränderten Glomerulus erkennt man das von der Bowman-Kapsel umgebene kapillare Gefäßknäuel mit Podozyten (P; rote Pfeile) und Mesangiumzellen (M; schwarze Pfeile). B) Bei Patienten mit DDS kommt es zur gesteigerten Proliferation von Podozyten

(P; rote Pfeile) und Mesangiumzellen (M; schwarze Pfeile). Nachfolgend bewirkt dies eine verstärkte Apoptose und Vernarbung des Gewebes des Glomerulus, wodurch sich Glomerulopathien mit späteren Nierenversagen entwickeln (Abbildungen entnommen aus Yang *et. al.*, 2004)

1.2.3 Ursprung und Histologie des Wilms-Tumors

Um die Tumorgenese des Wilms-Tumors besser verstehen zu können, muss man zunächst die normale Entwicklung der Niere (Nephrogenese) betrachten, bevor man mit Hilfe der Histologie den Ursprung dieser Erkrankung erläutern kann.

In Wirbeltieren entwickelt sich die Niere im intermediären Mesoderm aus drei Nierensystemen, die als Vorniere (Pronephros), Urnieren (Mesonephros) und Nachnieren (Metanephros) bezeichnet werden. Beim Menschen bilden sich die Vor- und die Urnieren während der frühen Embryogenese zurück und die eigentliche Niere entwickelt sich aus der Anlage der Nachnieren (Drews, 1993). Dazu sind komplexe Prozesse und Interaktionen zwischen den Derivaten des intermediären Mesoderms (Wolff-Gang und metanephrischen Mesenchym) notwendig (Schedl und Hastie, 2000; Vainio und Lin, 2002; Schedl, 2007).

Zu Beginn der Nephrogenese kommt es zum Auswuchs der Ureterknospe aus dem Wolff-Gang in das umliegende metanephrischen Mesenchym (siehe Abb. 1.3). Nachfolgend verzweigt sich die Ureterknospe und das metanephrischen Mesenchym kondensiert um deren geteilte Enden. Gesteuert wird dies durch die Expression verschiedener Gene in der Ureterknospe. Diese Gene sind es auch, die im kondensierten Mesenchym eine mesenchymale-epitheliale Transition (MET) induzieren, wodurch nachfolgend die Entstehung der funktionellen Einheiten der Niere (Nephronen) eingeleitet wird. Dabei sind die ersten epithelialen Strukturen sogenannte renale Vesikel, aus denen sich nachfolgend Komma- und S-förmige Vesikel bilden. Mit zunehmender Differenzierung entwickeln sich aus diesen Strukturen alle Elemente der Nephronen, wie z. B. die Glomeruli, die proximalen und distalen Tubuli und die Elemente der Henle-Schleife. Gleichzeitig kommt es zur weiteren Verzweigung der Ureterknospe und zur Bildung von Sammelrohren. Diese verbinden sich nachfolgend mit den zuvor aus den Komma- und S-förmigen Vesikeln entwickelten distalen Tubuli. Somit werden durch die Interaktion von

Ureterknospe und metanephrischen Mesenchym die funktionellen Einheiten der Niere gebildet, die von stromalen Zellen umgeben sind (Schedl und Hastie, 2000; Rivera und Haber, 2005; Schedl, 2005).

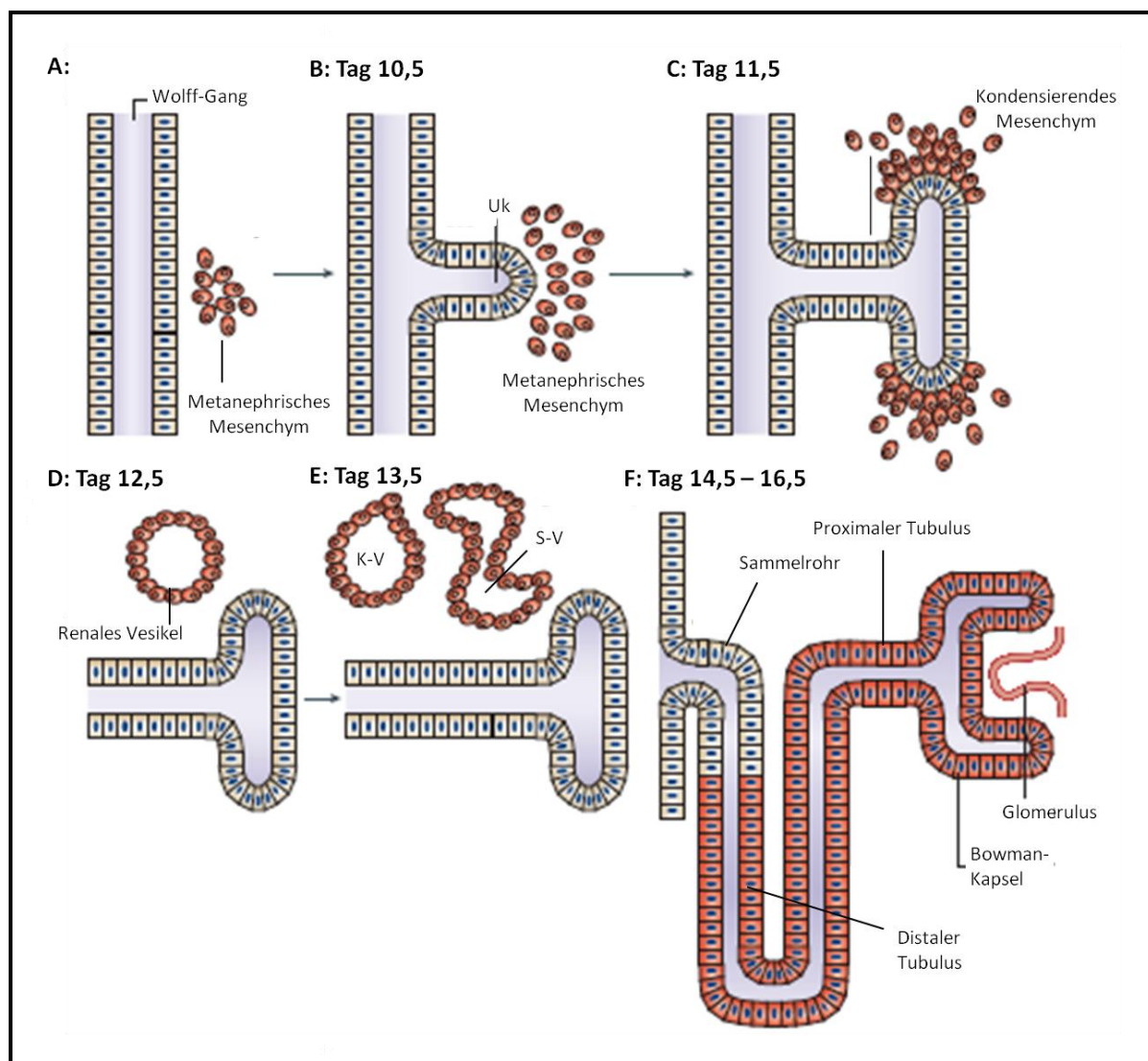


Abbildung 1.3: Der Ablauf der Nephrogenese

A) Die spätere Niere entsteht aus dem Wolff-Gang und dem noch uninduzierten metanephrischen Mesenchym. **B)** An Tag 10,5 der murinen Embryogenese führen reziproke Induktionsprozesse zwischen dem metanephrischen Mesenchym und dem Wolff-Gang zum Auswachsen der Ureterknospe (UK). **C)** Nachfolgend kommt es an Tag 11,5 zu weiteren induktiven Wechselwirkungen zwischen der Ureterknospe und dem induzierten metanephrischen Mesenchym. Dies hat zum einen die Verzweigung der Knospe zur Folge und zum anderen eine Entstehung des kondensierten Mesenchyms um die Spitzen der verzweigten Ureterknospe. **D)** Die Zellen des kondensierten Mesenchyms vollziehen im weiteren Verlauf eine mesenchymale-epitheliale Transition (Tag 12,5), so dass die ersten epithelialen Strukturen entstehen (Renale Vesikel). **E)** Mit der fortschreitenden Differenzierung (Tag 13,5) bilden sich aus den renalen Vesikeln sogenannte Komma- und S-förmige Vesikel (K-V bzw. S-V), aus denen die Nierentubuli hervorgehen. **F)** Zwischen Tag 14,5 und 16,5 der murinen Schwangerschaft kommt es zur Reifung der funktionellen Einheiten der Niere (Nephronen). Dabei verbinden sich die entstandenen Tubuli (rot) mit denen aus der Ureterknospe gebildeten Sammelrohren (grau). Zudem kommt es zum Einwachsen eines Gefäßknäuels (Glomerulus) in eine neu gebildete Bowman-Kapsel. In dieser Kapsel differenzieren sich einige epitheliale Zellen zu sogenannten Podozyten. (Abbildung verändert nach Rivera und Haber, 2005).

Die meisten Wilms-Tumore weisen nun eine triphasische Histologie auf (siehe Abb. 1.4). Sie setzen sich dabei aus epithelialen, stromal/mesenchymalen und blastemalen Anteilen zusammen, wobei in einigen Tumoren eine Gewebeart den größten Anteil des Tumors bilden kann (Harms und Zeidler, 1981). Diese unterschiedliche Differenzierung der Tumorzellen spricht für eine aberrante Entwicklung des metanephrischen Mesenchyms, die schon sehr früh in der Nephrogenese stattzufinden scheint. Dies könnte durch eine Störung der wechselseitigen Induktion zwischen dem Epithelgewebe der Ureterknospe und dem Mesenchym während der Nephrogenese entstehen. Daher wären Mutationen von Genen (siehe Einleitung 1.2.4), die bedeutend für die Regulation der frühen Nephrogenese sind, eine Erklärung für die Entstehung eines triphasischen Wilms-Tumors (Rivera und Haber, 2005; Schedl, 2007).

Generell scheinen sich dabei die triphasischen Tumore aus sogenannten nephrogenen Resten (multipotente Nierenvorläuferzellen) zu entwickeln, die über die 36. Schwangerschaftswoche hinaus als Nester zwischen normal differenziertem Nierengewebe zu finden sind. Ungefähr 40 % aller Wilms-Tumorpatienten weisen diese Vorläufer der Tumorentstehung auf (Beckwith *et. al.*, 1990; Park *et. al.*, 1993, Fleming, 1997; Charles *et. al.*, 1998).

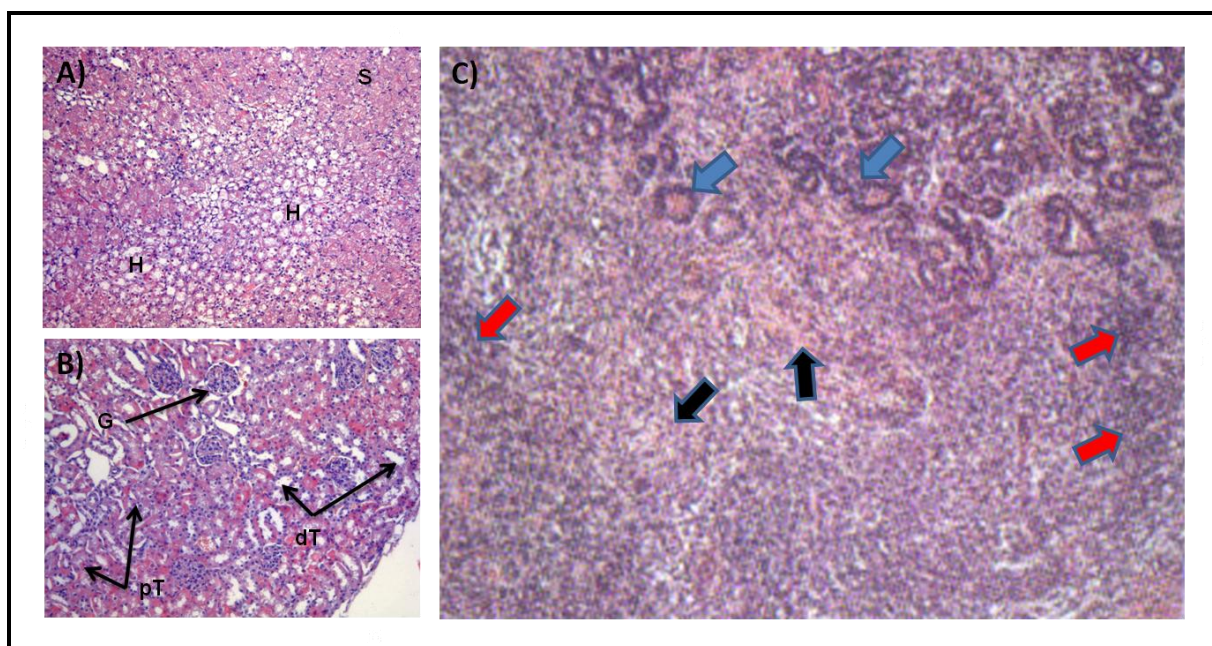


Abbildung 1.4: Die triphasische Histologie des Wilms-Tumors

Die Histologie einer normal entwickelten Niere (A/B) wird in dieser Abbildung der Histologie eines humanen, triphasischen Wilms-Tumors gegenübergestellt (C). In A) und B) sind das Nierenmark (A) und die Nierenrinde (B) zu sehen (HE-Färbung/10-fache Lichtmikroskop-Aufnahme). Man erkennt alle Zelltypen einer normal differenzierten Niere, wie z.B. die Glomeruli (G), die proximalen (pT) und distalen Tubuli (dT), die Sammelrohre (S) und die Tubuli der Henle-Schleife (H). C) Ein triphasischer Wilms-Tumor enthält blastemale (rote Pfeile), stromale (schwarze Pfeile) und epitheliale Anteile (blaue Pfeile). Die Elemente einer normal entwickelten Niere sind nicht erkennbar (Abbildung entnommen aus Eder und Gutjahr, 2010).

1.2.4 Die Genetik des Wilms-Tumors

Die genetischen Ursachen einer Wilms-Tumorerkrankung sind bis heute weitgehend unbekannt. Die Forschungsarbeiten der letzten Jahrzehnte haben aber viele Mechanismen und Gene aufgedeckt, die an der Tumorgenese des Wilms-Tumors beteiligt zu sein scheinen.

So postulierten Knudson und Strong im Jahre 1972 ein „*Two-Hit-Model*“ für die Entstehung des Wilms-Tumors (Knudson und Strong, 1972). Sie nahmen an, dass eine schon vorhandene Keimbahnmutation (erster *hit*) in einem Allel eines Gens zur heterozygoten Inaktivierung eines noch unbekanntes Tumorsuppressorgens führt. Die Wahrscheinlichkeit einer zweiten, somatischen Mutation (zweiter *hit*) im anderen Allel dieses Gens würde somit durch die schon in allen Körperzellen vorhandene erste Mutation erhöht werden und könnte nachfolgend zur Entstehung eines Wilms-Tumors beitragen. Diese Theorie basierte auf epidemiologischen Studien von Familien mit heritären Wilms-Tumorerkrankungen, wobei diese Fälle sehr selten sind und nur 1 % der Patienten mit Wilms-Tumoren ausmachen (Knudson und Strong, 1972). Das „*Two-Hit-Model*“ scheint somit auf diese Fälle der Wilms-Tumorerkrankung zuzutreffen und könnte eine Tumörprädisposition erklären. Doch um die verschiedenen Schritte der anschließenden Tumörprogression zu erläutern und die Entstehung von sporadisch auftretenden Wilms-Tumoren zu klären (99 % aller Wilms-Tumorerkrankungen), benötigt man ein Mehrschrittmodell (Brüning *et. al.*, 1995; Beckwith, 1997; Hanahan und Weinberg 2000 bzw. 2011).

In den letzten Jahren konnten durch Mikrodissektionsexperimente an Wilms-Tumoren einige Gene und Chromosomenaberrationen entdeckt werden, die wohl zur Tumorgenese des Wilms-Tumors beitragen. So konnte man bei etwa 20 % aller Wilms-Tumore eine Mutation von *WT1* feststellen (Huff, 1998; Ruteshouser *et. al.*, 2008). Zudem wurde bei ungefähr 15 % eine Mutation von *CTNNB1* (*Catenin, cadherin-associated protein, beta 1*) und eine damit verbundene erhöhte Aktivität der kanonischen Wnt-Signalkaskade beobachtet (Koesters *et. al.*, 1999, Maiti *et. al.*, 2000; Li *et. al.*, 2004; Corbin *et. al.*, 2009). Die Mutationen dieser beiden Gene treten dabei oft zusammen auf und sind daher in nur ~ 15 % aller Wilms-Tumore zu finden (Maiti *et. al.*, 2000). Zwei weitere Gene, die häufig in Wilms-Tumoren mutiert vorliegen, sind *WTX* (*Wilms-Tumor gene on chromosome X*) und *p53* (*tumor protein 53*). Während *WTX* in etwa 20 % aller Wilms-Tumore mutiert ist (Rivera *et. al.*, 2007; Ruteshouser *et. al.*, 2008; Perotti *et. al.*, 2008; Fukuzawa *et. al.*, 2010), sind es im Falle von *p53* nur 5 % (Bardeesy *et. al.*, 1994 b).

Bei denen in Wilms-Tumoren beobachtet Chromosomenaberrationen ist der Verlust des *Imprintings* (*loss of imprinting*) bzw. der Verlust von Allelen (*loss of heterozygosity*) und die uniparentale Disomie der Chromosomenregion 11p15 am häufigsten zu entdecken. In

verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass sie in bis zu 70 % der Wilms-Tumore zu beobachten sind (Ogawa *et. al.*, 1993; Steenman *et. al.*, 1994; Satoh *et. al.*, 2006; Haruta *et. al.*, 2008). Weitere eher selten zu beobachtende Chromosomenaberrationen sind u. a. der Verlust von Allelen auf Chromosom 1p (Grundy *et. al.*, 1994), 7p (Grundy *et. al.*, 1998) und 16q (Maw *et. al.*, 1992).

Alle zuvor beschriebenen Genmutationen und Chromosomenaberrationen scheinen an der Tumorgenese des Wilms-Tumors beteiligt zu sein. Doch bis heute bleiben der genaue Mechanismus und die Abfolge der genetischen Ereignisse weitgehend unklar, die zur Entstehung dieses Tumors führen. Das gemeinsame Auftreten von verschiedenen Mutationen und Aberrationen deutet darauf hin, dass sie in Wilms-Tumoren vielleicht zeitlich nacheinander auftreten und sie somit zunächst die Tumorprädisposition und dann im weiteren Verlauf die Tumorprogression positiv beeinflussen. Ein Beispiel dafür wären die beiden zuvor erwähnten Gene *WT1* und *CTNNB1*, deren gemeinsame Mutation in ~ 15 % aller Wilms-Tumore beobachtet werden kann. Diese beiden Gene sollen im Folgenden genauer beschrieben werden.

1.3 Das Wilms-Tumorgen 1 (*WT1*)

1.3.1 Allgemeines zum *WT1*

Im Jahre 1990 konnten Rose und Kollegen das erste Wilms-Tumorgen (*WT1*) der chromosomalen Region 11p13 zuordnen (Rose *et. al.*, 1990). Ein wenig später identifizierten verschiedene Arbeitsgruppen das in diesem Fall mutierte *WT1*-Gen durch positioniertes Klonieren in Proben von Wilms-Tumoren (Call *et. al.*, 1990; Gessler *et. al.*, 1990; Huang *et. al.*, 1990). Auch nachfolgende Expression- und Mutationsanalysen bestätigten eine mögliche Rolle von *WT1* in der Wilms-Tumorgenese und der normalen Nephrogenese (Haber *et. al.*, 1990; Bonetta *et. al.*, 1990; Pelletier *et. al.*, 1991 b).

Das *WT1*-Gen umfasst auf Chromosom 11p13 einen 50 kb großen Locus und besteht aus 10 Exons (siehe Abb. 1.5). Dabei ist das Gen hochkonserviert und im Genom aller Vertebraten zu finden (Hohenstein und Hastie, 2006). Es codiert ein ca. 3,0 kb großes Transkript, aus dem durch verschiedene Startkodons (Haupttranslationsstart AUG, 5'gelegenes CUG, 3' im Leserahmen gelegenes internes AUG, Translationsstart vom alternativen Exon 1 und Intron 5), RNA-Editing (Austausch von Leucin-280 zu Prolin) und alternatives Spleißen bis zu 36 mögliche Isoformen entstehen können (Übersicht: www.ensembl.org; Hohenstein und Hastie, 2006; Huff, 2011). Je nach Translationsstart und Spleißvariante wird durch die Translation ein 36-62 kDa großes Protein gebildet.

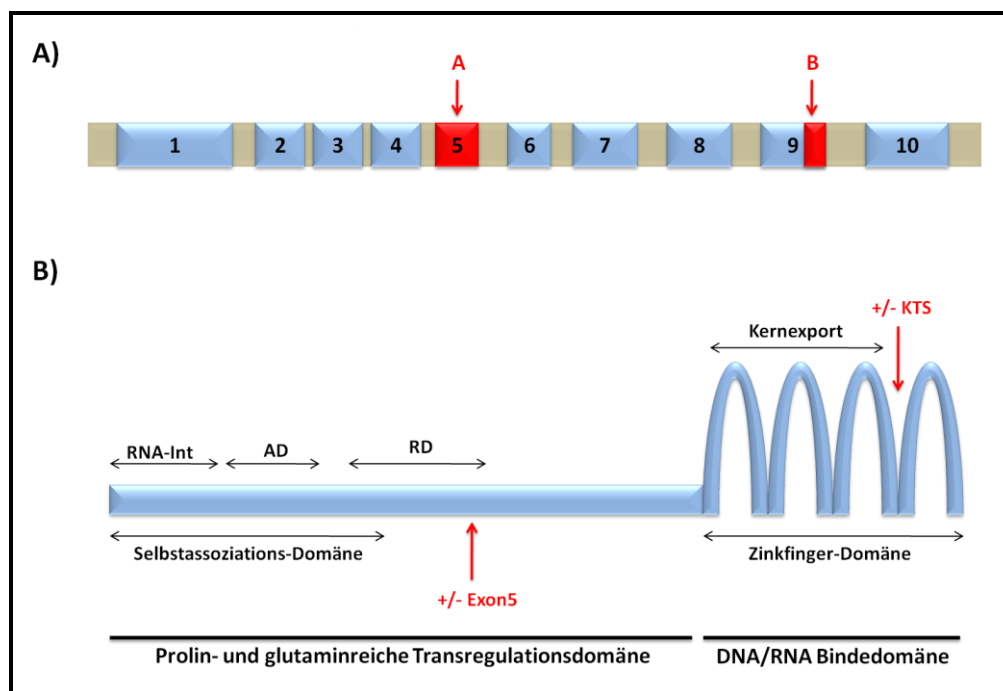


Abbildung 1.5: Das Wilms-Tumorgen 1 und sein Protein

Die schematische Darstellung zeigt in **A)** das *WT1*-Gen und in **B)** das WT1-Protein. **A)** Das *WT1*-Gen besteht aus 10 Exons (hellblau). Bestimmte Bereiche der Exons können durch alternatives Spleißen entfernt oder hinzugefügt werden (rot). Dabei entstehen die Hauptisoformen +/- Exon 5 (roter Pfeil/ A) oder +/- KTS von WT1 (roter Pfeil/ B). **B)** Das WT1-Protein weist typische Charakteristika eines Transkriptionsfaktors auf. Vier Cys₂-His₂ Zinkfinger am C-terminalen Ende des Proteins bilden die DNA/RNA-Bindedomäne und ermöglichen zudem den Kernexport. Der N-terminale Bereich stellt dagegen eine prolin- und glutaminreiche Transregulationsdomäne dar. In diesem Bereich befindet sich eine aktivierende (AD) und reprimierende Domäne (RD), sowie eine Region zur Selbstassoziation und RNA-Interaktion (RNA-Int). Die Stellen des alternativen Spleißens sind wiederum durch rote Pfeile markiert (+/- Exon 5 und +/- KTS) (Abbildung verändert nach Scholz und Kirschner, 2005).

Die augenscheinlich physiologisch bedeutendsten Isoformen entstehen durch alternatives Spleißen. Diese Spleißereignisse betreffen das 17 Aminosäuren codierte Exon 5 (+/- Exon 5), sowie eine mögliche Insertion der drei Aminosäuren Lysin-Threonin-Serin (+/- KTS) in Exon 9 (Haber *et. al.*, 1991). Diese vom Haupttranslationsstart (AUG) gebildeten Hauptisoformen haben eine Größe zwischen 52-54 kDa und besitzen wie fast alle anderen WT1-Isoformen einen prolin- und glutaminreichen N-Terminus (Transregulationsdomäne u.a. mit einer Region zur Selbstassoziation), sowie vier Cys₂-His₂-Zinkfinger (DNA/RNA-Bindedomäne), die im C-terminalen Teil des Proteins liegen (Exon 7-10). WT1 zeigt somit typische Merkmale eines Transkriptionsfaktors (Call *et. al.*, 1990; Rauscher *et. al.*, 1990; Hohenstein und Hastie, 2006), dessen Zinkfinger zudem eine Homologie zu *ERG1* (*early growth response protein 1*) aufweisen (Rauscher *et. al.*, 1990). Generell treten alle Isoformen immer in einem konstanten Mengenverhältnis zueinander auf (Haber *et. al.*, 1991). Im Folgenden soll nur die physiologische Funktion der Hauptisoformen WT1 +/- KTS beschrieben werden, da über die Funktionen der anderen Isoformen nur wenig bekannt ist.

Den zwei Isoformen WT1 +/- KTS konnten eindeutige physiologische Funktionen zugewiesen werden. Dabei scheint die – KTS-Isoform die Rolle eines Transkriptionsfaktors zu besitzen. Sie hat eine hohe Bindungsaffinität zu DNA und kann aktivierend oder reprimierend wirken (Rauscher *et. al.*, 1990; Wang *et. al.*, 1993; Cook *et. al.*, 1996). Dagegen weist die + KTS-Isoform eine hohe Bildungsaffinität zu RNA auf und ist am Spleißen von RNA, dem Transport von mRNA aus dem Nukleus und dessen Translation beteiligt (Larsson *et. al.*, 1995; Davies *et. al.*, 1998; Ladomery *et. al.*, 1999; Markus *et. al.*, 2006; Morrison *et. al.*, 2008). Die unterschiedliche Bindungsaffinität der beiden Isoformen gegenüber DNA bzw. RNA scheint dabei durch die Insertion der drei Aminosäuren Lysin-Threonin-Serin zu entstehen, wodurch der Abstand zwischen Zinkfinger 3 und 4 verändert wird und dies direkten Einfluss auf die DNA- bzw. RNA-Bindungsfähigkeit der entsprechenden Isoform hat (Laity *et. al.*, 2000).

Die Funktionen der WT1-Isoformen +/- KTS zeigen, dass *WT1* eine bedeutende Rolle in der Transkription und Translation von Zielgenen spielt und somit möglichen Einfluss auf viele Prozesse in der Embryogenese, in adulten Geweben und der Tumorgenese hat.

1.3.2 Expression und Funktion von WT1 in embryonalen und adulten Geweben

Die Expressionsorte von WT1 sind in murinen und humanen Geweben nahezu identisch, so dass im Folgenden die embryonale und adulte WT1-Expression, sowie dessen Funktion am Beispiel der Maus erläutert werden soll. Bis zum Tag 9,5 *d.p.c.* konnte bisweilen keine *Wt1*-Expression in murinem Gewebe nachgewiesen werden, so dass dieses Gen anscheinend keine Rolle in der Gastrulation und Neurulation des Embryos spielt. Erst nach Tag 9,5 *d.p.c.* wird *Wt1* hauptsächlich in Derivaten des Mesoderms exprimiert und führt dabei unterschiedliche Funktionen aus

So kann *Wt1* ab Tag 9,5 bis 15,5 *d.p.c.* in den mesothelialen Überzügen der Organe des Thorax (Pleura) und Abdomens (Peritoneum) nachgewiesen werden (Armstrong *et. al.*, 1993; Rackley *et. al.*, 1993). Dabei scheint der Transkriptionsfaktor zunächst anti-apoptotische Effekte auf diese einschichtigen Gewebe zu haben, um im Anschluss z. B. im entstehenden Herz, der Lunge und dem Darm eine epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) dieser *Wt1*-positiven Zellen zu steuern. Aus diesen Zellen bilden sich nachfolgend Vorläuferzellen von glatten Muskelzellen und endothelialen Zellen, die zur Gefäßbildung des jeweiligen Organs beitragen (Wilm *et. al.*, 2005; Que *et. al.*, 2008; Zhou *et. al.*, 2008).

Eine weitere embryonale Funktion von *Wt1* ist der Erhalt und die Differenzierung von Zellen, die eine Organanlage bilden und ohne dessen *Wt1*-Expression diese Organe reduziert oder gar nicht angelegt werden (Kreidberg *et. al.*, 1993; Herzer *et. al.*, 1999). Diese Funktion des

Transkriptionsfaktors scheint auf seine Expression ab Tag 10,5 *d.p.c.* in der bilateralen Urogenitalfalte (Ursprungsort der entstehenden Nieren und Geschlechtsorgane), dem Vorläufermesenchym der Milz, sowie der entstehenden Retina und des olfaktorischen Epitheliums zuzutreffen (Armstrong *et. al.*, 1993; Rackley *et. al.*, 1993; Herzer *et. al.*, 1999; Wagner *et. al.*, 2002; Wagner *et. al.*, 2005). Um diese Funktion von Wt1 besser nachvollziehen zu können, soll die Expression und Rolle dieses Gens während der murinen Nephrogenese genauer beschrieben werden.

Die erste Wt1-Expression während der Entstehung der Niere ist an Tag 10,5 *d.p.c.* im metanephrischen Mesenchym nachweisbar. Über die Regulation des Gens *Bcl2* (*B-cell lymphoma 2*) scheint Wt1 einen anti-apoptotischen Effekt auf diese Zellen zu haben und gewährleistet über die Induktion des Auswuchses der Ureterknospe die Entstehung der Niere (Hewitt *et. al.*, 1995; Mayo *et. al.*, 1999; Fukuzawa *et. al.*, 2004). Nachfolgend bleibt die Expression von Wt1 an Tag 11,5 und 12,5 *d.p.c.* im kondensierten Mesenchym erhalten. Während der zu diesem Zeitpunkt stattfindenden Interaktion zwischen Ureterknospe und dem kondensierten Mesenchym steuert es zum einen über *Amphiregulin* die Verzweigung der Ureterknospe (Lee *et. al.*, 1999) und zum anderen über *Wnt4* die mesenchymale-epitheliale Transition (MET) des kondensierten Mesenchyms (Sim *et. al.*, 2001; Schedl, 2007). Ab Tag 13,5 *d.p.c.* weist man Wt1 in den Strukturen der Epithelialisierungsprozesse nach (renale Vesikel, Komma- und S-förmige Vesikel). Die Expression des Transkriptionsfaktors ist dabei auf die Bereiche der späteren Glomeruli reduziert und scheint deren Differenzierung über die Inhibierung von *Pax2* (*Paired box gene 2*) (Dressler *et. al.*, 1993; Ryan *et. al.*, 1995; Wagner *et. al.*, 2006) und Aktivierung von *VEGF* (*Vascular Endothelial Growth Factor*) zu steuern (Eremina *et. al.*, 2003; Gao *et. al.*, 2005; Hanson *et. al.*, 2007). Ab Tag 16,5 *d.p.c.* ist die Nephrogenese weitestgehend abgeschlossen und die Wt1-Expression spätestens ab Tag 19,5 *d.p.c.* auf die Podozyten der Glomeruli beschränkt (Armstrong *et. al.*, 1993).

So vielseitig die Expression von Wt1 während der murinen Embryogenese ist, umso limitierter ist sie in adulten Mäusen. Sie beschränkt sich auf die Podozyten der Niere, das Myometrium und Teile des Endometriums des Uterus, das Ovar epithel und die Granulosa-Zellen im Ovar, sowie die Sertoli-Zellen des Hodens (Pritchard-Jones *et. al.*; 1990; Pelletier *et. al.*, 1991c). Des Weiteren kann man auch eine adulte Wt1-Expression in den CD34⁺ CD38⁻ bzw. CD34⁺ CD38⁺-Populationen von hämatopoetischen Vorläuferzellen nachweisen (siehe auch Einleitung 1.3.3), die auch schon im Embryo zu beobachten ist (Frazier *et. al.*, 1995, Übersicht: Ariyaratana und Loeb, 2007). Generell scheint sich dabei die adulte Funktion von Wt1 auf den Erhalt dieser

hochspezialisierten Zellen zu beschränken, was am Beispiel der Podozyten der Niere genauer dargestellt werden soll.

Die Podozyten der Niere bilden eine einzellige Schicht epithelialer Zellen in den Glomeruli, die deren Blutgefäße umgeben und maßgeblich an der Ultrafiltration des Primärharns beteiligt sind (Scharnhorst *et. al.*, 2001). Dabei erhält *Wt1* über die transkriptionelle Regulation der Gene *Nephrin* und *Podocalyxin* die molekulare Barriere bzw. das Zytoskelett der Glomeruli (Palmer *et. al.*, 2001; Wagner *et. al.*, 2004; Guo *et. al.*, 2004). Zudem scheint der Transkriptionsfaktor über die Inhibierung von *Pax2* für den Erhalt der Funktion der Podozyten verantwortlich zu sein, da somit eine fehlregulierte Proliferation dieser Zellen, sowie mesangialen Zellen der Glomeruli verhindert wird, die chronische Glomerulopathien wie z.B. beim DDS auslösen können (Yang *et. al.*, 2004).

Zusammenfassend kann man sagen, dass *Wt1* ab Tag 9,5 *d.p.c.* in vielen embryonalen Geweben exprimiert wird und sich seine Expression in adulten Geweben auf einzelne hochspezialisierte Zellen beschränkt. Dabei scheint der Transkriptionsfaktor zunächst eine anti-apoptotische Wirkung auf embryonale *Wt1*-exprimierende Zellen bzw. Gewebe zu haben, um im Anschluss bei einsetzenden Differenzierungsprozessen die Vorgänge von mesenchymalen-epithelialen Übergängen zu steuern. Dagegen beschränkt sich die adulte Funktion von *Wt1* auf den Erhalt der Zellhomöostase in den *Wt1*-exprimierenden Geweben.

Generierte *Wt1* *k.o.*-Mäuse, wie z.B. von Kreidberg und Kollegen, sind ein Abbild des oben beschriebenen *Wt1*-Expressionsmodells und zeigen eindeutig welche Schlüsselrolle *Wt1* u.a. während der Entwicklung des Urogenitalsystems spielt (Kreidberg *et. al.*, 1993). Zudem kann dadurch die direkte Verbindung zu den beim Menschen auftretenden Fehlbildungen und Tumoren nachvollzogen werden.

1.3.3 Die Rolle von *WT1* im Wilms-Tumor und anderen Tumorerkrankungen

Aberrationen und Veränderungen der Expression des *WT1*-Gens gibt es in vielen Tumoren. Während der Transkriptionsfaktor nach seiner Entdeckung im Jahre 1990 lange als Tumorsuppressor galt, so häuften sich zuletzt immer mehr Anzeichen, dass *WT1* auch ein Onkogen sein kann (Wagner *et. al.*, 2008; Huff, 2011). Hier soll am Beispiel des Wilms-Tumors und der Leukämie die Rolle von *WT1* als Tumorsuppressor und Onkogen erläutert werden.

In 20 % aller Wilms-Tumore detektiert man *WT1*-Mutationen (Huff *et. al.*, 1998; Ruteshouser *et. al.*, 2008). Diese Tumore zeichnen sich durch die typische triphasische Histologie aus (siehe Abb. 1.8), wobei der stromale/mesenchymale Gewebeanteil am größten ist und zusätzliche

mesenchymale Elemente, wie Rhabdomyoblasten, Chondrozyten und Adipozyten auftreten können (Beckwith *et. al.*, 1990; Schumacher *et. al.*, 1997; Charles *et. al.*, 1998; Beckwith, 1998). Die *WT1*-mutierten Wilms-Tumore scheinen sich dabei aus speziellen nephrogenen Resten zu entwickeln, da sie mit den sogenannten *intralobar nephrogenic rests* (ILNR) assoziiert sind, die nur bei einer Störung der frühen Nephrogenese auftreten (Beckwith, 1998). Somit führt wohl eine Mutation von *WT1* zur Blockade der Differenzierung von Nierenvorläuferzellen, so dass ILNR entstehen und sich durch Mutationen anderer Gene ein Wilms-Tumor entwickeln kann. *WT1* ist also im Falle der Wilms-Tumorgenese ein Tumorsuppressor (siehe Abb. 1.6).

Dagegen kann der Transkriptionsfaktor in verschiedenen Leukämieerkrankungen die Rolle eines Tumorsuppressors oder Onkogens einnehmen. Um dies besser verstehen zu können, soll zunächst die Funktion von *WT1* in der Hämatopoese beschrieben werden.

WT1 wird während der normalen embryonalen und adulten Hämatopoese in einer Gruppe von nicht-proliferierenden ($CD34^+ CD38^-$) und proliferierenden ($CD34^+ CD38^+$) hämatopoetischen Vorläuferzellen exprimiert (Inoue *et. al.*, 1994; Baird *et. al.*, 1997; Maurer *et. al.*, 1997; Hosen *et. al.*, 2002; Hosen *et. al.*, 2007). Während der frühen Differenzierung von myeloischen Vorläuferzellen kommt es zu einem Anstieg der *Wt1*-Expression, wobei sie mit weiter fortlaufender Differenzierung abnimmt, so dass schließlich weniger als 1 % aller voll differenzierten Blutzellen eine *Wt1*-Expression aufweisen (Hosen *et. al.*, 2007). Der Transkriptionsfaktor scheint somit in der normalen Hämatopoese zunächst durch anti-apoptotische Effekte den Erhalt und anschließend die Proliferation von hämatopoetischen Vorläuferzellen zu fördern, bevor er die Differenzierung dieser Vorläuferzellen einleitet (Übersicht: Ariyaratana und Loeb, 2007).

In der malignen Hämatopoese kann man nun zum einen *WT1*-Mutationen in einem Teil von Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML) feststellen (Summers *et. al.*, 2007; Paschka *et. al.*, 2008; Hollink *et. al.*, 2009), und zum anderen eine verstärkte *WT1*-Expression in einer Vielzahl von akuten und chronischen Leukämien nachweisen (Miwa *et. al.*, 1992; Inoue *et. al.*, 1994; Mensen *et. al.*, 1995; Inoue *et. al.*, 1996).

Dabei scheint *WT1* im Falle der AML als Tumorsuppressor zu fungieren (siehe Abb. 1.6). Zu einem frühen Zeitpunkt der Hämatopoese muss es wohl zu einer Mutation von *WT1* in den hämatopoetischen Vorläuferzellen kommen, wodurch sie ihren anti-apoptotischen und undifferenzierten Charakter beibehalten. Nachfolgend bleibt durch die *WT1*-Mutation die Differenzierung der hämatopoetischen Vorläuferzellen aus und durch weitere Mutationen in anderen Genen kann es zur Entstehung einer AML kommen (Übersicht: Huff, 2011).

In den akuten und chronischen Leukämien mit WT1-Überexpression scheint der Transkriptionsfaktor dagegen die Rolle eines Onkogens einzunehmen. Dabei nimmt die WT1-Expression während der Reifung von myeloischen Zellen nicht ab, sondern bleibt erhalten. Somit kommt es zu keiner weiteren Differenzierung und nachfolgend zur gesteigerten Proliferation von myeloischen Vorläuferzellen, so dass sich die verschiedenen Leukämieerkrankungen entwickeln (Übersicht: Huff, 2011).

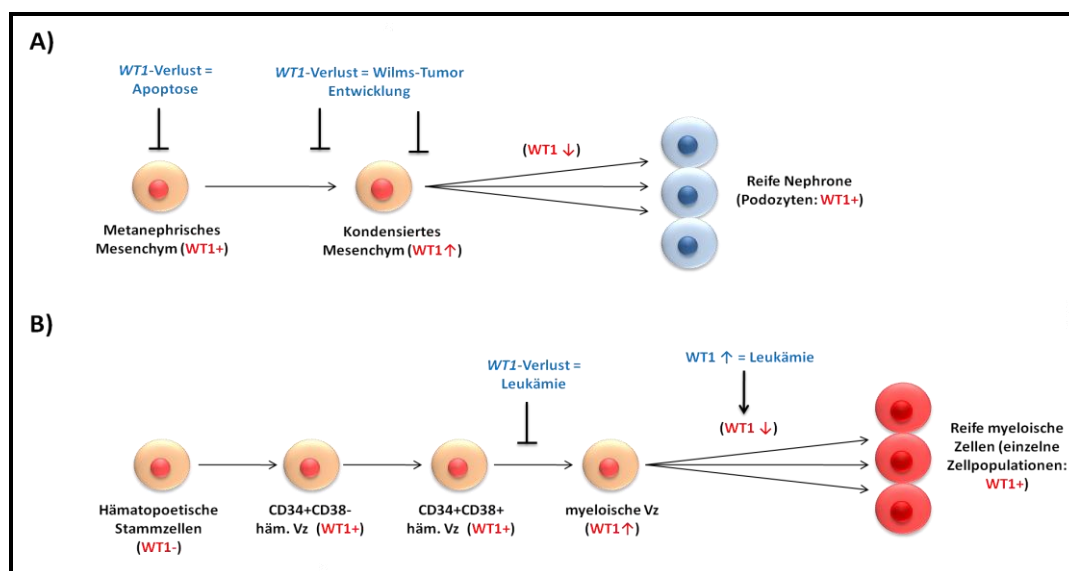


Abbildung 1.6: Die Rolle von *WT1* als Tumorsuppressor und Onkogen

In dieser Abbildung wird anhand der Nephrogenese (A) und der Hämatopoese (B) die Rolle von *WT1* als Tumorsuppressor und Onkogen erläutert. A) Ein Verlust von *Wt1* zu einem frühen Zeitpunkt der Nephrogenese führt zur Apoptose der Zellen des metanephrischen Mesenchyms, wodurch die Niere nicht entsteht. Dagegen kann eine *Wt1*-Mutation während der Induktion der Reifung der Nephronen zu einer Wilms-Tumorentstehung führen. Somit weist *WT1* während der Nephrogenese die Funktion eines Tumorsuppressors auf. B) Kommt es während der Hämatopoese zu einer *WT1*-Mutation in $CD34^+/CD38^+$ hämatopoetischen Vorläuferzellen (häm. Vz), so bleiben diese Zellen in einem proliferativen, undifferenzierten Zustand und können zur Entstehung von Leukämien beitragen. In diesem Fall ist *WT1* ein Tumorsuppressor. Doch *WT1* kann in der Hämatopoese auch ein Onkogen sein, indem seine Expression während der Reifung der myeloischen Zellen (myeloischer Vz) nicht abnimmt und diese undifferenzierten Zellen sich weiter vermehren. Generell ist in der Abbildung die normale *WT1*-Expression während der Nephrogenese und Hämatopoese in rot dargestellt und dessen veränderte Expression, die zur Entstehung von Leukämien und eines Wilms-Tumors führt, in blau (Abbildung verändert nach Huff, 2011).

1.4 Das Gen *CTNNB1* und dessen Protein β -Catenin

1.4.1 Allgemeines zum *CTNNB1*-Gen und dessen Protein β -Catenin

Das *CTNNB1*-Gen wurde im Jahre 1991 von McCrea und Kollegen kloniert (McCrea *et al.*, 1991). Es ist das humane Homolog des *Drosophila*-Segmentpolaritätsgens *Armadillo* und liegt in der Chromosomenregion 3p22 bis p21.3 (Kraus *et al.*, 1994, Hengel *et al.*, 1995). Zudem kodiert es ein 3,7 kb großes Transkript mit 15 Exons, das nach seiner Translation ein 88 kDa schweres Protein bildet, welches als β -Catenin bezeichnet wird (www.ensembl.org, *Ctnnb1*-ID:

ENSG00000168036). Dieses als Transkriptionsfaktor wirkende Protein besitzt eine zentrale, positiv geladene Bindedomäne, die aus 42 Aminosäuren besteht, woran viele negativ geladene Interaktionspartner binden können (Huber *et. al.*, 1997; Daugherty und Gottardi, 2007). In diesem Zusammenhang kann β -Catenin eine Verbindung mit E-Cadherin (*Epithelial Cadherin*) eingehen und ist somit Bestandteil der Cadherin-vermittelten Zelladhäsion (Nollet *et. al.*, 1996). Des Weiteren kann es mit einer Reihe von negativ geladenen Proteinen der kanonischen Wnt-Signalkaskade interagieren und stellt als Übermittler des Wnt-Signals in den Zellkern einen zentralen Regulator dieses wichtigen Signalwegs dar (Wodarz *et. al.*; 1998; Übersicht: Reya und Clevers, 2005). Dies soll im Folgenden genauer beschrieben werden.

Bei keiner Bindung eines Wnt-Proteins an die beiden Wnt-Rezeptorkomponenten Frizzled und LRP (*Low Density Lipoprotein Receptor*) ist die kanonische Wnt-Signalkaskade nicht aktiv und das im Zytoplasma vorliegende β -Catenin wird durch einen aus Axin, APC (*Adenomatous Polyposis Coli*), CK1 (*Casein Kinase 1*) und GSK3- β (*Glycogen-Synthase Kinase 3 β*) gebildeten Komplex gebunden. Nachfolgend kommt es durch die Kinasen CK1 und GSK3- β zu einer Phosphorylierung von Aminosäuren im N-terminalen Bereich von β -Catenin, so dass das modifizierte Protein von β TrCP (*β -Transducin-repeat-Containing Protein*) erkannt und eine β -Catenin-Degradation durch die E3 Ubiquitin-Ligase einleitet wird (Aberle *et. al.*, 1997; Clevers, 2006). Somit ist kein freies β -Catenin vorhanden, so dass es nicht in den Zellkern gelangt und Zielgene aktiviert (siehe Abb. 1.7).

Kommt es nun zu einer Bindung eines Wnt-Proteins an seine Rezeptorkomponenten wird die Signalkaskade aktiviert. Dies hat erhebliche Auswirkungen auf das zytoplasmatische β -Catenin. So wird z.B durch die Ligandenbindung der zytoplasmatische Teil von LRP phosphoryliert (Davidson *et. al.*, 2005; Zeng *et. al.*, 2005), wodurch eine Axin-Bindung vermittelt und die Bildung des Komplexes verhindert wird, der die Degradation von β -Catenin steuert (Gao *et. al.*, 2002). Des Weiteren hat die Bindung von Wnt-Proteinen die Phosphorylierung des Proteins Dishevelled durch die Wnt-Rezeptorkomponente Frizzled zur Folge (Wallingford und Habas, 2005). Das modifizierte und dadurch aktivierte Protein Dishevelled inhibiert die Aktivität von GSK3- β (Yost *et. al.*, 1996; Li *et. al.*, 1999), so dass auch über diesen Weg der Abbau von β -Catenin gehemmt wird und es zur Akkumulation des Proteins im Zytoplasma kommt. Nachfolgend gelangt β -Catenin durch einen Transfer in den Nukleus, wo das Protein an Transkriptionsfaktoren der TCF (*T-Cell Factor*) / LEF (*Lymphoid Enhancer Factor*)-Familie bindet (Übersicht: Clevers, 2006). In Abhängigkeit von weiterer Interaktionspartner, wie z.B. Bcl-9 (*B-cell CLL/lymphoma 9 protein*), Pygopus, Brg-1 (*Brahma-related gene 1*) und Hyrax (Übersicht: Cadigan und Peifer, 2009) kommt es zur Transkription verschiedener β -Catenin-Zielgene (www.stanford.edu/~rnusse/wntwindow.html).

Durch die Aktivierung dieser Zielgene kann β -Catenin viele Funktionen in embryonalen und adulten Organismen ausüben. So ist die Expression von β -Catenin ab Tag 6,0 *d.p.c* in murinen Embryonen nachweisbar (Maretto *et. al.*, 2003) und steuert ab diesem Zeitpunkt in einer Vielzahl von neugebildeten, embryonalen Geweben und Organen u.a. die Proliferation, Differenzierung, Migration und Apoptose von Zellen (Übersicht: Logan und Nusse, 2004; Grigoryan *et. al.*, 2008). Auch im adulten Gewebe bleibt die kanonische Wnt-Signalkaskade bzw. β -Catenin aktiv, wodurch die Homöostase von vielen Geweben reguliert und der Erhalt von Stammzellen gewährleistet wird (Übersicht: Reya und Clevers, 2005; Clevers, 2006).

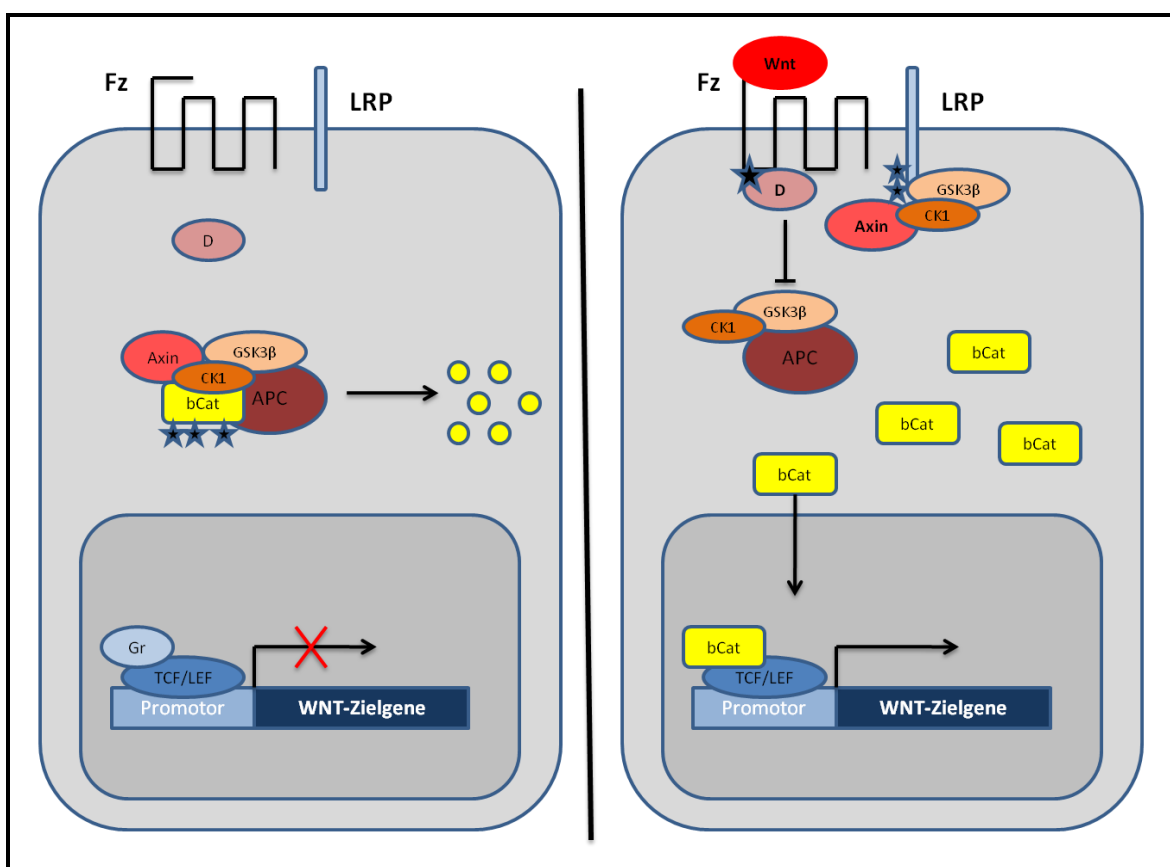


Abbildung 1.7: Der kanonische Wnt-Signalweg

In dieser Abbildung ist der kanonische Wnt-Signalweg schematisch dargestellt. Ohne die Bindung eines Wnt-Proteins (linke Seite) an die Wnt-Rezeptorkomponenten Frizzled (Fz) und LRP wird β -Catenin (bCat) durch einen Komplex aus Axin, APC, GSK3 β und CK1 im Zytoplasma (hellgrau) gebunden und phosphoryliert (schwarze Sterne). Nachfolgend wird es durch die Ubiquitin-vermittelten proteosomalen Degradation abgebaut. β -Catenin gelangt somit nicht in den Nucleus (dunkelgrau), wo eine Komplexbildung aus den Transkriptionsfaktor-Elementen Groucho (Gr) und TCF/LEF die Transkription von Wnt-Zielgenen verhindert. Kommt es nun zu einer Bindung eines Wnt-Proteins (Wnt) an die Rezeptoren Fz und LRP (rechte Seite) wird das Protein Dishevelled (D) phosphoryliert, was eine Inhibition von GSK3 β zur Folge hat. Des Weiteren vermittelt die Wnt-Proteinbindung eine Phosphorylierung des zytoplasmatischen Anteils von LRP durch CK1 und GSK3 β . Nachfolgend wird Axin gebunden. Beide Ereignisse verhindern den Abbau von β -Catenin, so dass das Protein im Zytoplasma akkumuliert und in den Nucleus gelangen kann. Dort nimmt es den Platz von Groucho ein und aktiviert zusammen mit den Transkriptionsfaktoren TCF/LEF die Transkription von Wnt-Zielgenen (Abbildung verändert nach Clevers, 2006).

1.4.2 Die Rolle von *CTNNB1* und dessen Protein β -Catenin im Wilms-Tumor und anderen Tumorerkrankungen

Wie zuvor beschrieben, spielt der kanonische Wnt-Signalweg mit seinem Regulator β -Catenin eine entscheidende Rolle bei dem Erhalt der Homöostase von adulten Geweben (siehe Einleitung 1.4.1). *CTNNB1*-Mutationen, die den Abbau von β -Catenin verhindern und den kanonischen Wnt-Signalweg dauerhaft aktivieren, können somit schnell zur Entstehung von Tumoren führen. Daher verwundert es nicht, dass man bei einer Vielzahl von Tumorerkrankungen diese *CTNNB1*-Mutationen nachweisen kann (Übersicht: Polakis, 2000). Zu diesen Erkrankungen gehört u.a. das Kolonkarzinom (Sparks *et al.*, 1998), Leukämien (Staal und Clevers, 2004), endometroide Karzinome des Ovars (Wright *et al.*, 1999) und des Uterus (Fukuchi *et al.*, 1998) sowie der Prostatakrebs (Voeller *et al.*, 1998). Dabei kommt es im Zuge des aktivierten, kanonischen Wnt-Signalwegs u.a. zur Expression verschiedener Onkogene wie z. B. *c-myc* (*c-myc binding protein*) und *Cyclin D1* (*G1/S-specific Cyclin-D1*), die die Tumorgenese vorantreiben (Diehl, 2002; Pelengaris *et al.*, 2003; Tashiro *et al.*, 2007). Doch nicht nur in adulten Geweben kann ein aktiviertes β -Catenin die Entstehung eines Tumors begünstigen. Auch in embryonalen Tumoren, wie z. B. dem Wilms-Tumor, scheint dies der Fall zu sein.

So kann man Mutationen von *CTNNB1* in 15 % aller Patienten mit Wilms-Tumoren feststellen (Koesters *et al.*, 1999). Bei diesen Mutationen handelt es sich zumeist um Punktmutationen des dritten Exons von *CTNNB1*, die die Aminosäuren Serin und Threonin betreffen, welche wichtig für die Phosphorylierung und Degradation von β -Catenin sind (Polakis, 1999). Ohne den Abbau von β -Catenin kommt es zur dauerhaften Aktivierung des Wnt-Signalwegs, mit den zuvor beschriebenen Folgen (siehe Einleitung 1.4.1). Auffällig ist, dass Wilms-Tumorerkrankungen, die eine aktivierende *CTNNB1*-Mutation aufweisen, zumeist in Kombination mit einer *WT1*-Mutation auftreten (Maiti *et al.*, 2000). Somit erklärt sich auch, dass die Histologie von Wilms-Tumoren mit *CTNNB1*-Mutationen (Fukuzawa *et al.*, 2004; Fukuzawa *et al.*, 2007) der von Wilms-Tumoren mit *WT1*-Mutationen gleicht (siehe Einleitung 1.3.3 und Abb. 1.8). Daher liegt der Verdacht nahe, dass sie zusammen die Tumorgenese dieser Erkrankung steuern (siehe Einleitung 1.2.4 und Abb. 1.8). Dies soll im Folgenden genauer erläutert werden.

Fukuzawa und Kollegen konnten mit Hilfe von Untersuchungen von *WT1*- und *CTNNB1*-mutierten Wilms-Tumoren zeigen, dass man nur *WT1*-Mutationen und nicht *CTNNB1*-Mutationen in ILNR des Tumorgewebes nachweisen kann (Fukuzawa *et al.*, 2007, Fukuzawa *et al.*, 2008). Da die ILNR als Ursprungsort der Entstehung dieser Tumorerkrankung gelten (Beckwith *et al.*, 1990), treten *WT1*-Mutationen in der Tumorgenese des Wilms-Tumors wohl vor einer Mutation von *CTNNB1* auf. Dagegen detektiert man aktiviertes β -Catenin zumeist im blastemalen Anteil der *WT1*- und *CTNNB1*-mutierten Wilms-Tumore, sowie den zusätzlichen

mesenchymalen Elementen wie Rhabdomyoblasten, Chondrozyten und Adipozyten (Koesters *et. al.*, 2003, Fukuzawa *et. al.*, 2004, Zirn *et. al.*, 2006; Fukuzawa *et. al.*, 2007, Fukuzawa *et. al.*, 2008). Somit scheint β -Catenin die Entstehung dieser zusätzlichen mesenchymalen Elemente zu fördern (Fukuzawa *et. al.*, 2004), was ebenfalls dafür sprechen würde, dass *CTNNB1*-Mutationen erst zu einem späteren Zeitpunkt der Tumorgenese des Wilms-Tumors auftreten (Fukuzawa *et. al.*, 2004, Fukuzawa *et. al.*, 2007).

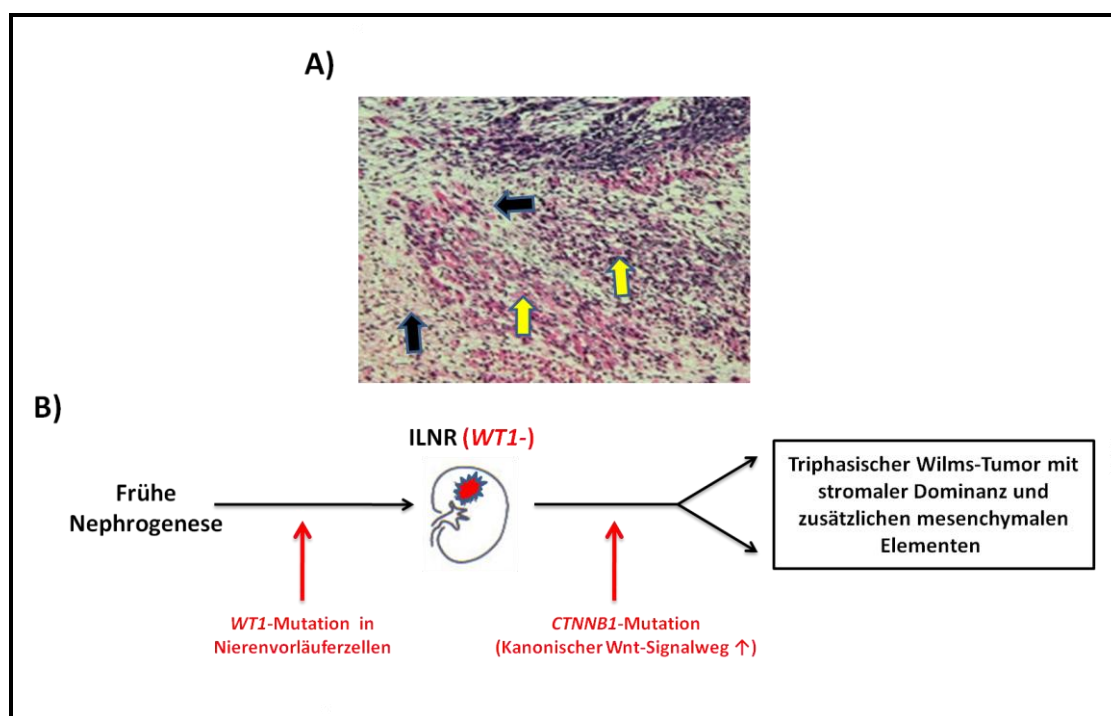


Abbildung 1.8: Die Rolle von *WT1* und *CTNNB1* in der Wilms-Tumorgenese

A) Zu sehen ist ein HE-gefärbter Schnitt eines Wilms-Tumors in dem Mutationen von *WT1* und *CTNNB1* nachgewiesen werden konnten. Diese Wilms-Tumoren weisen eine für die Erkrankung typische, triphasische Histologie auf, wobei der stromale Gewebeanteil dominiert (schwarze Pfeile) und zusätzliche mesenchymale Elemente wie Rhabdomyoblasten, Chondrozyten und Adipozyten auftreten (gelbe Pfeile). **B)** In diesem Teil der Abbildung ist ein Modell für die Entstehung eines *WT1*- und *CTNNB1*-assoziierten Wilms-Tumors schematische dargestellt. Zu einem frühen Zeitpunkt der Nephrogenese kommt es in Nierenvorläuferzellen zur Mutation von *WT1*. Nachfolgend wird in diesen Zellen die Reifung der Nephrone unterbunden und ILNR mit multipotenten Nierenvorläuferzellen bleiben zwischen normal differenziertem Nierengewebe erhalten. In diesen undifferenzierten mesenchymalen Zellen kann durch eine *CTNNB1*-Mutation der kanonische Wnt-Signalweg aktiviert werden und nachfolgend ein triphasischer Wilms-Tumor entstehen (Abbildung **A**) entnommen aus Fukuzawa *et. al.*, 2007; Abbildung **B**) verändert nach Fukuzawa *et. al.*, 2009).

Ein weiteres Anzeichen, dass dafür spricht, dass *WT1* und β -Catenin gemeinsam die Wilms-Tumorgenese regulieren, ist die Tatsache das *Wt1* ein negativer Regulator des kanonischen Wnt-Signalwegs ist. *Wt1* scheint dabei u.a. eine hohe Bindungsaffinität zum Transkriptionsfaktor LEF zu besitzen, so dass LEF seinem Bindungspartner TCF entzogen wird (siehe Einleitung 1.4.1). Dadurch wird die β -Catenin gesteuerte Bindung des Komplexes TCF/LEF an die Promotoren der kanonischen Wnt-Zielgene unterbunden und der Signalweg inhibiert (Kim *et.*

al., 2009). Dies würde auch erklären, warum in *WT1*-mutierten Wilms-Tumoren, die keine Mutation von *CTNNB1* aufweisen, eine Überexpression von kanonischen Wnt-Zielgenen beobachtet werden kann. Diese fehlregulierten Zielgene könnten dabei helfen, den Funktionsverlust von WT1 im metanephrischen Mesenchym zu kompensieren. Eine durch die *WT1*-Mutation bedingte Apoptose dieser Zellen würde somit nicht stattfinden und die Voraussetzung für die Expansion *WT1*-defizienter Tumorzellen im Rahmen der Wilms-Tumor-Progression ermöglichen (Li *et. al.*, 2004).

Der genaue Mechanismus, wie WT1 und β -Catenin die Tumorgenese des Wilms-Tumors regulieren, bleibt unklar. Die Herstellung von konditionalen Wilms-Tumor-Mausmodellen, in denen man zu bestimmten Zeitpunkten der Nephrogenese *Wt1* und β -Catenin durch Mutationen inaktivieren bzw. aktivieren kann, würde helfen die Entwicklung von *WT1*- und *CTNNB1*-assoziierten Wilms-Tumoren genauer zu analysieren und einen großen Beitrag zur Erforschung dieser Erkrankung leisten.

1.5 Ziel der Arbeit

Der Wilms-Tumor ist eine embryonale Tumorerkrankung und umfasst den größten Anteil an renalen Tumoren zwischen dem 0. und 15. Lebensjahr. Obwohl eine Vielzahl von Syndromen (z.B. DDS) und Genmutationen (z.B. *WT1* und *CTNNB1*) mit dieser Erkrankung assoziiert sind, ist der Mechanismus der Wilms-Tumorgenese weitgehend unbekannt. Dies liegt u.a. daran, dass homozygote *Wt1*-Mutationen in der Maus embryonal (Tag 13,5 *d.p.c.*) letal sind und Mäuse mit heterozygoter *Wt1*-Mutation keine phänotypischen Auffälligkeiten zeigen. Um trotzdem die Ursache und die Entstehung des Wilms-Tumors besser verstehen zu können, sollten daher im Rahmen dieser Arbeit vier konditionale reversible Wilms-Tumor-Modelle in der Maus hergestellt werden.

Alle vier Modelle basierten dabei auf einer in der Arbeitsgruppe generierten konditional reversiblen *Wt1* *k.o.*-Effektormaus (WE2; siehe Material und Methoden 2.1.11). Dadurch lag in den zu generierenden Tieren *Wt1* durch die Integration des WE2-Transgens zwar nur heterozygot mutiert vor, doch durch den endogenen *Wt1*-Promotor des Transgens sollte es zur zeitlichen und räumlichen *Wt1*-analogen Expression eines tetrazyklinabhängigen Transaktivators (tTA) kommen, der ohne die Gabe von Doxycyclin Tet-regulierbare Transgene in *Wt1*-exprimierenden Zellen aktivieren kann (*Tet off*- und *Cre/loxP*-System, siehe Abb. 3.1 und 3.2), die einen positiven Einfluss auf die Wilms-Tumorgenese haben könnten.

So sollte durch das WE2 DDS-Modell (siehe Ergebnisse Abb.3.16) ein DDS simuliert werden und es in Tieren der Modelle WE2 TC bCat Δ Ex3, WE2 LC bCat Δ Ex3 und WE2 Wnt1 (siehe Ergebnisse Abb. 3.22 und 3.36) zur Akkumulation von β -Catenin in Wt1-exprimierenden Nierenvorläuferzellen kommen. Die dadurch aktivierte kanonische Wnt-Signalkaskade könnte in den sich differenzierten Zellen zum Verbleib und einer erhöhten Proliferation führen und des Weiteren die Entstehung eines triphasischen Wilms-Tumors begünstigen.

2. Material und Methoden

2.1 Material und Reagenzien

2.1.1 Chemikalien

Alle bei dieser Arbeit verwendeten Chemikalien besaßen den Reinheitsgrad „reinst“. Zudem wurden hier nicht aufgeführten Chemikalien von den Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) oder Sigma (München) bezogen.

Aceton	Fa. Riedel-de Hean (Seelze)
Agarose	Fa. Starlab (Ahrensburg)
Ammoniumacetat	Fa. Merck (Darmstadt)
Akrylamid	Fa. Roth (Karlsruhe)
Ammoniumpersulfat (APS)	Fa. Sigma (Steinheim)
Benzylalkohol	Fa. Sigma (Steinheim)
Benzylbenzoat	Fa. Sigma (Steinheim)
Biorad Protein Assay Reagenz	Fa. Biorad (München)
Borsäure	Fa. Roth (Karlsruhe)
Bovine Serum Albumin	Fa. Sigma (München)
Bromphenaolblau/Xylencyanol	Fa. Sigma (München)
Calciumchlorid	Fa. Merck (Darmstadt)
Chloroform	Fa. Sigma (Steinheim)
Chloroform-Isoamylalkohol (24:1)	Fa. Roth (Karlsruhe)
Citronensäure Monohydrat	Fa. Roth (Karlsruhe)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fa. Sigma (München)
di-Natriumhydrogenphosphat-Heptahydrat	Fa. Merck (Darmstadt)
Dithiotreitol (DTT)	Fa. Roth (Karlsruhe)
dNTPs	Fa. Invitrogen (Karlsruhe)
Doxycyclin	Fa. Sigma (München)
ECL-Plus	Fa. Amersham (Freiburg)
EDTA	Fa. Gerbu (Gaiberg)
Essigsäure 100 %	Fa. Merck (Darmstadt)
Ethanol	Fa. Merck (Darmstadt)
Ethidiumbromid	Fa. Roth (Karlsruhe)
Formaldehyd	Fa. Sigma (München)
Glycin	Fa. Roth (Karlsruhe)
Glycerin	Fa. Merck (Darmstadt)
Glycerol	Fa. Calbiochem (La Jolla, USA)
HEPES	Fa. Gerbu (Gaiberg)
Igepal CA-630 (NP-40)	Fa. Sigma (München)
Isopropanol	Fa. Merck (Darmstadt)
Kaliumacetat	Fa. Merck (Darmstadt)
Kaliumchlorid	Fa. Merck (Darmstadt)
Kaliumdihydrogenphosphat	Fa. Merck (Darmstadt)
Magermilchpulver	Fa. Heisler (Radolfzell)
β -Mercaptoethanol	Fa. Sigma (München)
Magnesiumchlorid	Fa. Sigma (Steinheim)

Methanol	Fa. Roth (Karlsruhe)
MOPS	Fa. Sigma (München)
N,N-Dimethylformamid	Fa. Sigma (Steinheim)
Natriumacetat	Fa. Merck (Darmstadt)
Natriumchlorid	Fa. Roth (Karlsruhe)
Natriumdeoxycholat	Fa. Sigma (München)
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat	Fa. Merck (Darmstadt)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Fa. Gerbu (Gaiberg)
Natriumfluorid	Fa. Roth (Karlsruhe)
Natriumhydrogencarbonat	Fa. Merck (Darmstadt)
Natriumhydroxid	Fa. Roth (Karlsruhe)
Natronlauge (verschiedene Konzentrationen)	Fa. Merck (Darmstadt)
Paraffin	Fa. Leica (Solms)
Paraformaldehyd	Fa. Sigma (München)
Roti-Histol	Fa. Roth (Karlsruhe)
Roti-Phenol/C/I (25:24:1)	Fa. Roth (Karlsruhe)
Saccharose	Fa. Biorad (München)
Salzsäure (verschiedene Konzentrationen)	Fa. Merck (Darmstadt)
Salzsäure (rauchend)	Fa. Merck (Darmstadt)
Sucrose	Fa. Roth (Karlsruhe)
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Fa. Biorad (München)
TRIS (hydroxyl-methylaminomethan)	Fa. Roth (Karlsruhe)
TRIS (hydroxyl-methylaminomethan)-Hydrochlorid	Fa. Roth (Karlsruhe)
Triton X-100	Fa. Roche (Mannheim)
Trizol	Fa. Invitrogen (Karlsruhe)
Tween 20	Fa. Roche (Mannheim)
Wasserstoffperoxid	Fa. Roth (Karlsruhe)
X-Gal	Fa. Roth (Karlsruhe)
Xylol	Fa. Roth (Karlsruhe)

2.1.2 Puffer und Lösungen

Alle hier aufgeführten Puffer wurden mit deionisiertem, hochreinem Wasser angesetzt. Durch anschließendes Autoklavieren wurde eine Keimfreiheit garantiert. Thermoinstabile Lösungen wurden nicht autoklaviert, sondern sterilisiert.

Agarose-Gele

x g Agarose
100 ml 1x TAE

Blocking Puffer (pro Western blot)

2,5 g Milchpulver
0,1 % Tween 20 (v/v)
25 ml 1 x PBS

DNA-Ladepuffer

15 g Saccharose
0,175 g Orange G
ad 50 ml H₂O

10 x DNase-Puffer

100 mM MgCl₂

10 mM DTT

dNTPs

250 µl dATP

250 µl dCTP

250 µl dGTP

250 µl dTTP

ad 20 ml H₂O

Ethidiumbromid (EtBr)-Färbelösung

5 µg EtBr/ml H₂O

6x Ladepuffer

350 mM Tris-HCl, pH 6,8

34,4 % Glycerol

10 % SDS

10 % β-Mercaptoethanol

0,06 % Bromphenolblau

ad 10 ml H₂O

10x Laufpuffer

44 g Glycin

30 g Tris

1 % SDS

ad 1 l H₂O

100 bp Marker

800 µl H₂O

150 µl 6 x blue-Marker

50 µl Marker (1 µg/ml)

Orange Dye

15 g Sucrose

0,175 g Orange G

ad 50 ml H₂O

10x PBS

80 g NaCl

2 g KCl

11,5 g di-Natriumhydrogenphosphat-Heptahydrat

2 g Kaliumdihydrogenphosphat

ad 1 l H₂O

1x PBT

100 ml 10x PBS

ad 1 l H₂O

0,05 % Tween 20 (frisch zugeben)

10x PCR Puffer

500 mM NaCl
2,7 mM KCl
15 mM MgCl₂

4 % PFA

4 g PFA
100 ml H₂O
3 - 4 Tropfen 4 M NaOH
bei 55°C erhitzen bis sich das PFA löst
mit HCl pH auf 6 - 7 einstellen (Indikatorpapier)

6x Proteinprobenpuffer

350 mM TrisHCl, pH 6,8
34,3 % Glycerol
10 % SDS
0,93 g DTT
10 % β-Mercaptoethanol (v/v)
0,06 % Bromphenolblau (w/v)

RIPA-Puffer

1 % NP-40 (v/v)
1 % Natriumdeoxycholat (w/v)
0,1 % SDS (w/v)
0,15 M NaCl
0,01 M Natriumphosphat, pH 7,2
2 mM EDTA
50 mM Natriumfluorid
0,2 mM Natriumvanadat
100 U/ml Aprotinin

3 % Sammelgel (Angaben für ein Gel)

2,1 ml H₂O
0,5 ml Akylamid (30 %)
0,38 ml 1 M Tris, pH 6,8
30 µl SDS (10 %)
30 µl APS (10 %)
3 µl TEMED

Tail-Lysepuffer

50 mM TrisHCl, pH 7,4
100 mM EDTA
100 mM NaCl
1 % SDS
100-600 µg Proteinase K (frisch zugeben)

10x TBE-Puffer

890 mM Tris
890 mM Borsäure
25 mM Na₂EDTA, pH 8,3

10x TBS

24,2 g Tris
80 g NaCl
pH 7,6 einstellen
ad 1 l H₂O

10x TE-Puffer

100 mM TrisHCl, pH 7,0-8,0
10 mM EDTA, pH 8,0

1x Transferpuffer

100 ml 10x Transferpuffer
150 ml Methanol
ad 1 l H₂O

10x Transferpuffer

144 g Glycin
30 g Tris
ad 1 l H₂O

10 % Trenngel (Angaben für ein Gel)

1,9 ml H₂O
1,7 ml Akrylamid (30 %)
1,3 ml 1,5 M Tris, pH 8,8
50 µl SDS (10 %)
50 µl APS (10 %)
2 µl TEMED

Tris/EDTA-Puffer

2,2 g Tris
0,86 g EDTA
ad 500 ml H₂O

Waschlösung der X-Gal-Färbung

2 mM MgCl₂
0,2 % NP40
0,1 % Deoxycholat
in PBS, pH 7,4 lösen

X-Gal-Färbelösung

5 mM K₃Fe(CN)₆
5 mM K₄Fe(CN)₆
2 mM MgCl₂
1 mg/ml X-Gal (in PBS pH 7,4)

2.1.3 Enzyme

Complete (Protease-Inhibitor)
DNaseI (Rnase frei)
Benzonase
M-MLV Reverse Transkriptase
Phosphostop (Phosphatase-Inhibitor)

Fa. Roche (Mannheim)
Fa. Roche (Mannheim)
Fa. Merck (Darmstadt)
Fa. Invitrogen (Karlsruhe)
Fa. Roche (Mannheim)

Proteinase K
 Ribonuklease Inhibitor
 Platinum[®] Taq DNA Polymerase

Fa. Peqlab (Erlangen)
 Fa. MBI Fermentas (Leon-Roth)
 Fa. Invitrogen (Karlsruhe)

2.1.4 Antikörper

Primärantikörper

Anti- β -Actin Clone AC-15 (monoclonal)
 β -Catenin Antibody #9587
 CD41 (anti-mouse) (14-0411)
 CD41 (PE rat anti-mouse) (558040)
 CD45 (anti-mouse) (14-0451)
 CD45 (Biotin Rat Anti-Mouse)
 CD49d (Biotin Rat Anti-Mouse) (557419)
 CD49d (PE-Cy7 anti-human) (304313)
 CD144 (anti-mouse) (16-1441)
 CD144 (APC anti-mouse) (138012)
 c-kit (M-14) Antibody: sc-1494
 c-myc (9E10): sc-40
 Cyclin D1 (Mouse Anti-Human) (556470)
 Flk-1 (PE-Cy7 rat anti-mouse) (561259)
 Flk-1 (Rat Anti-Mouse) (550549)
 GFP Antibody (NB600-308)
 GSK-3 β (27C10) #9315
 p21 (C-19): sc-397
 PECAM-1 (M-20): sc-1506
 Phospho-GSK-3 β (Ser9) (D3A4) #9322
 RUNX1 monoclonal antibody (M05)
 TGF β 1 (V) Antibody: sc-146
 WT1 (C-19)
 WT1 (F-6): sc-7385

Fa. Sigma (Steinheim)
 Fa. Cell signaling (Danvers, USA)
 Fa. eBioscience (San Diego, USA)
 Fa. BD Pharmingen (Heidelberg)
 Fa. eBioscience (San Diego, USA)
 Fa. BD Pharmingen (Heidelberg)
 Fa. BD Pharmingen (Heidelberg)
 Fa. BioLegend (Eching)
 Fa. eBioscience (San Diego, USA)
 Fa. BioLegend (San Diego, USA)
 Fa. Santa Cruz (Santa Cruz, USA)
 Fa. Santa Cruz (Santa Cruz, USA)
 Fa. BD Pharmingen (Heidelberg)
 Fa. BD Pharmingen (Heidelberg)
 Fa. BD Pharmingen (Heidelberg)
 Fa. Novus (Littleton, USA)
 Fa. Cell signaling (Danvers, USA)
 Fa. Santa Cruz (Santa Cruz, USA)
 Fa. Santa Cruz (Santa Cruz, USA)
 Fa. Cell signaling (Danvers, USA)
 Fa. Abnova (Jhongli, Taiwan)
 Fa. Santa Cruz (Santa Cruz, USA)
 Fa. Santa Cruz (Santa Cruz, USA)
 Fa. Santa Cruz (Santa Cruz, USA)

Sekundärantikörper

Alexa Fluor 488 goat anti-mouse (A-11001)
 Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit (A-11034)
 Alexa Fluor 555 goat anti-mouse IgG (A-21422)
 Alexa Fluor 555 goat anti-rat IgG (A-21434)
 APC-Streptavidin (405207)
 Cy5 (rabbit anti-goat) (305-175-008)
 Dy light 488 (Donkey Anti-Rabbit IgG)
 Dy light 549 (Donkey Anti-Goat IgG)
 PE/Cy7 Streptavidin (405206)
 Polyclonal swine anti-rabbit Immunoglobulins/HRP
 Polyclonal goat anti-mouse Immunoglobulins/HRP

Fa. Invitrogen (Karlsruhe)
 Fa. Invitrogen (Karlsruhe)
 Fa. Invitrogen (Karlsruhe)
 Fa. Invitrogen (Karlsruhe)
 Fa. BioLegend (Eching)
 Fa. Dianova (Hamburg)
 Fa. Dianova (Hamburg)
 Fa. Dianova (Hamburg)
 Fa. BioLegend (Eching)
 Fa. Dako (Glostrup, Dänemark)
 Fa. Dako (Glostrup, Dänemark)

2.1.5 Sera

Normal Donkey Serum (017-000-121)

Fa. Dianova (Hamburg)

2.1.6 Kits

<i>M-MLV RT Kit</i>	Fa. Invitrogen (Karlsruhe)
<i>RNeasy Mini Kit (250)</i>	Fa. Qiagen (Hilden)
<i>Mouse Colony-Forming Cell (CFC) Assays using Methocults®</i>	Fa. STEMCELL technologies (Grenoble, Frankreich)

2.1.7 Größenstandards

100 bp Leiter	Fa. Invitrogen (Karlsruhe)
1 kb Leiter	Fa. Invitrogen (Karlsruhe)
<i>PageRuler Prestained Protein Ladder</i>	Fa. Fermentas (St. Leon-Rot)

2.1.8 Verbrauchsmaterial

Deckgläser (verschiedene Maße)	Fa. IDL (Nidderau)
Einbettküvetten	Fa. Simport (Beloeil, Kanada)
FACS Rundbodenröhrchen	Fa. Becton Dickinson (Heidelberg)
Handschuhe Safe Hand plus	Fa. Intermedica (Klein-Winternheim)
Hyperfilme	Fa. Amersham (Freiburg)
Kanülen (0,70 x 30 mm; 0,90 x 40 mm)	Fa. Braun (Melsungen)
Kryoröhrchen	Fa. Nalgene (Schwerte)
Kulturflaschen (T25, T75)	Fa. Renner (Dannstadt)
Kulturschalen (10 cm)	Fa. Renner (Dannstadt)
Küvetten	Fa. Greiner (Frickenhausen)
Nitrozellulosemembran, Hybond-ECL	Fa. Amersham (Freiburg)
Objektträger (76 x 26 mm)	Fa. Menzel-Gläser (Wiesbaden)
Parafilm "M"	Fa. Pechiney (Chicago, USA)
Pasteurpipetten (aus Glas)	Fa. Brand, Wertheim
PCR-Reaktionsgefäße (0,2 ml, 0,5 ml)	Fa. Peqlab (Erlangen)
Petrischalen (100 x 20 mm)	Fa. Greiner (Frickenhausen)
Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Fa. Greiner (Frickenhausen)
Pipettenspitzen (1-10 µl/ 10-100 µl/ 100-1000 µl)	Fa. Sarstedt (Nürnberg)
Pipettenspitzen gestopft (1-10 µl)	Fa. Peqlab (Erlangen)
Pipettenspitzen gestopft (10-100 µl/ 100-1000 µl)	Fa. Peqlab (Erlangen)
PP-Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Fa. Greiner (Frickenhausen)
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2ml)	Fa. Eppendorf (Hamburg)
Schnappdeckel PP-Röhrchen	Fa. Falcon(Heidelberg)
Skalpell	Fa. Dahlhausen (Köln)
Spritzen (1, 2, 5, 10, 20 ml)	Fa. Braun (Melsungen, Germany)
6-well Zellkulturschalen	Fa. Greiner (Frickenhausen)
Whatman-Papier (3 mm)	Fa. Whatman int. (Maidstone, England)
Zellspartel	Fa. Biologix (Lenexa, USA)

2.1.9 Histologie

<i>DAB Peroxidase Substrat Kit</i>	Fa. Vector Laboratories (Burlingame, USA)
<i>DAPI Antifade Solution</i>	Fa. Millipore (Billerica, USA)
<i>DPX Mountant for histology</i>	Fa. Sigma (München)
Einbettmedium <i>tissue tek</i>	Fa. Sigma (München)
Entellan	Fa. Merck (Darmstadt)

Eosin	Fa. Sigma (Steinheim)
Hämatoxyclin	Fa. Sigma (Steinheim)
Kernechtrot-Aluminiumsulfat	Fa. Waldeck (Münster)
<i>Vectastain ABC Kit</i>	Fa. Vector Laboratories (Burlingame, USA)
<i>Vectashield mounting medium</i>	Fa. Vector Laboratories (Burlingame, USA)

2.1.10 Zellkulturmaterial

DMEM	Fa. Cambrex (Verviers, Belgien)
FCS	Fa. Gibco BRL (Karlsruhe)
L-Glutamin	Fa. Gibco BRL (Karlsruhe)
PBS (-CaCl ₂ , -MgCl ₂)	Fa. Gibco BRL (Karlsruhe)
Penicillin/Streptomycin	Fa. Gibco BRL (Karlsruhe)
Trypsin/EDTA	Fa. Gibco BRL (Karlsruhe)

2.1.11 Tiere

Die verwendeten Tiere stammten entweder aus eigener Zucht oder wurden von der Arbeitsgruppe (AG) Bockkamp (Mainz), der AG Kemmler (Freiburg) bzw. der Firma Jackson Laboratories (Bar Harbor, USA) bezogen. Die Haltung der Tiere erfolgte nach den Maßgaben des Deutschen Tierschutzgesetzes.

Verwendete Mauslinien:

KI-Wt1-tTA (WE2)

Im Falle der Effektorlinie *KI-Wt1-tTA (WE2)* sorgt ein *knock-in* eines tetrazyklinabhängigen Transaktivators (tTA2 aus pUHT61-1; Urlinger *et. al.* 2000) für einen gleichzeitigen *knock-out* von *Wt1*, da durch das Einfügen des Transaktivators Exon 1 und Teile des Introns 1 von *Wt1* deletiert werden (siehe Abb. 2.1). Zudem kommt es durch den endogenen *Wt1*-Promotor zur *Wt1*-analogen Expression des tetrazyklinabhängigen Transaktivators, so dass nachfolgend ohne die Gabe von Doxycylin weitere Transgene mit tetrazyklinabhängigen Promotor aktiviert werden können (*Tet off*-System/siehe Abb. 3.1). Generell sind nur heterozygote Mäuse lebensfähig. Homozygote Individuen sterben etwa an Tag 13,5 *d.p.c.* der Schwangerschaft (Kreidberg *et. al.*, 1993).

Die Effektor-Linie wurde in der AG Zabel im Zuge der Dissertation von Dr. Stephan Fees generiert (Fees 2006). Zur Herstellung benutzte man den Mausinzuchtstamm C57BL/6J.



Abbildung 2.1: Schematische Darstellung des WE2-Transgens

In der Abbildung ist das murine *Wt1*-Gen (mWT1) in grau dargestellt. Im Unterschied zum wildtypischen *Wt1* sind aber Teile des Gens (Exon 1 und Teile von Intron 1) durch einen tetrazyklinabhängigen Transaktivator (tTA) ersetzt worden und führen zu einem *knock-out* von *Wt1*. Dieser tTA ist zu Beginn des Gens in hellgrau erkennbar und wird im Zuge einer *Wt1*-Expression gleichzeitig synthetisiert, was durch den endogenen *Wt1*-Promotor (dunkelgrau; *Wt1*) gewährleistet wird. Dieser liegt vor dem WE2-Lokus.

TetO-Cre (TC)

Der Transgenstamm *TetO-Cre* (TC) trägt ein Cre-Rekombinasegen. Die Expression dieses Enzyms wird von einem tTA-regulierenden Promotor gesteuert (siehe Abb. 2.2). Kommt es zur Bindung des tetrazyklinabhängigen Transaktivators wird die Cre-Rekombinase exprimiert, so dass nachfolgend Reporter-Transgene aktiviert werden können.

Die TC-Mauslinie, welche als erstes von Saam und Kollegen beschrieben und generiert wurde (Saam *et. al.* 1999), bezog man von der AG Bockkamp, wobei der genetische Hintergrund unbekannt ist.



Abbildung 2.2: Schematische Darstellung des TC-Transgens

Die Mauslinie TetO-Cre (TC) enthält einen tetrazyklinabhängigen Promotor (TetO) und ein unter seiner Kontrolle stehendes Cre-Rekombinasegen (Cre).

LC-1 (LC)

Die Mauslinie *LC-1* (LC) besitzt ein Transgen, das aus einem bicistronischen, bidirektionalen Expressionskonstrukt besteht. Dabei wird ein tetrazyklinabhängiger Promotor (TetO) von den Genen der Enzyme Luciferase und Cre-Rekombinase flankiert (siehe Abb. 2.3). Bei Anwesenheit eines tetrazyklinabhängigen Transaktivators kommt es zur Bindung an den TetO-Promotor und somit zur bidirektionalen Expression von beiden Enzymen. Die Luciferase kann mit Hilfe von Chemilumineszenzreaktionen nachgewiesen werden, während die Cre-Rekombinase, wie schon im Falle der *TetO-Cre* Mauslinie (TC) beschrieben, weitere Transgene (Reportergene) aktivieren kann.

Die LC-Mauslinie, welche als erstes von Hasan und Kollegen beschrieben und generiert wurde (Hasan *et. al.* 2001), bezog man von der AG Bockkamp, wobei der genetische Hintergrund unbekannt ist.



Abbildung 2.3: Schematische Darstellung des LC-Transgens

Ein tetrazyklinabhängiger Promotor (TetO) bildet das Kernstück des LC-1 Transgens. Um den Promotor liegen die Gene der beiden Enzyme Luciferase und Cre-Rekombinase (Cre), die bei einer Bindung des tetrazyklinabhängigen Transaktivators (tTA) exprimiert werden.

TetO-EGFP-LacZ (EZ)

Der Transgenstamm *tetO-EGFP-lacZ* (EZ) trägt ein bicistronisches, bidirektionales Expressionskonstrukt (siehe Abb. 2.4). Kernstück des Transgens ist ein tetrazyklinabhängiger Promotor (TetO), der einerseits bei einer Bindung eines tetrazyklinabhängigen Aktivators die Expression eines *EGFP* (*enhanced green fluorescence protein*)-Gens und andererseits eines *LacZ* (*beta-Galaktosidase*)-Gens reguliert. Die Proteine sind nachfolgend durch verschiedene Verfahren (z.B. Immunhistochemie oder X-Gal-Färbungen) visualisierbar und ermöglichen somit den Nachweis der Aktivität von Effektor-Mauslinien, wie z. B. von WE2 (siehe Material und Methoden 2.1.11).

Diese Mauslinie wurde als erstes von Krestel und Kollegen beschrieben (Krestel *et. al.* 2001). Für diese Dissertation erhielt man die EZ-Mäuse von der AG Bockkamp, wobei der genetische Hintergrund der Mäuse unbekannt war.



Abbildung 2.4: Schematische Darstellung des EZ-Transgens

Die Gene *enhanced green fluorescence protein* (EGFP) und *beta-Galaktosidase* (LacZ) flankieren den tetrazyklinabhängigen Promotor (TetO). Kommt es zu einer Bindung eines tetrazyklinabhängigen Transaktivators, werden die Proteine EGFP und beta-Galaktosidase exprimiert und deren Nachweis ist durch verschiedene Methoden möglich.

KI-Vh1h-F1 (V1ko)

Das murine *von Hippel-Lindau syndrom homolog* (*Vh1h*) besteht aus 3 Exons. Im Falle des *knock-in* Stammes *KI-Vh1h-F1* (V1ko) wurden um das erste Exon des *Vh1h*-Gens zusätzlich zwei sogenannte *locus of crossing-over of P1-sides* (*loxP*) eingefügt (siehe Abb. 2.5). Durch eine Verpaarung mit Mäusen, die das Transgen einer Cre-Rekombinase in sich tragen, kann es durch die Expression dieses Enzyms zur Exzision dieser *loxP*-sites im *Vh1h*-Gen kommen. Dies hat zur Folge, dass bei einer *Vh1h*-Expression dieses Protein nicht mehr abgebaut werden kann und ein

möglicher Effekt in den transgenen Mäusen zu beobachten ist. Generell wird die Expression des Transgens durch den wildtypischen *Vhlh*-Promotor gesteuert.

Der Mausstamm wurde kommerziell von der Firma Jackson Laboratories (Bar Harbor, U.S.A) bezogen und als erstes von Haase und Kollegen beschrieben (Haase *et. al.* 2001).

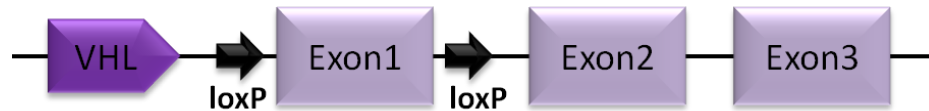


Abbildung 2.5: Schematische Darstellung des V1ko-Transgens

Um das erste Exon des *Vhlh*-Gens wurden zwei sogenannte *locus of crossing-over of P1-sides (loxP)* eingefügt, die durch eine Cre-Rekombinase exzidiert werden können. Außer den eingefügten *loxP*-sites bleibt beim *knock-in* (KI) dieses Transgens der *Vhlh*-Lokus aber unverändert, so dass der *Vhlh*-Promotor (VHL) und das zweite bzw. dritte Exon des Gens ihren wildtypischen Charakter behalten.

KI-Rosa26 (RR)

Beim *knock-in* (KI) Stamm *KI-Rosa26* (RR) wurde unterhalb des *Rosa26*-Promotors eine mit *locus of crossing-over of P1-sides (loxP)* flankierte Neomycin-Resistenz-Kassette und das *Rosa26 (lacZ) (beta-Galaktosidase)*-Gen eingefügt (siehe Abb 2.6). Durch eine Verpaarung mit Mäusen, die das Transgen einer Cre-Rekombinase in sich tragen, kann es durch die Expression dieses Enzyms zur Exzision der *loxP*-sites kommen. Dadurch gelangt das *Rosa26 (lacZ)*-Gen unter die transkriptionelle Kontrolle des konstitutiv exprimierten *Rosa26*-Promotors, wodurch nachfolgend das Enzym beta-Galaktosidase exprimiert wird. Durch verschiedene histologische Methoden kann die Aktivität dieses Enzyms nachgewiesen werden und ist somit zur Kontrolle der Induktion von Cre-Rekombinase Mausstämmen geeignet.

Die *KI-Rosa26* Mauslinie wurde 1999 als erstes von Soriano und Kollegen beschrieben (Soriano *et. al.* 1999) und von der AG Bockkamp bezogen. Sie besitzt einen genetischen Hintergrund, der auf dem Mausinzuchtstamm C57BL/6J beruht.

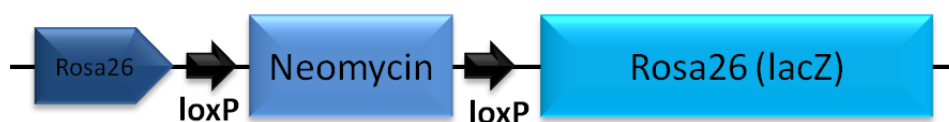


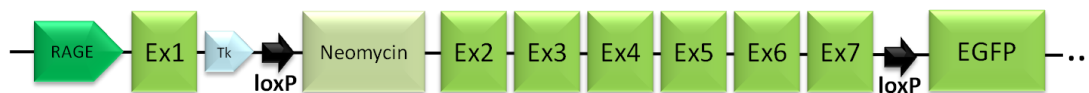
Abbildung 2.6: Schematische Darstellung des RR-Transgens

Beim *knock-in* (KI) der *KI-Rosa26* Mauslinie wird unterhalb des *Rosa26*-Promotors (*Rosa26*) ein *beta-Galaktosidase (Rosa26(lacZ))*-Gen und eine mit *locus of crossing-over of P1-sides (loxP)* flankierte Neomycin-Resistenz-Kassette (Neomycin) eingefügt. Diese kann durch die Expression einer Cre-Rekombinase exzidiert werden. Nachfolgend kommt es zur Expression des Enzyms beta-Galaktosidase.

RAGE (RG)

Das *RAGE* (*receptor for advanced glycated end products*)-Gen besteht aus sieben Exons. Im Falle der *knock-in* Mauslinie *RAGE* fügte man zwischen Exon 1 und 2 eine Neomycin-Resistenz-Kassette ein, die unter Kontrolle eines *HSV Thymidinkinase*-Promotors (Tk) steht (siehe Abb. 2.7). Nachfolgend wurde zwischen dem Tk-Promotor und der Neomycin-Resistenz-Kassette, genauso wie hinter Exon 7, eine *locus of crossing-over of P1-side* (*loxP*) einkloniert. Zudem wurde hinter der *loxP*-side von Exon 7 ein *EGFP* (*enhanced green fluorescence protein*)-Gen eingefügt. Durch eine Verpaarung mit Mäusen, die das Transgen einer Cre-Rekombinase in sich tragen, kann es durch die Expression dieses Enzyms zur Exzision der *loxP*-sides kommen, wodurch neben der Neomycin-Resistenz-Kassette auch die Exons 2 bis 7 entfernt werden. Nachfolgend gelangt das *EGFP*-Gen unter die transkriptionelle Kontrolle des konstitutiv exprimierten Tk-Promotors, so dass anschließend EGFP exprimiert wird. Generell ist EGFP durch verschiedene histologische Methoden (z.B. Immunfluoreszenz-Färbungen) nachweisbar, so dass die *RAGE*-Mauslinie gut zur Kontrolle der Induzierbarkeit von Cre-Rekombinase Mausstämmen geeignet ist.

Die *RAGE*-Mäuse wurden von der AG Bockkamp bezogen und zum ersten Mal von Constien und Kollegen beschrieben (Constien *et. al.* 2001).

**Abbildung 2.7: Schematische Darstellung des RG-Transgens**

Beim *knock-in* der Mauslinie *RAGE* (RG) wurde ein *HSV Thymidinkinase* (Tk)-Promotor, eine Neomycin-Resistenz-Kassette (Neomycin) und das *enhanced green fluorescence protein* (EGFP)-Gen in das *RAGE* (*receptor for advanced glycated end products*)-Gen eingefügt. Zusätzlich klonierte man zwischen dem Tk-Promotor und der Neomycin-Resistenz-Kassette (zwischen Exon 1 und 2), sowie den Exons 7 und 8 eine *locus of crossing-over of P1-side* (*loxP*) ein. Durch eine Cre-Rekombinase werden die *loxP*-sides exzidiert und die Neomycin-Resistenz-Kassette zusammen mit Exon 2 bis 7 aus dem *RAGE*-Gen entfernt. Somit gelangt das *EGFP*-Gen unter die Kontrolle des Tk-Promotors und kann nachfolgend exprimiert werden.

 β Cat-Flox-Ex3 (bCat Δ Ex3)

Das murine *Ctnnb1* (*Catenin, cadherin-associated protein, beta1*) besteht aus 15 Exons. Im Falle der Generierung der β Cat-Flox-Ex3 (bCat Δ Ex3)-Mauslinie wurden dabei um das dritte Exon *locus of crossing-over of P1-sides* (*loxP*) eingefügt und das wildtypische *Ctnnb1*-Allel durch einen *knock-in* ersetzt. Durch eine Verpaarung mit Mäusen, die das Transgen einer Cre-Rekombinase in sich tragen, kann es durch die Expression dieses Enzyms zur Exzision der *loxP*-sides kommen, wodurch das dritte Exon des Transgens entfernt wird (siehe Abb. 2.8). Somit kann das mutierte Protein im Falle einer *Ctnnb1*-Expression nicht mehr abgebaut werden, so dass in Mäusen mögliche Effekt beobachtet werden können.

Die Mäuse wurden von der AG Kemmler bezogen, wobei der genetische Hintergrund unbekannt ist. Beschrieben und generiert wurde diese Mauslinie von Harada und Kollegen (Harada *et. al.* 1999).



Abbildung 2.8: Schematische Darstellung des bCat Δ Ex3-Transgens

Um das dritte Exon des *Ctnnb1*-Gens liegen zwei sogenannte *locus of crossing-over of P1-sides* (*loxP*), die durch eine Cre-Rekombinase exzidiert werden können. Dadurch ist im Falle einer Expression von *Ctnnb1* ein Abbau des Proteins nicht mehr möglich. Außer den eingefügten *loxP*-sites bleibt beim *knock-in* dieses Transgens der *Ctnnb1*-Lokus unverändert, so dass der *Ctnnb1*-Promotor (Ctnnb1) und die weiteren Exons des Gens ihren wildtypischen Charakter behalten.

TetO-Wnt1 (Wnt1)

Der Transgenstamm *TetO-Wnt1* (Wnt1) trägt neben dem murinen *Wnt1*-Gen auch ein *Luciferase*-Gen in seinem Genom (siehe Abb. 2.9). Beide Gene werden von einem tetrazyklinabhängigen Promotor (TetO) reguliert, der das Kernstück dieses bicistronischen, bidirektionalen Transgenkonstrukts bildet. Durch eine Verpaarung mit Mäusen, die einen tetrazyklinabhängigen Transaktivator exprimieren, können nachfolgend die Proteine Luciferase und Wnt1 exprimiert werden. Während die Luciferase durch Chemilumineszenz-Reaktionen nachgewiesen werden kann und eher zur Überprüfung der Induzierbarkeit von Effektorlinien (z.B. WE2) dient, können durch eine Wnt1-Überexpression gegebenenfalls Effekte bei Mäusen beobachtet werden.

Der genetische Hintergrund dieses Transgenstammes ist unbekannt und wurde von der AG Bockkamp generiert und bezogen.

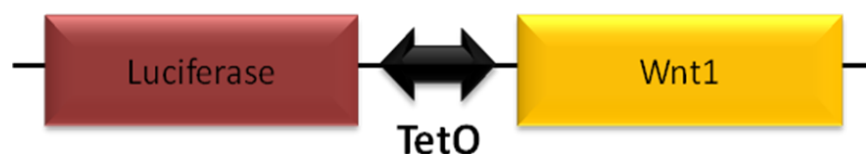


Abbildung 2.9: Schematische Darstellung des Wnt1-Transgens

Der Transgenstamm *TetO-Wnt1* besitzt ein bicistronisches, bidirektionales Expressionskonstrukt. Das Kernstück dieses Transgens bildet ein tetrazyklinabhängiger Promotor (TetO), der die Transkription der Gene *Luciferase* und *Wnt1* reguliert.

mWt1/DDS-2 bzw. *mWt1/DDS4* (DDS2/DDS4)

Die beiden Mauslinien *mWt1/DDS-2* bzw. *mWt1/DDS4* (DDS2/DDS4) wurden im Zuge ihrer Generierung aus zwei unterschiedlichen Klonen gewonnen. Davon abgesehen weisen sie keine Unterschiede auf, so dass im Folgenden nur die DDS2-Mauslinie beschrieben wird.

Der Transgenstamm DDS2 besitzt ein bicistronisches, bidirektionales Expressionskonstrukt (siehe Abb. 2.10). Das Kernstück dieses Transgens bildet ein tetrazyklinabhängiger Promotor (TetO), der die Transkription von *EGFP* (*enhanced green fluorescence protein*) und einen punktmutiertes murines *Wt1*-Gen reguliert. Durch diese Punktmutation kommt es zu einem Aminosäureaustausch von Arginin zu Glutamin an Position 394 (R394Q). Diese Mutation wurde 1999 von Miyagawa und Kollegen in einem Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML) und Denys-Drash-Syndrom (DDS) beschrieben (Miyagawa *et. al.* 1999). Bindet nun ein tetrazyklinabhängiger Transaktivator an den TetO-Promotor der DDS2-Mauslinie kommt es zur bidirektionalen Expression von EGFP und dem punktmutierten *Wt1*, so dass mit Hilfe dieses Transgens möglicherweise ein dominant-negativer Effekt auf wildtypisches *Wt1* ausgeübt werden kann und ein Wilms-Tumor entsteht.

Die *mWt1/DDS2* (DDS2) Mauslinie wurde in unserer Arbeitsgruppe im Zuge der Dissertation von Dr. Stephan Fees generiert (Fees 2006). Zur Herstellung benutzte man den Mausinzuchtstamm FVB.

**Abbildung 2.10: Schematisch Darstellung des DDS2-Transgens**

Der Transgenstamm *mWt1/DDS2* besitzt ein bicistronisches, bidirektionales Expressionskonstrukt. Das Kernstück dieses Transgens bildet ein tetrazyklinabhängiger Promotor (TetO), der die Transkription von *enhanced green fluorescence protein* (EGFP) und einem punktmutierten, murinen *Wt1* (*mWt1/DDS2*) reguliert. Durch die *Wt1*-Punktmutation kommt es zu einem Aminosäureaustausch von Arginin zu Glutamin an Position 394 (R394Q). Diese Stelle ist in der Abbildung durch einen roten Stern gekennzeichnet.

2.1.12 Geräte

Agarose-Gelelektrophorese	- Gel-Kammer (verschiedene Größen) mit Gelträger und passenden Gelkammern; Fa. Peqlab (Erlangen)
Autoklav	- Typ V150; Fa. Synstec (Osnabrück)
Bestrahlungstrommel	- Fa. Schlenker Maschinenbau (Sexau)
Binokulare	- SZ-ST; Fa. Olympus (Hamburg) - SZH10; Fa. Olympus (Hamburg)

Brutschränke 37°C	- Fa. Heraeus (Hanau) - Certomat R; Fa. Braun (Melsungen)
Cäsium-Quelle	- IBL 637; Fa. CIS bio international (Berlin)
CO ₂ Inkubatorschrank	- HERAcell 240; Fa. Heraeus (Hanau)
Einbettmaschine (Paraffin)	- Leica EG1140H; Fa. Leica (Solms)
Entwicklermaschine	- Fa. AGFA (Mortsel, Belgien)
FACS-Gerät	- FACSCalibur; Fa. BD Biosciences (Heidelberg)
Gefrierschränke -20°C	- Fa. Bosch (Wien, Österreich)
Geldokumentation	- E.A.S.Y. System; Fa. Herolab (Wiesloch)
Heizblock	- MR 2002; Fa. Heidolph (Schwalbach)
Inkubationsofen (Histologie)	- T 5042 E; Fa. Heraeus (Hanau)
Kryotom	- 1720; Fa. Leica (Wetzlar)
Kühlschränke 4°C	- economic-cooler automatic; Fa. Bosch (Wien)
Laborwaagen	- LC 2201; Fa. Sartorius (Göttingen) - Extend ED 2202S-CW; Fa. Sartorius (Göttingen) - LC 2201S, Fa. Sartorius (Göttingen)
Labor-Feinwaagen	- BA110; Fa. Sartorius (Göttingen) - Sartorius basic; Fa. Sartorius (Göttingen)
Magnetrührer	- RCO; Fa. IKA Labortechnik (Stauffen) - MR 3001 K; Fa. Heidolph (Schwalbach) - VMS-A; Fa. VWR (Darmstadt)
Mikroskope	- Eclipse TS100; Fa. Nikon (Tokio, Japan) - Fa. Zeiss (Jena) - Leica DMRXA; Fa. Leica (Wetzlar) - BX50WI; Fa. Olympus (Hamburg)
Mikroskopkamera	- EC 3; Fa. Leica Microsystems (Heerbrugg)
Mikrotom	- Leica RM 2165; Fa. Leica (Solms)
Mikrowellengeräte	- Fa. Siemens (München) - NN-E245W; Fa. Panasonic (Hamburg)
Nanodrop	- Spectrophotometer ND-1000; Fa. Peqlab (Erlangen)

Netzgeräte	- EPS 300; Fa. Pharmacia (Uppsala, Schweden) - E861; Fa. Consort (Turnhout, Belgien) - Power Pac HC; Fa. Biorad (München)
pH-Meter	- CG840; Fa. Schott (Mainz) - Lab 850; Fa. Schott (Mainz)
PCR-Geräte	- UNO II 96-Silberblock; Fa. Biometria (Göttingen) - Trio-Thermoblock; Fa. Biometria (Göttingen) - PTC-200; Fa. MJ Research (St.Bruno, Kanada) - Mastercycler gradient; Fa. Eppendorf (Hamburg) - Thermal Cycler; Fa. Biometria (Göttingen) - T-Gradient; Fa. Biometria (Göttingen)
Photometer	- Ultrospec 2000; Fa. Pharmacia (Uppsala, Schweden)
Pipetten	- Reference; Fa. Eppendorf (Hamburg)
qPCR-Geräte	- C1000 ThermalCycler CFX 96; Fa. Biorad (München) - C1000 ThermalCycler CFX384; Fa. Biorad (München) - Light Cycler 1.5; Fa. Roche (Mannheim)
Rotator	- Labinco `528`; Fa. Bachofer (Reutlingen)
Sterilbänke	- Antair BSK; Fa. M.Hoffmann (Stade) - Laminar Flow Workstation; Fa. SLEE (Mainz)
Tank- <i>blotting</i> -Apparatur	- Fa. Biorad (München)
Thermomixer	- Thermomixer 5436; Fa. Eppendorf (Hamburg) - Comfort 1,5 ml; Fa. Eppendorf (Hamburg) - CH-100; Fa. Peqlab (Erlangen) - Dri-block 08-3; Fa. Techne (Morauce en Beaujolais, Frankreich)
Taumeltische	- WT12; Fa. Biometria (Göttingen) - Duomax 1030; Fa. Heidolph (Schwalbach) - REAX 2; Fa. Heidolph (Schwalbach) - WT12; Fa. Biometria (Göttingen)
Tiefkühlgefrierkombinationen	- electronic; Fa. Bosch (Wien, Österreich) - Fa. Dometic (Siegen) - Fa. Liebherr (Lindau) - Fa. Siemens (München)
Tiefkühlgefrierschränke -30°C	- Fa. Liebherr (Lindau)
Tiefkühlgefrierschränke -80°C	- HERA freeze; Fa. Heraeus (Hanau)
Trockenschrank	- Fa. Heraeus (Hanau)
Ultraschallgerät	- HTU SONI130; Fa. Heinemann (Schwäbisch Gmünd)

Ultra-Turrax	- T25; Fa. Janke und Kunkel (Stauffen)
UV-Tische	- Fa. AGS (Heidelberg) - Fa. Peqlab (Erlangen)
Vakuumtrockner	- UNIJET II; Fa. Uniequip(Planegg)
Vortexer	- REAX 2000; Fa. Heidolph (Schwalbach) - Art. Nr. 444-1372; Fa. VWR (Darmstadt) - MS1 Minishaker, Fa. Miltenyi (Bergisch Gladbach)
Wasserbäder	- Köttermann Labortechnik (Uetze) - Certomat WR; b.Braun Biotech (Göttingen) - 1002; Fa. GFL (Eppelheim) - MS2 S8 Minishaker; Fa. IKA Works (Staufen) - Leica HI 1210; Fa. Leica (Solms)
Western blot-Apparatur	- Fa. Biorad (München)
Zellkulturinkubatoren	- HERA safe type KS12; Fa. Heraeus (Hanau) - HERA cell 240; Fa. Heraeus (Hanau)
Zentrifugen	- Fresco21; Fa. Heraeus (Hanau) - Biofuge fresco; Fa. Heraeus (Hanau) - Cetrifuge 5415C; Fa. Eppendorf (Hamburg) - Galaxy Mini; Fa. VWR (Darmstadt) - Z233 MK-2; Fa. Hermle (Wehingen) - Multifuge 3S-R; Heraeus (Hanau) - Megafugr 1.0; Fa. Heraeus (Hanau) - 5417 R; Fa. Eppendorf (Hamburg) - Sorvali RT 6000 B; Fa. DuPont (Lahr)

2.1.13 Oligonukleotidsequenzen

Alle Oligonukleotide wurden von der Fa. Metabion (Planegg-Martinsried) bezogen.

Oligonukleotide zur Charakterisierung und Genotypisierung der Mäuse:

βCAT-Ex2S	5'-GAC ACC GCT GCG TGG ACA ATG-3'
βCAT-Ex3AS	5'-GTG GCT GAC AGC AGC TTT TCT-3'
CRE-1	5'-CCG GTT ATT CAA CTT GCA CC-3'
CRE-2	5'-CTG CAT TAC CGG TCG ATG CAA C-3'
EGFP fw	5'-CTG AAG TTC ATC TGC ACC ACC-3'
EGFP rev	5'-CGT TCT TCT GCT TGT CGG CC-3'
hGFP/lacZ-12	5'-CAG GGC CGT CGC CGA TTG G-3'
hGFP/lacZ-13	5'-GCG GAG AGG GTG AAG GTG ATG C-3'

Luc1	5'-CGC CAA AAA CAT AAA GAA AGG C-3'
Luc2	5'-TGT CCC TAT CGA AGG ACT CTG G-3'
LUC-1 FOR	5'-TTT TCC GTC ATC GTC TTT CC-3'
LUC-1 REV	5'-TTC TTC GCC AAA AGC ACT CT-3'
ROSA 26-1	5'-AAA GTC GCT CTG AGT TGT TAT-3'
ROSA 26-2	5'-GCG AAG AGT TTG TCC TCA ACC-3'
ROSA 26-3	5'-GGA GCG GGA GAA ATG GAT ATG-3'
tTA for 1	5'-CCA TGT CTA GAC TGG ACA-3'
tTA rev 6	5'-GGC TGG GAG CAT GTC TAA-3'
tTA-for (62.1)	5'-CCA TGT CTA GAC TGG ACA AGA G-3'
tTA-rev (62.1)	5'-CAT AGA ATC GGT GGT AGG TGT C-3'
WE2F	5'-AAG TCC AGC GCC GAG AAT3'
WE2R1	5'-CTT ACC TTG GTT GCG GAT GC-3'
WE2R2	5'-GCT TGT TCT TCA CGT GCC AGT-3'
Wt1-LC F2	5'-CTT CCG AGG CAT TCA GGA T-3'
Wt1-LC R2	5'-CTG GAA TGG TTT CAC ACC TG-3'

Oligonukleotide für RT-PCR:

mus PdhB-Ex8F	5'-GAC CGC CTT TGC CTA CAG AT-3'
mus PdhB-Ex10R	5'-GCC CAT CAA GGA AGT TGA AT-3'
mWT1-RT F.2	5'-GGT GGC ACA GTT GTC AGA AA-3'
pBl-6	5'-AGA TGC TCA AGG GGC TTC AT-3'
Oligo (dT) ₁₆	5'-TTT TTT TTT TTT TTT T-3'
tTA-for (62.1)	5'-CCA TGT CTA GAC TGG ACA AGA G-3'
tTA-rev (62.1)	5'-CAT AGA ATC GGT GGT AGG TGT C-3'

2.2 DNA-Standardmethoden

2.2.1 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die aromatischen Ringe der Pyrimidin- und Purin-Basen von Nukleinsäuren haben ein Absorptionsmaximum von 255 – 260 nm. Diese Eigenschaft kann man zur photometrischen Konzentrationsbestimmung von Lösungen mit Hilfe des Lambert-Beer Gesetzes nutzen. Generell muss dazu der Absorptions-Wert der Proben mit dem von reinem Wasser verglichen werden. Ein OD₂₆₀-Wert von 1 entspricht hierbei ca. 50 µg/ml doppelsträngiger DNA bzw. ca. 40 µg/ml RNA. Zudem kann man durch eine zusätzliche Messung der Absorption bei 280 nm

die Verunreinigung der Proben durch Proteine feststellen. Der Quotient aus den OD₂₆₀- und OD₂₈₀-Werten sollte dabei bei 1,8 bis 2,0 liegen.

Generell führte man die Konzentrationsbestimmung von RNA und DNA mit einer 1:100 Verdünnung durch, indem man 5 µl der RNA- oder DNA-Probe zu 495 µl destilliertem Wasser hinzufügte. Die jeweiligen Verdünnungen wurden dabei in Quarz-Glasküvetten zur Messung im Photometer angesetzt. Als Leerwert diente eine vorangegangene Messung mit 495 µl destilliertem Wasser.

2.2.2 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Die Aufreinigung von DNA-Proben wurde durchgeführt, um die Proben von Verunreinigungen wie Proteinen oder Enzymen zu befreien. Dazu wurde den DNA-Proben eine Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)-Lösung hinzugefügt, die dem Volumen der DNA-Probe entsprach. Anschließend wurde die Probe für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und nachfolgend für 2 Minuten bei Raumtemperatur und 13000 rpm zentrifugiert. Die Oberphase mit der enthaltenen DNA wurde in ein neues 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß überführt und durch Zugabe des gleichen Volumens Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) ergänzt. Nach kurzem Vortexen und einer Inkubation von 10 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Probe ein weiteres Mal für 2 Minuten bei 13000 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert. Wiederum überführte man die Oberphase mit der beinhalteten DNA in ein neues 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß und gab dazu 2,5 Volumenteile 100 % Ethanol und 1/10 Volumenteile 3 M Natriumacetat, wodurch die DNA gefällt wurde. Anschließend wurde die Probe gevortext und für 45 Minuten bei 4°C und 13000 rpm zentrifugiert. Nachfolgend verwarf man den Überstand, gab 500 µl 70 % Ethanol hinzu und zentrifugierte die Probe für 10 Minuten bei 4°C und 13000 rpm. Nach diesem Waschschrift wurde der Überstand verworfen und das zurückbleibende DNA-Pellet im Vakuumtrockner getrocknet. Zum Schluss wurde die DNA in 10 µl 1x TE-Puffer resuspendiert.

2.2.3 Fällung von DNA

Die Fällung von DNA wurde durchgeführt, um eine höhere Konzentration an DNA für nachfolgende Analysen zu erhalten. Dazu wurde die gelöste DNA durch Zugabe von 1/10 Volumenteilen 3 M Natriumacetat und 3 Volumenteilen 100 % Ethanol 30 Minuten bei Raumtemperatur und maximaler Geschwindigkeit in der Zentrifuge gefällt. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das DNA-Pellet nach der Zugabe von 1 ml 70 % Ethanol 10 Minuten bei 13000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Nach diesem Waschschrift und

anschließendem Trocken im Vakuumtrockner wurde das Pellet je nach Größe in 50 - 500 µl 0,1x TE aufgenommen.

2.2.4 Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente können auf Grund ihrer negativen Ladung im elektrischen Feld nach Größe aufgetrennt werden. Je nach Agarosekonzentration wird dabei in horizontalen Gelen eine Auftrennung von Fragmente einer Größe von 75 bp bis 15 kb möglich. In der Regel wurden 1 % Agarosegele verwendet. Dazu kochte man z. B. für ein mittelgroßes Gel 1 g Agarose in 100 ml 1x TBE-Lösung auf. Nachdem sich die Agarose im kochenden Puffer gelöst hatte, wurde sie in einer Plexiglaskammer mit einem oder zwei „*sample well*“-Kämmen ausgegossen, damit sie polymerisieren konnte. Das polymerisierte Gel wurde anschließend in eine mit 1x TBE-Lösung gefüllte Gelelektrophoresekammer gelegt und die Kämmen vorsichtig aus dem Gel gezogen.

Auf das vorbereitete Gel konnten anschließend je 20 µl pro DNA-Probe aufgetragen werden. Dazu waren die Proben im Vorfeld durch eine Zugabe von 1/6 Volumen DNA-Ladepuffer erschwert worden, wodurch eine Diffusion der Proben aus den Taschen verhindert werden sollte. Je nach erwarteter DNA-Fragmentgröße trug man zusätzlich 6 µl eines 100 bp bzw. 1 kb Leiters (Fa. Invitrogen) auf, um eine Größenabschätzung der Fragmente zu gewährleisten. Anschließend konnte die Gelelektrophorese bei einer gleichbleibenden Spannung von 50 – 120 V für 1 – 2 Stunden gestartet werden.

Nach ausreichender Auftrennung wurde das Gel für 10 Minuten in ein Färbebad mit Ethidiumbromid (5 µg/ml) überführt. Ethidiumbromid interkaliert in Nukleinsäuren, so dass diese unter UV-Licht visualisiert werden können. Nach dem Färben der DNA wurde das Gel für 20 Minuten in destilliertem Wasser entfärbt. Abschließend visualisierte man die DNA-Fragmente mit Hilfe eines UV-Transilluminators bei $\lambda = 312$ nm und dokumentierte sie mittels des „Herolab E.A.S.Y“-Videosystems.

2.3 RNA-Standardmethoden

2.3.1 Isolierung von RNA aus murinen Gewebe

Zur Isolation von RNA aus murinem Gewebe wurden die Proben zunächst aus der Lagerung bei -80°C in flüssigen Stickstoff überführt. Anschließend schnitt man mit Hilfe eines Skalpell ein Stück der Gewebeprobe (je 50 bis 100 mg) ab, gab es in 15 ml Schnappdeckelröhrchen mit 1 ml Trizol und homogenisierte sie für ~ 30 Sekunden mit einem Ultra-Turrax T25 (Fa. Janke und

Kunkel). Zwischen den einzelnen Proben wurde der Ultra Turrax durch einmaliges Eintauchen in 0,1 M NaOH (40 ml in 50 ml PP-Röhrchen) und zweimaliges Eintauchen in destilliertes Wasser (40 ml in 50 ml PP-Röhrchen) gesäubert.

Nachdem alle Proben homogenisiert waren, wurden sie in 2 ml Eppendorfreaktionsgefäße überführt und für 10 Minuten bei 4°C und 13000 rpm zentrifugiert. Den Überstand pipettierte man in neue 2 ml Eppendorfreaktionsgefäße und gab 200 µl Chloroform hinzu. Nachdem die Proben für 15 Sekunden invertiert worden waren, ließ man sie für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren, um sie anschließend für 15 Minuten bei 4°C und 13000 rpm zu zentrifugieren. Die Oberphase wurde im Anschluss in neue 2 ml Eppendorfreaktionsgefäße überführt und die RNA durch Zugabe von 500 µl Isopropanol gefällt. Wiederum ließ man die Proben nach einer 15-sekündigen Invertierung 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren. Nach einer 10-minütigen Zentrifugation bei 4°C und 13000 rpm wurde der Überstand verworfen und 1 ml 70 % Ethanol auf das zurückbleibende RNA-Pellet pipettiert. Im Anschluss zentrifugierte man die Proben für 10 Minuten bei 13000 rpm und 4°C, um nach diesem Waschschrift den Überstand zu verwerfen und das Pellet unter dem Abzug auf Eis zu trocknen. Abschließend wurde die RNA je nach Größe der Pellets in 70 – 140 µl destilliertem Wasser resuspendiert.

Die somit gewonnenen RNA-Proben konnten bis zum weiteren Gebrauch bei –80°C gelagert werden oder man schrieb sie sofort nach Entfernung der genomischen DNA in cDNA um (siehe Material und Methoden 2.3.2 bzw. 2.4.2).

2.3.2 Entfernung genomischer DNA aus RNA-Präparationen

Bevor man die isolierte RNA in cDNA (reverse Transkriptions (RT)-PCR) umschreiben konnte (siehe Material und Methoden 2.4.2), musste man durch einen DNaseI-Verdau die genomische DNA entfernen (Sambrook *et. al.* 1989). Ohne diesen Schritt könnten nachfolgende Expressionsanalysen verfälscht werden. Zu diesem Zweck wurde folgender 100 µl-Ansatz pro Probe angesetzt und für 1 Stunde bei 37°C in einem Heizblock inkubiert:

10 µl	10x DNase-Puffer (10 mM)
2 µl	RNAse Inhibitor (40 Units)
10 µl	10x TE
8 µl	Rnase-freie DNaseI (150 Units)
70 µl	isolierte RNA

Die anschließende Aufreinigung erfolgte genau nach den Angaben des *RNeasy Mini Kits* (Qiagen). Abschließend wurde die RNA in 40 µl RNase-freiem Wasser eluiert und die RNA-Konzentration photometrisch bestimmt (siehe Material und Methoden 2.2.1).

2.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)-Techniken

2.4.1 Standard-Polymerase Chain-Reaction (PCR)

Durch die PCR können DNA-Bereiche enzymatisch amplifiziert werden. In der vorliegenden Dissertation wurde die PCR nach der Methode von Saiki und Kollegen (Saiki *et. al.*, 1988) durchgeführt. Dabei laufen folgende Schritte ab:

Zunächst lagern sich nach der Denaturierung der DNA-Doppelstränge (Schritt 1) zwei zuvor synthetisch hergestellte Oligonukleotide (*Primer*) in einer sogenannten *Annealing*-Phase (Schritt 2) an die Matrizen-DNA an. Mit Hilfe einer hitzestabilen *Taq*-Polymerase (isoliert aus dem Bakterium *Thermophilus aquaticus*) und Nukleotiden (dNTPs) werden von den Primern ausgehend die Einzelstränge zu Doppelsträngen aufgefüllt. Dieser Schritt wird als Elongation (Schritt 3) bezeichnet. Um insgesamt eine entsprechende Menge an amplifizierter DNA zu erhalten, müssen die zuvor beschriebenen Schritte (Schritt 1 - 3) mehrere Male (Zyklen) wiederholt werden. Somit kommt es zu einer exponentiellen Vervielfältigung der ursprünglich eingesetzten Matrizen-DNA, da die neusynthetisierten DNA-Fragmente als Vorlage im nächsten Zyklus dienen. Generell variiert die Dauer der PCR nicht nur nach Anzahl der wiederholten Zyklen, sondern auch nach Länge und Qualität der DNA.

Für die Durchführung einer PCR setzte man in der vorliegenden Dissertation in der Regel eine 50 µl-Reaktion in 0,5 µl Eppendorfreaktionsgefäßen wie folgt an:

5 µl	10x PCR-Puffer	
5 µl	dNTPs	(je 1,25 mM)
1 µl	<i>Taq</i> -DNAPolymerase	(1 Unit/µl)
1 µl	5' Primer	(10 pmol/µl)
1 µl	3' Primer	(10 pmol/µl)
1 µl	DNA	(10 – 500 ng)
ad.	50 µl destilliertes Wasser	

Nachfolgend wurde die PCR in einem Thermocycler nach folgendem Standardprogramm durchgeführt:

1) Initiale Denaturierung	5 min.	95°C
2) Denaturierung	1 min.	95°C
3) Annealing	1 min.	60 – 65°C
4) Elongation	1 min.	72°C
(Wiederholung 2) bis 4) für 24 - 35 Zyklen)		
5) Finale Elongation	7 min.	72°C
6) Abkühlung	∞	4°C

Abschließend wurden 20 µl der amplifizierten DNA mit 3 µl DNA-Ladepuffer beschwert und auf ein 1 – 2 % Agarose-Gel aufgetragen, um nach einer Gelelektrophorese die PCR zu analysieren und zu überprüfen.

2.4.2 Reverse Transkriptions (RT)-PCR

Mit Hilfe der RT-PCR kann nach der Isolation, dem DNase-Verdau, der Aufreinigung und der photometrischen Konzentrationsbestimmung (siehe Material und Methoden 2.3.1, 2.3.2 und 2.2.1), die RNA zu cDNA umgeschrieben werden. Dazu wurden je nach Möglichkeit 4 µg RNA zu einem Gesamtvolumen von 16 µl mit RNase-freiem Wasser aufgefüllt. Nach 10-minütiger Denaturierung bei 70°C im Thermocycler wurden die Proben auf Eis gelagert und ihnen im Anschluss 22,5 µl cDNA-Synthesemix zuzugeben. Der cDNA-Synthesemix war dabei folgendermaßen zusammengesetzt:

8 µl	5x <i>first strand buffer</i>
5 µl	Oligo (dT) ₁₆ (50 µM)
3,5 µl	dNTPs (10 mM je dNTP)
2 µl	RNase Inhibitor (20 U/µl)
4 µl	DTT (0,1 M)
1,5 µl	M-MLV Reverse Transkriptase (200 U/µl)

Der 5x *first strand buffer*, die dNTPs, das DTT und die M-MLV Reverse Transkriptase wurden dabei aus dem *M-MLV RT Kit* (Fa. Invitrogen) verwendet und wie in der Anleitung beschrieben eingesetzt. Nach Zugabe dieser cDNA-Synthesemixes wurde die Erststrangsynthese für 90 Minuten bei 37°C im Thermocycler durchgeführt. Abschließend erfolgte die Inaktivierung der M-MLV reversen Transkriptase durch eine Inkubation der Reaktionsansätze für 10 Minuten bei 95°C.

Zur Herstellung der Negativkontrollen wurde pro revers transkribierter RNA ein Ansatz ohne Enzym (Volumen durch RNase-freies Wasser ersetzt) erstellt und genauso behandelt wie die Proben mit reverser Transkriptase.

2.4.3 Semiquantitative PCR

Bevor man eine semiquantitative PCR durchführte, musste zunächst von den zu untersuchenden Proben RNA isoliert werden (siehe Material und Methoden 2.3.1), um diese im Anschluss in cDNA durch eine RT-PCR umzuschreiben (siehe Material und Methoden 2.4.2). Durch die Wahl von spezifischen cDNA-Primern konnte man in einer anschließend durchgeführten semiquantitativen PCR die Expression von verschiedenen Genen auf RNA-Ebene untersuchen. Die semiquantitative PCR entsprach dabei in der Theorie und der Durchführung einer Standard-PCR (siehe Material und Methoden 2.4.1), wobei der einzige Unterschied ist, dass die zu untersuchende DNA nicht genomischen Ursprungs, sondern cDNA war. Zudem wurde durch eine Verringerung oder Steigerung der Zyklenzahl nach den besten Bedingungen gesucht, um unterschiedliche Genexpressionen der Proben nachzuweisen. Die Banden detektierte man nach dem Auftragen der Proben auf ein Agarosegel und der Durchführung einer Agarose-Gelelektrophorese (siehe Material und Methoden 2.2.4) durch Ethidiumbromid-Färbung auf einem UV-Tisch. Zum Abschluss folgte die Dokumentation der Ergebnisse.

2.5 Arbeiten mit Proteinen

2.5.1 Isolierung von Proteinen aus murinen Gewebe

Bevor man mit der Isolation der Proteine aus murinen Gewebestücken beginnen konnte, mussten diese zunächst von der Lagerung bei -80°C in flüssigen Stickstoff überführt werden. Anschließend wurde mit Hilfe eines Skalpells ein kleines Stück (50 bis 100 mg) des jeweils zu untersuchenden Gewebes abgeschnitten und in 15 ml PP-Röhrchen mit 1 ml RIPA-Puffer überführt. Die Proben mussten ab diesem Zeitpunkt immer auf Eis gelagert werden.

Im Anschluss homogenisierte man die zu untersuchenden Gewebe für ca. 30 Sekunden mit dem Ultra Turrax. Zwischen den einzelnen Proben wurde der Homogenisator durch nachfolgendes Eintauchen in 50 ml PP-Röhrchen mit 0,1 % SDS bzw. destilliertes Wasser kurz gesäubert. Somit sollten Verunreinigungen vermieden werden.

Nach der Homogenisierung folgte eine 30-minütige Inkubation der Proben auf Eis. Daraufhin wurden sie für eine Minute bei 4300 rpm und 4°C zentrifugiert, um im Anschluss nochmals durch die Einwirkung von Ultraschall (200 Joule) im HTU Soni130 (Fa. G. Heinemann) zerkleinert zu werden. Durch diesen Schritt sollten auch die letzten Zellkernmembranen aufgebrochen werden, um alle Proteine des Gewebes zu isolieren.

Nach einem nochmaligen Zentrifugationsschritt für 1 Minute bei 4300 rpm und 4°C überführte man den Überstand in neue 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäße und zentrifugierte diese für 10 Minuten bei 13000 rpm und 4°C. Wiederum wurde der Überstand in neue 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäße überführt. Abschließend konnte die Proteinkonzentration direkt gemessen (siehe Material und Methoden 2.5.2) oder die Proben bei –20°C gelagert werden.

2.5.2 Quantifizierung von Proteinen

Die quantitative Konzentrationsbestimmung von isolierten Proteinen führte man mit Hilfe des Biorad Protein-Assays durch, das auf dem Bradford-Test basiert. Dieser Test ist eine photometrische Methode zur quantitativen Bestimmung von Proteinen. Dabei bildet der Farbstoff Coomassie-Brillant-Blau G-250 (CBBG) einen Komplex mit kationischen und unpolaren Seitenketten von Proteinen. Durch die Komplexbildung mit den Proteinen wird aus dem zuvor roten Farbstoff (Absorptionsmaximum bei 470 nm) eine blaue und anionische Sulfonatform, die ihr Absorptionsmaximum bei 595 nm hat. Eine Quantifizierung der Proteine ist somit mit Hilfe eines Photometers möglich.

Generell wurden zur Ermittlung der Proteinkonzentration 1 µl Proteinextrakt, 799 µl destilliertes Wasser und 200 µl Biorad-Protein-Assay-Reagenz in eine Einmalküvette gegeben, mit Parafilm verschlossen, gut gemischt und für 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Innerhalb dieser Zeit fand die Farbreaktion der zu messenden Proteine mit dem Reagenz des Biorad Protein Assays statt, so dass man anschließend die optische Dichte der Lösung bei einer Wellenlänge von 595 nm im Photometer messen konnte. Als Vergleich diente ein Leerwert einer Lösung mit 800 µl destilliertem Wasser und 200 µl Biorad-Protein-Assay-Reagenz, der unter gleichen Bedingungen vor Beginn der Messung der Proben photometrisch ermittelt worden war.

Mit Hilfe der ermittelten Absorptionswerte und einer BSA (*bovine serum albumin*)-Eichkurve, die zuvor mit einer steigenden Konzentration von BSA erstellt worden war, konnte man anschließend die jeweilige Proteinkonzentration der Proben berechnen.

2.5.3 Fällung von Proteinen

Die Fällung von Proteinen wurde durchgeführt, um in anschließenden *Western blot*-Analysen die gleiche Menge an Proteinen einzusetzen und somit Vergleiche zwischen den einzelnen Proben zu ermöglichen. Dabei macht man sich zu Nutze, dass Proteine durch den Einsatz des organischen Lösungsmittels Aceton ihre Löslichkeit verändern und ausfallen.

Nach der Bestimmung der Proteinkonzentration der zu analysierenden Proben (siehe Material und Methoden 2.5.2) wurden je 100 µg der entsprechenden Menge des Proteinextraktes in neue

1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäße überführt. Anschließend wurden die Proben nach Zugabe des neunfachen Volumens von eiskaltem Aceton (bezogen auf die jeweilige Menge des Proteinextrakts) gut gemischt. Nachfolgend inkubierte man die Ansätze bei -20°C für 1 Stunde bzw. über Nacht, so dass die Proteine ausfallen konnten.

Schließlich wurden sie bei 13.000 rpm und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das zurückbleibende Proteinpellet in je 12 μl 2x Proteinprobenpuffer resuspendiert. Die somit gewonnenen Proteine konnten direkt für eine *Western blot*-Analyse verwendet werden oder bis zu deren Gebrauch bei -20°C eingefroren werden.

2.5.4 SDS-Polyakrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Das anionische Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) ermöglicht es, dass bei einer SDS-PAGE Proteine in einem elektrischen Feld nach Molekülgröße aufgetrennt werden können. Diese Auftrennung der Proteine ist nur möglich, da SDS die Proteine einheitlich negativ lädt und somit eine Wanderung der Proteine zur Anode eines elektrischen Feldes gewährleistet.

In der vorliegenden Dissertation wurde bei einer SDS-PAGE mit dem diskontinuierlichen Prinzip gearbeitet. Hierbei trennte man die Proteine zunächst durch ein weitporiges Sammelgel (3 %) und anschließend durch ein engporiges Trenngel (10 %) auf. Dazu wurde zunächst das Trenngel und nach dessen Polymerisation das Sammelgel gegossen. Durch das Einsetzen eines „*sample well*“-Kamms in das Sammelgel war ein späteres Auftragen der zu untersuchenden Proteinproben möglich.

Nachdem die Gele polymerisiert waren, überführte man diese in eine mit 1x Laufpuffer gefüllte Gelelektrophoresekammer und entfernte vorsichtig die Kämmen. Anschließend konnten 10 μl der gefällten und gelösten Proteine (10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) auf das Gel aufgetragen werden. Dazu waren die Proteine im Vorfeld durch eine 5-minütige Hitzebehandlung in kochendem Wasser denaturiert worden. Zum Größenvergleich der Proteine wurden pro Gel 6 μl des Proteinmarkers *PageRuler Prestained Protein Ladder* (Fa. Fermentas) aufgetragen und die Proteine abschließend bei 70 - 95 Volt für 3 - 4 Stunden aufgetrennt.

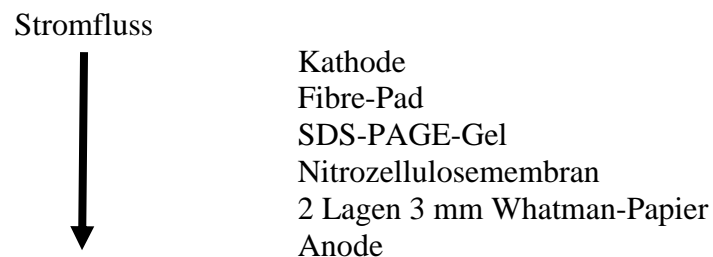
2.5.5 Western blot-Analyse

Bei der *Western blot*-Analyse werden Proteine, die zuvor durch eine SDS-PAGE nach ihrer Molekülgröße aufgetrennt wurden, auf eine Nylon- oder Nitrozellulose-Membran transferiert. Dies ist durch ein elektrisches *Blotting*-Verfahren möglich, indem die durch SDS negativ geladenen Proteine in Richtung der Anode wandern und an die Membran binden. Anschließend

können zu detektierende Proteine durch die Inkubation der Membran mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen und analysiert werden.

Dazu binden nach Blockade von unspezifischen Bindungsstellen zunächst Primärantikörper an die zu analysierenden Proteine. Nachfolgend inkubiert man die Membran mit Sekundärantikörpern, die mit einer Meerrettich-Peroxidase (*horseradish peroxidase*; HRP) gekoppelt und gegen die Primärantikörper gerichtet sind. Durch den Komplex aus Antikörpern und der HRP sind die entsprechenden Proteine durch eine Chemilumineszenzreaktion auf Röntgenfilmen nachweisbar. Die *Western blot*-Analyse wurde in der vorliegenden Dissertation folgendermaßen durchgeführt:

Bevor man das Gel mit den aufgetrennten Proteinen aus der SDS-PAGE-Gelelektrophoresekammer entnahm, bereitete man alles für den Aufbau des Blots vor. Dazu wurden pro Gel zwei 3 mm dicke Whatmanpapiere und eine Nitrozellulosemembran so zurechtgeschnitten, dass sie der Größe des SDS-PAGE-Gels entsprachen. Zudem wurden 1,5 Liter 1x Transferpuffer angesetzt. Anschließend wurde das SDS-PAGE-Gel aus der Kammer entnommen und kurz in eine Schale mit 1x Transferpuffer gelegt. Dies hatte den Zweck, dass das Gel gewaschen und äquilibriert wurde, um einen optimalen Transfer der Proteine auf die Nitrozellulosemembran zu ermöglichen. Anschließend wurde der Blot folgendermaßen aufgebaut:



Während des Aufbaus wurden die Whatman-Papiere und die Nitrozellulosemembran vor ihrem Gebrauch kurz in 1x Transferpuffer getränkt und somit äquilibriert. Nachfolgend überführte man den aufgebauten Blot in eine Tank-Blotting-Apparatur (Fa. Biorad) und füllte diese mit 1x Transferpuffer auf, bevor man den Transfer der Proteine bei 100 mA über Nacht startete.

Am nächsten Tag wurde die Membran aus der Tank-Apparatur entnommen und für eine Stunde mit 10 ml *Blocking* Puffer (0,5 g Milchpulver gelöst in 10 ml 1x PBS mit 0,05 % (v/v) Tween 20) unter leichtem Schwenken auf einem Taumeltisch inkubiert. Dadurch vermied man unspezifische Bindungen der Antikörper während der nachfolgenden Inkubationen. Auch die nachfolgenden Schritte wurden immer unter leichtem Schwenken auf dem Taumeltisch durchgeführt.

Nach einer Stunde wurde die Blocklösung verworfen und die Membran für 4 Stunden bzw. über Nacht mit Primärantikörpern (1:1000 Verdünnung in 10 ml Blocklösung) inkubiert. Der Blot wurde daraufhin dreimal für 10 Minuten mit 10 ml 1x PBS/0,05% Tween 20-Lösung (1x PBT) gewaschen und des Weiteren für eine Stunde mit Sekundärantikörpern (1:5000 Verdünnung in 10 ml Blocklösung) inkubiert. Wiederum folgte im Anschluss ein dreimaliges Waschen des Blot mit 10 ml 1x PBT für je 15 Minuten.

Anschließend konnte man mit der Detektion der Proteine beginnen. Dazu wurde eine frisch zubereitete 1 ml ECL Plus-Lösung (Fa. Amersham) nach den Angaben der Firma zubereitet, gleichmäßig auf dem Blot verteilt und dieser nach einer fünfminütigen Inkubation in eine Expositionskassette gelegt. Die Lichtemission, die durch die Chemilumineszenzreaktion der an die Zweitantikörper gekoppelten Peroxidase mit dem in der ECL-Lösung enthaltenen Luminol entstand, konnte durch Exposition eines Röntgenfilms (5 Sekunden bis 1 Stunde) in einer Dunkelkammer visualisiert werden, so dass man anschließend die unterschiedliche Expression der zu analysierenden Proteine untersuchen konnte.

Weitere Nachweise konnten anschließend nach einigen vorbereitenden Schritten auf die gleiche Weise durchgeführt werden. Dazu wurde die Membran zunächst 5 Minuten mit 20 ml destilliertem Wasser gewaschen und anschließend 5 Minuten mit 10 ml 0,2 M NaOH-Lösung inkubiert. Durch diesen Schritt wurden gebundene Antikörper entfernt. Nach einem weiteren fünfminütigen Waschschrift mit 20 ml destilliertem Wasser konnte mit dem zweiten Nachweis von Proteinen begonnen werden.

Auch phosphorylierte Proteine konnten mit Hilfe des zuvor beschriebenen Protokolls nachgewiesen werden. Allerdings wurde dazu die Membran nicht mit 1x PBT gewaschen und auch die Antikörper nicht mit dieser Lösung angesetzt. In diesem Fall wurde eine 1x TBS/0,05 % Tween 20 (v/v)-Lösung verwendet, so dass die Membran nicht mit Phosphaten inkubiert wurde, an die spezifische Phosphat-Antikörper binden könnten und eine Auswertung unmöglich machen.

2.6 Zellbiologische Arbeiten

2.6.1 Verwendete Zellen

Alle in dieser Arbeit verwendeten Zellen waren Primärkulturen von murinen Embryonen. Die Präparation dieser Primärkulturen erfolgte wie im Kapitel 2.7.9 beschrieben.

2.6.2 Arbeiten mit Zellen

Das Arbeiten mit Zellen wurde unter einer Sterilbank durchgeführt. Alle verwendeten Materialien und Lösungen wurden dazu autoklaviert bzw. steril filtriert. Zudem erwärmte man alle verwendeten Chemikalien vor ihrem Gebrauch im Wasserbad bei 37°C, um die Zellen nicht durch Temperaturunterschiede zu beeinflussen.

2.6.3 Kultivieren und Passagieren von Zellen

Um Zellen zu kultivieren, wurden sie in einem CO₂-Inkubator mit 5 % CO₂-Gehalt und wasserdampfgesättigter Atmosphäre bei 37°C aufbewahrt. Zur Versorgung wurde das Nährmedium DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) verwendet, welches mit 10 % tetrazyklinfreiem fötalem Kälberserum (FCS), 5 ml mM L-Glutamin, 5 ml Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 µg/ml) ergänzt war (DMEM-Vollmedium). Sobald die Zellen den Boden der Kulturflaschen oder Schalen fast komplett bewachsen hatten, wurden sie passagiert. Dazu zog man das Medium der Zellen ab und wusch sie einmal durch eine Zugabe von 10 ml PBS (*Phosphat buffered saline*). Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und 1 ml Trypsin/EDTA flächendeckend auf die Zellen verteilt. Nach einer Inkubationszeit von 5 – 15 Minuten im 37°C warmen CO₂-Inkubator lösten sich die Zellen vom Boden der Zellkulturgefäße. Mit einer Zugabe von 5 – 10 ml DMEM-Vollmedium wurde der Ablösevorgang der Zellen abgebrochen. Die Zellen wurden im Anschluss durch mehrmaliges Hoch- und Runterpipettieren vereinzelt und in ein 15 ml PP-Röhrchen überführt. Es folgte eine Zentrifugation der Zellen bei 1300 rpm für 5 Minuten und Raumtemperatur. Nachfolgend wurde der Überstand abgesaugt und 10 ml DMEM-Medium auf die Zellen gegeben. Nach dem Vereinzeln der Zellen wurde abschließend eine gewünschte Volumenmenge von Zellen in ein neues Zellkulturgefäß mit frischem DMEM-Medium ausplattiert.

2.6.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren von Zellen wurden sie zunächst wie in Kapitel 2.6.3 beschrieben vom Zellkulturgefäßboden mit Hilfe von Trypsin/EDTA gelöst, mit DMEM-Vollmedium vereinzelt, in 15 ml PP-Röhrchen überführt und zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen in 10 ml DMEM-Vollmedium vereinzelt. Allerdings folgte nun nicht das Passagieren einer bestimmten Menge an Zellen in ein neues Zellkulturgefäß, sondern der Zentrifugationsschritt wurde bei 1300 rpm für 5 Minuten und Raumtemperatur wiederholt. Durch diesen zusätzlichen Schritt sollten die letzten Reste an Trypsin/EDTA entfernt werden,

welches ein Einfrieren der Zellen behindern könnte. Anschließend saugte man den Überstand ab und löste das Zellpellet in 1 – 2 ml Einfriermedium. Das Einfriermedium bestand dabei aus DMEM-Vollmedium, dem 10 Volumenprozent entsprechend DMSO hinzugefügt worden war. Nachfolgend wurden je 1 ml der Zellsuspension in Kryoröhrchen aliquotiert und in einem Styroporbehälter für 24 Stunden bei -80°C eingefroren. Am nächsten Tag konnten die Zellen zur Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff überführt werden.

Zum Auftauen von Zellen wurden die sich in den Kryoröhrchen befindenden Zellen für 10 Minuten in einem Wasserbad mit 37°C gelagert. Im Anschluss wurden sie in ein 50 ml PP-Röhrchen überführt, welches mit 15 ml DMEM-Vollmedium gefüllt war. Nachfolgend zentrifugierte man die Zellen für 10 Minuten bei Raumtemperatur und 1000 rpm. Durch das anschließende Absaugen des Überstandes wird das DMSO entfernt und die Zellen können nach der Zugabe von 10 ml DMEM-Vollmedium vereinzelt und in ein entsprechendes Zellkulturgefäß mit entsprechender Menge an DMEM-Vollmedium ausplattiert werden.

2.6.5 Bestimmung der Zellzahl in der Neubauer-Kammer

Um die Zellzahl einer Zellsuspension zu bestimmen, wurden 20 μl der Suspension in eine Neubauer-Kammer pipettiert. Anschließend wurde in den vier eingeschliffenen Großquadranten der Kammer die entsprechende Zellanzahl bestimmt und ein Mittelwert aus den gezählten Zellen errechnet. Da die Kammer ein Fassungsvermögen von $V = 0,1 \text{ mm}^3 = 10^{-4} \mu\text{m}^3$ besitzt und die Konzentration (c) als $c = \text{Gesamtzellzahl (n)}/\text{Volumen (V)}$ definiert ist, konnte man die Zellzahl einer Suspension mit folgender Gleichung errechnen:

$$c = (n/4) \times 10^4 \text{ Zellen/ml Zellsuspension}$$

2.6.6 Durchflusszytometrie von murinen embryonalen Zellen und murinen adulten Knochenmarkzellen

Die Technologie und das Verfahren der Durchflusszytometrie wurden in den späten 60er Jahren von Bonner *et. al.* und anderen Forschern entwickelt (Herzenberger *et. al.*, 2002). Durch dieses Verfahren können u.a. die Größe, die Komplexität und die Expression verschiedener Gene von eukaryotischen Zellen bestimmt werden. Das Prinzip beruht dabei auf der Emission von optischen Signalen seitens der Zellen, wenn diese einzeln einen Laserstrahl passieren. Die Emission der Strahlung kann nachfolgend mittels Detektoren nachgewiesen und durch einen Computer graphisch erfasst werden. Zudem können die Zellen je nach Emission der optischen Signale elektrisch geladen und anschließend durch eine Anode bzw. Kathode sortiert werden.

Somit ist nicht nur eine Zählung und Charakterisierung von Zellen möglich, sondern auch die Gewinnung von Zellpopulationen mit unterschiedlichen Merkmalen.

In dieser Dissertation wurde die Durchflusszytometrie zum einen für die Gewinnung bestimmter embryonaler Zellpopulationen verwendet und zum anderen zur Analyse der Expression von hämatopoetischen Stammzellmarkern in embryonalen Zellen und adulten Knochenmark durchgeführt.

Für die Gewinnung embryonaler Zellpopulationen präparierte man murine Weibchen nach einem *timed mating* zu einem bestimmten Zeitpunkt der Schwangerschaft und entnahm die Embryonen (siehe Material und Methoden 2.7.3). Aus diesen Embryonen wurde eine Zellsuspension hergestellt (siehe Material und Methoden 2.7.10), um anschließend EGFP-exprimierende Zellen mittels des FACSCaliburs (Fa. BD Biosciences, Heidelberg) elektronisch zu laden und von EGFP-negativen Zellen zu trennen. Beide gewonnenen Zellpopulationen wurden im Anschluss für Transplantationsversuche (siehe Material und Methoden 2.7.12) oder Stammzellassays (siehe Material und Methoden 2.6.7) verwendet.

Auch zur Expressionsanalyse von hämatopoetischen Markern wurden Embryonen an einem bestimmten Tag der Schwangerschaft den Weibchen entnommen (siehe Material und Methoden 2.7.3). Anschließend präparierte man Zellsuspensionen der einzelnen Embryonen (siehe Material und Methoden 2.7.9). Aus den Amnion der jeweiligen Embryonen wurde DNA isoliert und der Embryo genotypisiert (siehe Material und Methoden 2.7.4). Gleichzeitig stellte man Zellsuspensionen aus dem Knochenmark von adulten Mäusen her (siehe Material und Methoden 2.7.11). Um anschließend die Expression von hämatopoetischen Markern in beiden Zellpopulationen durch Durchflusszytometrie zu analysieren, mussten diese mit Hilfe von spezifischen fluoreszierenden Antikörpern, die gegen die zu untersuchenden Marker gerichtet waren, inkubiert werden. Damit wurde durch den Nachweis und die Stärke der Emission von unterschiedlichen Fluoreszenzen eine Aussage zur jeweiligen Expression der Marker in den Zellen möglich. Zum Nachweis der Expression der Marker konnten die Zellen mit direkt gekoppelten Fluoreszenz-Antikörpern inkubiert werden oder mussten nach der Inkubation mit einem spezifischen nicht-fluoreszierenden Primärantikörper zusätzlich mit einem weiteren fluoreszierenden Sekundärantikörper behandelt werden. Dazu wurden als erstes entweder 500.000 Zellen des Knochenmarks oder jeweils ein Teil der embryonalen Zellsuspension, die in PBS/15% FCS vereinzelt worden waren, (200.000 bis 300.000 Zellen) für 10 Minuten bei 4°C und 1230 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und pro Färbung jeweils 100 µl der jeweilige Primärantikörper (fluoreszierend oder nicht-fluoreszierend) in einer 1:100-Verdünnung (verdünnt in 1x PBS/10 % FCS) auf die Zellen gegeben. Es folgte eine Inkubation für 30 Minuten auf Eis. Im Anschluss wurden die Zellen in 2 ml 1x PBS/10 % FCS

vereinzelte, 10 Minuten bei 4°C und 1230 rpm zentrifugiert und nach dem Abgießen des Überstands für 30 Minuten mit den fluoreszierenden Sekundärantikörpern inkubiert. Dazu gab man je 100 µl pro unterschiedlichen Sekundärantikörper in einer 1:100 Verdünnung (verdünnt in 1x PBS/10% FCS) auf die Zellen und lagerte sie während der Inkubation auf Eis. Abschließend wurden die Zellen wiederum in 2 ml 1x PBS/10 % FCS gewaschen, 10 Minuten bei 4° C und 1230 rpm zentrifugiert und nach dem Abgießen des Überstands in 200 µl 1x PBS/10 % FCS gelöst. Zum Schluss konnte die Analyse der Expression der hämatopoetischen Marker mit Hilfe des FACSCaliburs (Fa. BD Biosciences, Heidelberg) durchgeführt werden. Anschließend wurden zur Expressionsanalyse 30.000 Zellen pro Probe bzw. Färbung mit Hilfe des Computerprogramms *Cyflogic* ausgewertet.

2.6.7 Stammzellassay von murinen embryonalen Zellen

Mit Hilfe eines sogenannten *in vivo* Stammzellassays kann untersucht werden, ob embryonale Zellen den Charakter von hämatopoetischen Stammzellen besitzen. Dabei ist es nicht nur möglich die Anzahl von Kolonien von hämatopoetischen Vorläuferzellen zu bestimmen, sondern auch die Zelltypen, die sich aus möglichen Stammzellen entwickeln. Zu diesem Zweck werden die zu untersuchenden Zellen im sogenannten solidem Medium kultiviert, das nur das Wachstum und die Differenzierung von hämatopoetischen Stammzellen zulässt. Nach einer mehrtägigen bis mehrwöchigen Inkubation in einem Brutschrank können die Kolonien von Zellen mit Stammzellcharakter unter einem Lichtmikroskop gezählt und charakterisiert werden.

In dieser Arbeit wurden die Stammzellassays mit Hilfe des *Mouse Colony-Forming Cell (CFC) Assays Using Methocult®* (Fa. STEMCELL technologies) durchgeführt. Die Durchführung entsprach den Angaben des Protokolls *general method for set-up of CFC Assays in MethoCult® Media*. Die zu untersuchenden Zellen präparierte man aus murinen Embryonen (siehe Material und Methoden 2.7.10), die man zu einem bestimmten Zeitpunkt der Schwangerschaft den Müttern entnommen hatte. Das Zählen der Kolonien von hämatopoetischen Vorläuferzellen und deren Charakterisierung fand täglich unter dem Lichtmikroskop zwischen Tag 5 und 20 der Kultivierung statt.

2.7 Arbeiten mit Mäusen

2.7.1 Durchführung

Das Arbeiten mit Mäusen wurde nach den Maßgaben des Tierschutzgesetzes durchgeführt. Die Haltung der Tiere erfolgte in der ZVTE (Zentrale Versuchstiereinrichtung der Universitätsmedizin Mainz) nach den vorgegebenen Standards.

2.7.2 Präparation von murinen Organen

Zur molekularen bzw. histologischen Analyse von murinen Organen mussten diese zunächst präpariert werden. Dazu wurden die Mäuse durch Genickbruch getötet. Nach dem Überprüfen des Ausbleibens der Reflexe durch leichtes Quetschen der Oberschenkelmuskulatur wurde die Maus mit 70 % Ethanol befeuchtet und das Fell mit einer Schere am Abdomen eingeschnitten und entfernt. Nach dem Abziehen des Fells wurde die Bauchhöhle bis zum Brustkorb eröffnet, wodurch die darin befindlichen Organe freigelegt wurden. Zu untersuchende Organe wurden operativ entnommen und in einer mit 1x PBS gefüllten Petrischale gewaschen. Mit Hilfe der Schere konnte anschließend das Diaphragma durchtrennt und die Rippen eingeschnitten und entfernt werden, so dass man an die Organe im Brustkorb gelangte. Auch hier wurden die zu untersuchenden Organe entnommen und in 1x PBS gewaschen.

Nach Entnahme der Organe überführte man sie entweder in vorbeschriftete Gefäße (Kryo- oder Eppendorfreaktionsgefäße verschiedener Größe), um sie zur langfristigen Lagerung nach dem Überführen in flüssigen Stickstoff bei -80°C einzufrieren oder entnahm Stücke der Organe für molekulare und histologische Untersuchungen. Die Lagerung und die weitere Behandlung der Organe variiert je nach durchzuführender Methode.

2.7.3 Altersbestimmung und Präparation pränataler Mausembryonen

Um bestimmte Entwicklungsstadien von murinen Embryonen zu untersuchen, wurden zeitlich überwachte Verpaarungen (*timed matings*) angesetzt. Durch den standardisierten 12-stündigen Tag/Nachtzyklus in der ZVTE wurde dabei der Verpaarungszeitpunkt von neu zusammengeführten Tieren für Mitternacht angenommen.

Am nächsten Morgen wurde die Vagina des Weibchens auf das Vorhandensein eines sogenannten *plugs* untersucht, da Mausböcke bei der Kopulation ein Koagulationssekret absondern und somit die Vagina des Weibchens verschließen. Bei einem positiven Befund wurde dieser Zeitpunkt als Tag 0,5 *d.p.c.* (*days post coitum*) festgelegt.

Die Embryonen der schwangeren Weibchen wurden anschließend zum benötigten Embryonalstadium präpariert. Dabei erfolgte die Entnahme der Embryonen nach Töten der Weibchen durch Genickbruch. Der Uterus, mit denen darin befindlichen Embryonen, wurde freigelegt und entnommen. Von jedem Embryo wurden die Eihäute separat entfernt und das Amnion zum Zweck der DNA-Isolation mit anschließender Genotypisierung in 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäße überführt. Die operativ entnommenen Embryonen wurden je nach Versuch unterschiedlich behandelt.

2.7.4 Isolierung genomischer DNA aus Mausschwanz-Biopsien, Amnia und murinen Organen

Zur Genotypisierung von murinen Embryonen und adulten Mäusen musste zunächst DNA aus Mausschwanz-Biopsien, Amnia oder murinen Organen isoliert werden. Dazu schnitt man bei der Mausschwanz-Biopsie drei Wochen alten Mäusen etwa 0,3 - 0,5 cm der Schwanzspitze mit einer Schere ab und überführte diese in ein 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß. Im Falle der Isolation von DNA aus Organen wurde das jeweilige Gewebe nach dem Töten der Maus durch Genickbruch präpariert und ein kleines Stück des Organs in ein 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Die Genotypisierung der Amnia von Embryonen erfolgte nach Überführung der Eihäute in 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäße. Die nachfolgenden Schritte waren für alle Gewebe identisch.

Die Isolation der DNA konnte direkt nach der Entnahme der Probe begonnen werden oder bis zu dessen Gebrauch bei -20°C gelagert werden. Zu Beginn der Isolation wurde das Gewebe in 750 μl *Tail*-Lysepuffer mit frisch zugesetzter Proteinase K (100 bis 600 $\mu\text{g/ml}$) aufgenommen. Je nach Höhe der Proteinase K-Konzentration fand anschließend ein Verdau des Gewebes in einem Heizblock bei 54°C statt. In der Regel wurden die Gewebe über Nacht verdaut.

Am nächsten Tag wurde zu jedem Ansatz 250 μl 5 M NaCl zugegeben. Anschließend vortexte man die Proben kurz, um sie anschließend 20 Minuten bei 13000 rpm zu zentrifugieren. Währenddessen legte man in neue 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäße 750 μl 100 % Isopropanol vor. Nach der Zentrifugation der Proben wurden 750 μl des Überstandes in die vorbereiteten 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäße mit 100 % Isopropanol überführt. Nach kurzem Invertieren wurde die DNA bei Raumtemperatur und 13000 rpm in der Zentrifuge gefällt. Die DNA-Pellets waren im Anschluss sichtbar und wurden nach Verwerfen des Überstandes zweimal mit 70 % Ethanol bei Raumtemperatur und 13000 rpm zentrifugiert (nach jeder Zentrifugation wurde der Überstand verworfen). Die gefällte DNA wurde somit gewaschen. Nach dem Waschen trocknete man die DNA-Pellets bei 37°C mit geöffneten Deckeln in einem Heizblock und nahm sie schließlich in 500 μl 0,1x TE auf. Nach dem Lösen der DNA bei 54°C für zirka 30 Minuten konnte die Genotypisierung durchgeführt werden. Für eine Standard-PCR setzte man dafür 1 μl

der gefällte DNA ein (siehe Material und Methoden 2.4.1). Die somit gewonnenen Proben lagerte man je nach Gebrauchshäufigkeit bei 4°C bzw. -20°C.

2.7.5 Fixierung von murinen Embryonen und Organen

Operativ präparierte Organe und murine Embryonen wurden über Nacht in 4 % Paraformaldehyd (pH 7) fixiert und am nächsten Tag in Paraffin überführt (siehe Material und Methoden 2.7.6). Eine Ausnahme bildeten dabei Embryonen, die X-Gal gefärbt werden sollten. Sie wurden nur 30 Minuten in 0,4 % Paraformaldehyd (pH 7) fixiert, um anschließend mit der Färbung der Embryonen fortzufahren (siehe Material und Methoden 2.7.7).

2.7.6 Überführung muriner Embryonen und Organe in Paraffin

Um Embryonen und Organe in Paraffin zu überführen, musste nach vorangegangener Fixierung (siehe Material und Methoden 2.7.5) eine Dehydration der zu untersuchenden Probe durchgeführt werden. Dazu wurden die Organe und Embryonen zunächst für eine Stunde in neue 2 ml Eppendorfreaktionsgefäße mit 1,5 ml 70 % Isopropanol überführt. Es folgten eine einstündige Dehydration in 1,5 ml 96 % Isopropanol (die einmal wiederholt wurde) und eine 30-minütige Lagerung in 1,5 ml 100 % Isopropanol (die zweimal wiederholt wurde), wobei die alte Alkohollösung vor jedem Schritt verworfen und neu zugegeben wurde.

Anschließend wurden die zu analysierenden Organen oder murinen Embryonen dreimal für 30 Minuten mit jeweils 1,5 ml frischem Xylol behandelt. Bei der ersten Behandlung wurden die Proben dazu in ein neues 2 ml Eppendorfreaktionsgefäß mit Xylol überführt, das aber für die Wiederholung der Behandlungen mit Xylol beibehalten wurde. Durch die Behandlung mit Xylol wurde das Isopropanol völlig durch Xylol ersetzt.

Anschließend überführte man die Proben in vorbeschriftete Einbett-Kassetten, um sie nachfolgend in 55°C warmen Paraffin im Inkubationsoffen zu lagern. Nach einer Stunde bzw. anschließenden 45 Minuten wurden die Kassetten in jeweils neue Gefäße mit flüssigem und warmem Paraffin überführt. In der dritten Paraffinlösung blieben die zu untersuchenden Organe bzw. Embryonen über Nacht, um sie am nächsten Tag in Paraffin einzubetten und zum Schluss Paraffinschnitte herstellen zu können (siehe Material und Methoden 2.8.1).

2.7.7 X-Gal-Färbung von murinen Embryonen und Organen

Zur Überprüfung ob murine Embryonen und Organe eine durch ein Transgen (z.B. RR oder EZ) integrierte β -Galaktosidase exprimieren, wurden die zu untersuchenden Proben mit X-Gal

gefärbt. X-Gal stellt dabei eine künstliche Substanz dar, die zur qualitativen Bestimmung der Aktivität der β -Galaktosidase verwendet werden kann. Dabei hydrolysiert das Enzym das chromogene Substrat X-Gal zu Galaktose und 5-Brom-4-chlor-Indoxyl. Das entstandene 5-Brom-4-chlor-Indoxyl wird durch Sauerstoff in der Luft zum blauen Farbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-Indigo oxidiert und kann somit in β -Galaktosidase exprimierenden Geweben nachgewiesen werden.

Die X-Gal zu färbenden Embryonen und Organe wurden zunächst für 30 Minuten in 2 ml Eppendorfreaktionsgefäßen mit 1,5 ml 0,4 % Paraformaldehyd fixiert (siehe Material und Methoden 2.7.5). Anschließend folgte das dreimalige 30-minütige Waschen der Proben in einer X-Gal Waschlösung (siehe Material und Methoden 2.1.2). Dazu wurden die vorfixierten Embryonen und Organe in neue 2 ml Eppendorfreaktionsgefäße mit 1,5 ml Waschlösung überführt und in einen Rotator eingespannt, um sanft invertiert zu werden. Nach jedem Waschschrift wurde die Waschlösung verworfen und durch neue ersetzt.

Nach dem Waschen der Proben folgte das Überführen in die X-Gal-Färbelösung. Die Embryonen und Organe wurden dazu aus der Waschlösung in neue 2 ml Eppendorfreaktionsgefäße mit 1,5 ml X-Gal-Färbelösung befördert. Im Anschluss wurden sie in den Rotator eingespannt und in einem vorgewärmten Inkubationsofen bei 37°C invertiert und gefärbt. Nach jeweils 30 Minuten überprüfte man das Voranschreiten der Blaufärbung, um sie gegebenenfalls abbrechen zu können. Dieser Abbruch der Färbung erfolgte abschließend durch das zweimalige 10-minütige Waschen in 1x PBS (pH 7,4) und das einmalige 10-minütige Waschen in 70 % Ethanol.

Abschließend wurde eine mögliche Blaufärbung unter dem Binokular dokumentiert und die Embryonen bzw. Organe bis zum Überführen in Paraffin mit anschließender Anfertigung von Paraffinschnitten bei -20°C gelagert.

2.7.8 Behandlung von X-Gal gefärbten Embryonen mit Benzylbenzoat

Die Benzylbenzoat-Behandlung von X-Gal gefärbten Embryonen wurde als erstes 1998 von Schmidt und Kollegen beschrieben (Schmidt *et. al.*, 1998). Durch dieses Verfahren werden nicht X-Gal gefärbte Gewebe durchsichtig, so dass eine enzymatische Umsetzung von X-Gal deutlicher sichtbar wird.

Um dies zu erreichen, wurden die Embryonen nachfolgend für je 30 Minuten in 2 ml Eppendorfreaktionsgefäßen mit 30 %, 50 %, 70 % und 99 % Ethanol gelagert. Abschließend folgte das Überführen der Embryonen in 2 ml Eppendorfreaktionsgefäße mit Benzylbenzoat und Benzylalkohol (Verhältnis 2:1). Sobald die Embryonen in dieser aromatischen Lösung lagerten,

wurden die nicht X-Gal gefärbten Gewebe langsam durchsichtig. Nach einer Stunde konnte mit der Dokumentation unter dem Binokular begonnen werden.

2.7.9 Herstellung von Zellsuspensionen aus einzelnen murinen Embryonen zur Kultivierung und Durchflusszytometrie-Analyse

Um Zellen von einzelnen murinen Embryonen zur Kultivierung herzustellen oder durch Durchflusszytometrie untersuchen zu können, musste man einzellige Suspensionen von ihnen herstellen. Dazu wurden die Embryonen zunächst zu einem bestimmten Zeitpunkt der Schwangerschaft präpariert (siehe Material und Methoden 2.7.3) und einzeln in Kammern einer 6-well Platte mit je 3 ml 1x PBS überführt und gewaschen. Die anschließenden Arbeiten fanden alle unter der Sterilbank statt.

Im Anschluss nahm man jeden einzelnen Embryo in einer Insulininjektions-Spritze auf und drückte sie durch diese zum Verkleinern in eine neue Kammer einer 6-well Platte, die jeweils mit 3 ml DMEM/10 % Collagenase-Medium gefüllt war. Die Embryonen wurden nachfolgend für ungefähr 15 Minuten im Brutschrank inkubiert, so dass sie durch die Collagenase verdaut werden konnten. Durch eine zwischenzeitliche Kontrolle unter dem Mikroskop konnte man den Verdau kontrollieren und gegebenenfalls durch Aufziehen und Ausdrücken durch eine neue Insulininjektions-Spritze die Embryonen nochmals zerkleinern. Nachdem der Verdau ausreichend fortgeschritten war und einzelligen Embryonenzellen vorlagen, überführte man die verdauten Embryonen von den 6-well Platten in einzelne 15 ml PP-Röhrchen. Diese zentrifugierte man für 5 Minuten bei 1300 rpm und Raumtemperatur. Der Überstand wurde abgossen und jeweils 10 ml DMEM-Vollmedium zum Waschen und Vereinzeln der embryonalen Zellen hinzugegeben. Wiederum folgte ein Zentrifugationsschritt von 5 Minuten bei Raumtemperatur und 1300 rpm, um im Anschluss den Überstand abzugießen und das Zellpellet entweder in 10 ml DMEM-Vollmedium (Kultivierung) oder in 1 ml PBS/15 % FCS (Durchflusszytometrie) aufzunehmen. Abschließend überführte man für die Durchführung einer Durchflusszytometrie die embryonalen Zellsuspensionen in FACS-Röhrchen (siehe Material und Methoden 2.6.6) oder plattierte die Zellen auf 10 cm Kulturschalen aus, um sie im Anschluss im Brutschrank zu kultivieren (siehe Material und Methoden 2.6.3).

2.7.10 Herstellung einer Zellsuspension aus mehreren murinen Embryonen für Transplantationsversuche bzw. Stammzellassays

Um einzellige Zellsuspensionen von mehreren murinen Embryonen für Transplantationsversuche (siehe Material und Methoden 2.7.12) oder Stammzellassays (siehe Material und Methoden 2.6.7) zu erhalten, musste man zunächst die Embryonen zu einem

bestimmten Zeitpunkt der Schwangerschaft präparieren (siehe Material und Methoden 2.7.3) und sie zusammen in eine Petrischale überführen, die mit 10 ml 1x PBS gefüllt war. Die nachfolgenden Arbeiten fanden alle unter der Sterilbank statt.

Anschließend wurden die Embryonen zweimal in 50 ml PP-Röhrchen gewaschen, die mit 50 ml 1x PBS gefüllt waren. Im Anschluss zog man die Embryonen einzeln und nacheinander mit einer Insulininjektions-Spritze auf und drückte sie durch diese in eine Petrischale mit 10 ml DMEM/10 % Collagenase-Medium. Durch die Collagenase kommt es zum Verdau der Embryonen, so dass einzelne Zellen aus ihnen entstehen. Um dies optimal zu fördern, wurde die Petrischale mit den Embryonen für eine halbe Stunde im Brutschrank inkubiert und zwischenzeitlich das Voranschreiten des Verdaus unter dem Mikroskop beurteilt. Nachdem dieser ausreichend fortgeschritten war, überführte man die embryonalen Zellen in ein 50 ml PP-Röhrchen und zentrifugierte sie für 5 Minuten bei Raumtemperatur und 1300 rpm. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 20 ml DMEM-Medium aufgenommen, um die Zellen zu vereinzeln. Die Zentrifugation, das Abschütten des Überstands und das Aufnehmen in 20 ml DMEM-Medium wiederholte sich im Anschluss ein weiteres Mal. Anschließend wurden die Zellen mit einer Pipette aufgenommen und auf ein Sieb gegeben, wodurch das Vereinzeln der Zellen verbessert werden sollte. Die Zellen wurden dabei unterhalb des Siebs durch ein 50 ml PP-Röhrchen aufgefangen und anschließend die Zellzahl der Suspension bestimmt (siehe Material und Methoden 2.6.5). Nachfolgend wurden sie für 5 Minuten bei Raumtemperatur und 1300 rpm zentrifugiert und das Pellet in einer entsprechenden Menge an DMEM-Medium aufgenommen, so dass man pro ml eine Millionen Zellen in der Suspension vorfand. Abschließend konnte die Durchflusszytometrie (siehe Material und Methoden 2.6.6) durchgeführt werden, um eine bestimmte Zellpopulation für die Transplantationsversuche bzw. Stammzellassays zu erhalten.

2.7.11 Herstellung von Zellsuspensionen aus murinem Knochenmark

Das Herstellen von einzelligen murinen Knochenmark-Zellsuspensionen ist notwendig, um sie für Transplantationsversuche (siehe Material und Methoden 2.7.12) bzw. Durchflusszytometrie-Analysen (siehe Material und Methoden 2.6.6) zu verwenden. Dazu tötete man eine Maus durch Genickbruch und legte im Anschluss deren Oberschenkelknochen frei. Muskeln und Sehnen wurden dabei mit Hilfe einer Pinzette und eines Skalpells entfernt. Nach dem Freilegen des Knochens wurde dieser entnommen und die Knochenköpfe mit einem Skalpell entfernt. Anschließend zog man mit einer 2 ml Injektionspritze 1x PBS auf und spülte mit Hilfe einer Kanüle mehrmals das Knochenmark aus den Knochen in ein 15 ml PP-Röhrchen. Es folgte ein

Zentrifugationsschritt für 5 Minuten bei Raumtemperatur und 1300 rpm. Der Überstand wurde abgossen und das Zellpellet in 5 ml 1x PBS aufgenommen und vereinzelt. Im Anschluss bestimmte man die Zellzahl der Suspension (siehe Material und Methoden 2.6.5). Nach einer wiederholten 5-minütigen Zentrifugation bei Raumtemperatur und 1300 rpm wurde das sich abgesetzte Zellpellet in einer bestimmten Menge an 1x PBS (Transplantationsversuche) oder 1x PBS/FCS (15 % FCS-Anteil/FACS-Analysen) aufgenommen, die der gewünschten Zellmenge für den jeweiligen Versuch entsprach.

2.7.12 Transplantation muriner embryonaler Zellen in adulte Mäuse

Um überprüfen zu können, ob bestimmte embryonale Zellpopulationen an der Hämatopoese der Maus beteiligt sind, können die zu untersuchenden Zellen in adulte Mäuse transplantiert werden, deren Knochenmark durch radioaktive Bestrahlung zerstört worden war.

Der erste Schritt dieses komplexen Versuchs war die radioaktive Bestrahlung von Mäusen mit 9,5 Gray unter einer Cäsium-Quelle. Dazu wurden die Mäuse einzeln in eine Bestrahlungstrommel gesetzt und bestrahlt. Generell wurde dies 6 bis 8 Stunden vor der Transplantation der embryonalen Zellen durchgeführt. Nach der Bestrahlung der Mäuse konnten die zu untersuchenden Zellen vorbereitet werden. Dazu wurde Embryonen zu einem bestimmten Zeitpunkt der Schwangerschaft präpariert (siehe Material und Methoden 2.7.3). Anschließend wurde aus diesen eine Zellsuspension hergestellt (siehe Material und Methoden 2.7.10) und mit Hilfe der Durchflusszytometrie die Zellpopulation isoliert (siehe Material und Methoden 2.6.6), deren Rolle in der Hämatopoese untersucht werden sollte. Die isolierten Zellen wurden nachfolgend für 5 Minuten bei Raumtemperatur und 1300 rpm zentrifugiert, in 5 ml 1x PBS aufgenommen und deren Zellzahl bestimmt (siehe Material und Methoden 2.6.5). Nach einer weiteren Zentrifugation, die auf gleiche Weise durchgeführt wurde, goss man den Überstand ab und nahm das Pellet in einer gewünschten Menge an DMEM-Vollmedium auf, so dass eine gewünschte Anzahl von embryonalen Zellen transplantiert werden konnte. Bis zur Transplantation wurden die Zellen auf Eis gelagert.

Parallel zur Herstellung der embryonalen Zellen wurde aus einer wildtypischen Maus eine Zellsuspension aus Knochenmark hergestellt (siehe Material und Methoden 2.7.11). Jeweils zwei Millionen adulte Knochenmarkzellen sollten im Anschluss zusammen mit embryonalen Zellen transplantiert werden. Dies war notwendig um das Überleben der bestrahlten Mäuse überhaupt zu gewährleisten. Auch diese Zellen lagerten bis zur Transplantation auf Eis.

Nach dem Herstellen der beiden oben beschriebenen Zellpopulationen konnte jeweils eine bestimmte Menge an zu untersuchenden Zellen zusammen mit jeweils zwei Millionen adulten

Knochenmarkzellen in die bestrahlten Mäuse transplantiert werden. Dazu wurde das gewünschte Volumen mit entsprechender Zellzahl aus embryonalen Zellen und adulten Knochenmarkzellen in 1,5 ml Reaktionsgefäßen vorgelegt und für 5 Minuten bei 4°C und 3000 rpm zentrifugiert. Im Anschluss verwarf man den Überstand und nahm die zu transplantierenden Zellen in 200 µl 1x PBS auf. Nachfolgend wurde diese Zellsuspension in eine Insulininjektions-Spritze aufgenommen und mit Hilfe einer Kanüle in den retrobulbären Venenplexus der bestrahlten Mäuse injiziert. Die zu untersuchenden Zellen gelangten somit in die Blutbahn der bestrahlten Mäuse und könnten helfen das Blutsystem wieder aufzubauen. Um nachzuweisen, ob die embryonalen Zellen an dem Neuaufbau des Blutsystems beteiligt waren, beobachtet man die Mäuse in den kommenden 16 Wochen und entnahm ihnen im Falle des Überlebens Blut. Desweiteren sollten sie nach einem halben Jahr präpariert werden, um die Milz, die Lymphknoten, den Thymus und das Knochenmark zu entnehmen. Wäre ein Nachweis der injizierten, transplantierten Zellen im Blut und den Organen möglich, so würden sie beim Neuaufbau des Blutsystems helfen.

2.8 Histologische Methoden

2.8.1 Herstellung von Paraffinschnitten

Für histologische Untersuchungen von murinen Organen und Embryonen mussten Paraffinschnitte angefertigt werden. Dazu wurden von den in Paraffin eingebetteten Gewebeprobe 7 µm dicke Serienschnitte mit Hilfe eines Mikrotoms hergestellt. Die Serienschnitte wurden in ein 37°C warmes Wasserbad überführt und anschließend auf beschichtete Objektträger aufgezogen. Nachdem die Schnitte über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet waren, konnte mit den histologischen Untersuchungen begonnen werden. Fanden die nachfolgenden Analysen nicht direkt statt, wurden sie bei Raumtemperatur in Objektträger-Kisten gelagert.

2.8.2 Herstellung von Kryoschnitten

Verschiedene histologische Untersuchungen sind nur auf gefrorenen Gewebeschnitten möglich. Zu diesem Zweck wurden Kryoschnitte von molekular zu untersuchenden murinen Organen und Embryonen hergestellt. Die bei -80°C gelagerten Proben wurden dazu zunächst mit Einbettmedium (*tissue tek*) fixiert. Anschließend wurden die eingebetteten Gewebe im Kryotom eingespannt und 10 µm dicke Serienschnitte bei -25°C angefertigt. Die somit hergestellten

Schnitte zog man anschließend auf beschichtete Objektträger auf und lagerte sie bis zum jeweiligen Gebrauch in Objektträger-Kisten bei -20°C .

2.8.3 Hämatoxylin/Eosin (HE)-Färbung

Mit Hilfe der HE-Färbung werden Zellkerne (Hämatoxylin) und Zytoplasma (Eosin) auf Gewebe-Paraffinschnitte gefärbt. Die Färbung der Zellkerne durch Hämatoxylin kommt dabei durch die Oxidation von Hämatoxylin zu Hämatein zustande. Dieser Stoff bindet an die negativ geladene DNA in den Zellkernen und färbt diese blau. Das Zytoplasma wird durch Eosin rosa gefärbt. Nachfolgend kann man die Struktur von zu untersuchenden Gewebeproben analysieren. Um die HE-Färbung durchzuführen, wurden zuvor hergestellte Paraffinschnitte 20 Minuten bei 60°C in einem Heizofen inkubiert. Somit wurde von den Schnitten überflüssiges Paraffin entfernt. Diesem ersten Schritt der Entparaffinierung folgten weitere Schritte zu diesem Zweck. Hierzu wurden die Schnitte in Färbeküvetten gestellt und zweimal für 10 Minuten in jeweils frischem Xylol gelagert. Anschließend folgte eine 5-minütige Inkubation in 100 %, 96 %, 90 % und 70 % Ethanol in jeweils neuen Küvetten. Nach Beendigung dieser absteigenden Alkoholreihe sollte das komplette Paraffin entfernt sein, um mit der Färbung beginnen zu können. Dazu wusch man die Schnitte kurz in einer Küvette mit destilliertem Wasser, um anschließend für eine Minute die Zellkerne mit Hämatoxylin zu färben. Nachfolgend überführte man die Paraffinschnitte in eine neue Küvette und „bläute“ sie für 10 Minuten unter laufendem Leitungswasser. Um die HE-Färbung abzuschließen, folgte eine Färbung des Zytoplasmas für 3 Minuten in einer Küvette mit Eosin. Nach der Färbung wurden die Schnitte kurz in 70 % Ethanol eingetaucht, um sie anschließend für jeweils 5 Minuten in 90 %, 96 % und 100 % Ethanol aufzubewahren. Mit dieser aufsteigenden Alkoholreihe wurden die Schnitte dehydriert. Dies wurde mit einer zweimaligen 5-minütigen Inkubation in Xylol abgeschlossen. Zum Schluss wurden die gefärbten Schnitte mit Entellan eingedeckelt und konnten unter dem Mikroskop analysiert werden.

2.8.4 Kernechtrot-Färbung

Um die Blaufärbung von X-Gal gefärbten Organen bzw. Embryonen besser darstellen zu können, wurden deren angefertigte Paraffinschnitte mit Kernechtrot gegengefärbt. Dabei wurden Zellkerne rosa gefärbt, die sich nicht durch die enzymatische Umsetzung von X-Gal blau gefärbt hatten.

Zum Gegenfärben der Paraffinschnitte wurden diese zunächst dreimal für 20 Minuten in Färbeküvetten mit jeweils frischem Xylol gelagert. Die damit begonnene Entparaffinisierung

wurde anschließend durch eine absteigende Alkoholreihe fortgesetzt. Dazu wurden die Schnitte in jeweils neuen Küvetten zweimal mit 100 % Isopropanol, zweimal mit 96 % Isopropanol, einmal mit 70 % Ethanol und einmal mit 50 % Ethanol für je 20 Minuten behandelt. Anschließend wurden die Schnitte kurz in destilliertes Wasser getaucht, um sie anschließend für 20 Sekunden in einer Küvette mit Kernechtrot zu färben. Nach zwei neuerlichen Waschschritten in destilliertem Wasser folgte die Behandlung der gefärbten Paraffinschnitte durch eine aufsteigende Alkoholreihe. Dabei wurden die Proben einmal in 50 % Isopropanol, einmal in 70 % Isopropanol, zweimal in 96 % Ethanol und abschließend zweimal in 100 % Ethanol für je 10 Minuten aufbewahrt. Danach folgte eine dreimalige Inkubation der Schnitte für je 20 Minuten in Küvetten mit Xylol, um sie schließlich mit einem Tropfen Entellan einzudeckeln. Zum Schluss erfolgte die Analyse der X-Gal- und Kernechtrot-Färbung unter dem Lichtmikroskop.

2.8.5 Immunhistochemische-Analysen auf Paraffinschnitten

Die hier beschriebene und auch in dieser Dissertation angewandte Methode der Immunhistochemie nennt man *labelled (Strept-)Avidin-Biotin methode*. Bei dieser Immunohistochemie-Analyse werden Proteine mit Hilfe spezifischer Primärantikörper auf zuvor angefertigten Paraffinschnitten markiert. Der Nachweis des Proteins mit dem gebundenen Primärantikörper erfolgt anschließend durch den Einsatz von biotinylierten Sekundärantikörpern, die an den Primärantikörper binden. Dieser Komplex wird von einem Avidin-Biotin-Peroxidasekonjugat erkannt. Nachfolgend werden durch eine Inkubation mit Wasserstoffperoxid Protonen durch die enzymatische Aktivität der Peroxidase freigesetzt und können somit ein zuvor mit Wasserstoffperoxid zugegebenes, farbloses Chromogen (3,3'-Diaminbenzidin (DAB), Fa. Vector Laboratories) in ein braunes Endprodukt umwandeln. Damit wird das zu untersuchende Protein sichtbar und es können Aussagen zu dessen Lokalisation und Expression auf Paraffinschnitten getroffen werden.

Zum immunhistochemischen Nachweis von Proteinen auf Paraffinschnitten wurden sie zunächst bei einer 15-minütigen Inkubation im 60°C heißen Heizofen von überflüssigem Paraffin befreit. Zum weiteren Entparaffinieren stellte man sie anschließend zweimal für je 10 Minuten in Küvetten mit einer Roti-Histol-Lösung. Es folgte eine jeweils 5-minütige Lagerung in 100 % Ethanol (2x), 75 % Ethanol (1x) und 50 % Ethanol (1x). Die Küvetten mit den Paraffinschnitten wurden dabei bei allen Schritten der Entparaffinierung auf einen Taumeltisch leicht geschwenkt. Nach einem anschließenden 10-minütigen Waschschriff in 1x PBT wurden die Schnitte aus den Küvetten vom Taumeltisch in eine gläserne Auflaufform mit Tris-EDTA-Puffer gelegt. Anschließend wurden die Proteine der Gewebeschnitte durch ein zweimal 10-minütiges

Aufkochen in der Mikrowelle bei 900 Watt freigelegt, damit sie durch primäre Antikörper nachgewiesen werden können.

Um diese Primärantikörper-Inkubation vorzubereiten, ließ man nach dem Aufkochen die Paraffinschnitte im Puffer auf Raumtemperatur abkühlen, wusch sie zweimal für je 5 Minuten in 1x PBT und inkubierte sie anschließend mit 2 % Serum, so dass man unspezifischen Antikörperbindungen vorbeugte (das Tier aus dem das Serum stammt, muss mit dem der Sekundär-Antikörper-Gewinnung übereinstimmen und wurde mit 1x PBT verdünnt). Dazu wurden je 150 µl frisch angesetztes 2 % Serum auf die Objektträger gegeben, mit Parafilm abgedeckt und für 30 Minuten in einer feuchten Kammer inkubiert. Nachfolgend wurde das Serum von den Schnitten entfernt und durch Primärantikörper ersetzt. Dazu setzte man diesen mit Hilfe von 1x PBT in einer 1:100 Verdünnung an und gab je 100 µl auf die jeweiligen Objektträger. Abschließend wurden die Schnitte mit Parafilm abgedeckt und ließ sie über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer inkubieren.

Am nächsten Tag entfernte man den Primärantikörper von den Schnitten und wusch sie zweimal für je 5 Minuten in einer Küvette mit 1x PBT auf dem Taumeltisch. Anschließend folgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper. Dazu wurde dieser zuerst in einem Verhältnis von 1:100 mit 1x PBT verdünnt, um anschließend je 200 µl auf die Schnitte zu geben. Die Objektträger wurden abschließend mit Parafilm abgedeckt und zur 1-stündigen Inkubation bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer gelagert.

Während der Sekundärantikörper-Inkubation wurde mindestens 30 Minuten vor deren Gebrauch das Avidin-Biotin-Peroxidasekonjugat (*Vectastain ABC Kit*, Fa. Vector Laboratories) angesetzt. Dazu wurden in einem 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß je 20 µl Lösung A und 20 µl Lösung B zu 1 ml 1x PBT gegeben. Durch eine Inkubation von 30 Minuten bei 4°C bildete sich der Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex, der im Anschluss zum Einsatz kam. Doch zuvor wusch man die Objektträger nach dem Entfernen des Sekundärantikörpers zweifach für 5 Minuten in 1x PBT gefüllten Küvetten auf dem Taumeltisch. Erst dann wurden je 200 µl des angesetzten Avidin-Biotin-Peroxidasekonjugats auf die Schnitte gegeben und für 30 Minuten bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer inkubiert. Dabei waren sie wiederum mit Parafilm abgedeckt.

Es folgte ein zweimaliger Waschschrift für 5 Minuten in 1x PBT gefüllten Küvetten auf dem Taumeltisch, bevor man das zu untersuchende Protein durch die Zugabe des Substrats visualisierte. Die Substratlösung wurde dabei während des Waschens mit 1x PBT folgendermaßen angesetzt: 50 µl 20x DAB + 950 µl PBT + 1 µl 20 % Wasserstoffperoxid. Je 300 µl dieser Lösung wurden anschließend auf die Schnitte pipettiert. Um die Färbung abzurechnen, entfernte man nach einer Minute das Substrat von den Objektträgern und überführte sie in eine Küvette mit Leitungswasser. Anschließend wurden die Schnitte jeweils

einmal kurz in eine Färbeküvette mit Hämatoxylin getaucht (Blaufärbung der nicht gefärbten Zellkerne) und lagerte sie anschließend in einer Küvette mit Leitungswasser.

Abschließend folgte das Dehydrieren der Schnitte durch eine aufsteigende Alkoholreihe. Dazu wurden sie jeweils für eine Minute in Küvetten mit 50 % (1x), 70 % (1x) und 100 % Ethanol (2x) auf dem Taumeltisch aufbewahrt. Es folgte eine einminütige Inkubation in einer Küvette mit Xylol, bevor sie abschließlich mit einem Tropfen *DPX Mountain for histology* (Fa. Sigma) eingedeckelt wurden. Die Auswertung der gefärbten Schnitte fand im Anschluss unter dem Lichtmikroskop statt.

2.8.6 Immunfluoreszenz-Analysen von Paraffinschnitten

Bei Immunfluoreszenz-Analysen wird eine Darstellung eines Proteins durch die Detektion von spezifischen Primärantikörpern und daran gekoppelten Sekundärantikörpern möglich. Dabei erfolgt der Nachweis durch direkt an den Sekundärantikörper gekoppelte, fluoreszierende Substanzen. Diese sogenannten Fluorochrome, die mit Licht einer bestimmten Wellenlänge unter dem Fluoreszenzmikroskop angeregt werden können, strahlen dadurch wenige Nanosekunden später Licht einer anderen Wellenlänge ab. Das zu untersuchende Protein wird somit unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar, so dass Aussagen zu dessen Lokalisation und Expression möglich sind. Eine weitere Besonderheit dieser Methode ist, dass durch die Wahl unterschiedlicher Sekundärantikörper, die mit verschiedenen Fluorochromen gekoppelt sind, auch eine Darstellung von mehreren Proteinen gleichzeitig möglich ist, die durch spezifische Primärantikörper markiert sind. Hier soll nur die Analyse von einem Protein beschrieben werden. Die Methode und die Verdünnungen der anzusetzenden Antikörper bleiben aber auch bei Koexpressionsanalysen gleich, wobei in diesem Fall mehrere verschiedene Antikörper in die Lösungen gegeben werden.

Die Behandlung der zu untersuchenden Paraffinschnitte unterschied sich dabei am ersten Tag nicht von der Methode der Immunhistochemie (siehe Material und Methoden 2.8.5). Doch nach der Primärantikörper-Inkubation wurden die Paraffinschnitte zur Immunfluoreszenz-Färbung anders behandelt.

Dazu wurden die Objektträger nach dem Entfernen des Primärantikörpers zweimal für 5 Minuten in 1x PBT gefüllten Küvetten gewaschen. Im Anschluss folgte die Inkubation mit dem fluorochromgekoppelten Sekundärantikörper. Pro Schnitt wurden dafür 100 µl einer 1:100 verdünnten Sekundärantikörperlösung angesetzt. Um diese zu erhalten, gab man zu 100 µl 1x PBT, 1 µl des Sekundärantikörpers und 1 µl DAPI (4',6-Diamin-2-phenylindol/1 mg/ml). Neben der damit verbundenen Detektion des zu untersuchenden Proteins wurden durch den Zusatz von

DAPI auch die Zellkerne markiert, die nicht das zu untersuchende Protein exprimierten. Sie wurden somit unter Anregung einer bestimmten Wellenlänge unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar und vereinfachten die Bestimmung der Lokalisation des zu untersuchenden Proteins.

Nachdem 100 µl der Sekundärantikörperlösung auf die Objektträger pipettiert worden war, wurden diese mit Parafilm abgedeckt und für eine Stunde bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer inkubiert. Ab diesem Zeitpunkt mussten die Schnitte möglichst vor Licht geschützt werden, da die Fluorochrome lichtempfindlich sind. Daher wurden die Färbeküvetten mit Alufolie umwickelt.

Im Anschluss wurde der Sekundärantikörper von den Schnitten entfernt und die Proben zweimal für 10 Minuten in Färbeküvetten mit 1x PBT auf dem Taumeltisch aufbewahrt. Abschließend deckelte man die Paraffinschnitte nach Zugabe von zwei Tropfen *Vectashield mounting medium* (Fa. Vector Laboratories) ein. Zum Schluss konnte direkt mit dem Mikroskopieren begonnen werden. Sollten die Schnitte erst später ausgewertet werden, wurden sie dunkel bei 4°C gelagert. Die Darstellung der Proteine ist generell für ungefähr zwei bis drei Wochen möglich.

2.8.7 Immunfluoreszenz-Analysen von Kryoschnitten

Die Methode zur Immunfluoreszenz-Analyse von Kryoschnitten unterscheidet sich nicht von der der Immunfluoreszenz-Analyse auf Paraffinschnitten (siehe Material und Methoden 2.8.6). Allerdings wurden diese Schnitte anders behandelt.

Die Kryoschnitte von murinen Organen oder Embryonen wurden dazu zunächst für 5 Minuten mit 4 % Paraformaldehyd fixiert. Dazu gab man je 200 µl der Fixierlösung auf die Objektträger und deckte sie mit Parafilm ab. Im Anschluss wurde das Paraformaldehyd entfernt und die Schnitte zweimal für 5 Minuten in Küvetten mit 1x PBS auf dem Taumeltisch gewaschen. Nachfolgend wurden sie aus den Küvetten genommen, ließ das 1x PBS abtropfen und trocknete sie bei Raumtemperatur horizontal auf einem Objektträgerhalter. Während des Trocknens der Schnitte konnte die Lösung zum Blocken von unspezifischen Bindungen angesetzt werden. Dazu gab man zu 895 µl 1x PBS, 100 µl einer 10 % BSA-Lösung und 5 µl Triton X-100. Im Anschluss gab man je 100 µl pro Schnitt auf die getrockneten Objektträger und ließ sie für 5 Minuten auf dem Gestell inkubieren, wobei die Kryoschnitte mit Parafilm abgedeckt waren. Anschließend wurde die Lösung entfernt und durch den Primärantikörper ersetzt. Dieser wurde in einer 1:50 Verdünnung (pro Schnitt 100 µl 1x PBS mit 2 µl Primärantikörper) eingesetzt und im Anschluss auf die Kryoschnitte pipettiert. Es folgte eine Inkubation der Proben über Nacht in einer feuchten Kammer bei 4°C.

Am nächsten Tag wurde der Primärantikörper entfernt und die Objektträger dreimal für 10 Minuten in Küvetten mit 1x PBS auf dem Taumeltisch gewaschen. Anschließend folgte die Inkubation der Schnitte mit dem Sekundärantikörper. Doch bevor dieser in einer 1:100 Verdünnung eingesetzt werden konnte, musste erst die Lösung zum Verdünnen angesetzt werden. Dazu gab man 50 µl einer 10 % BSA-Lösung und 1 µl Triton X 100 zu 949 µl 1x PBS. Zu jeweils 100 µl dieser Lösung wurden dann 1 µl des einzusetzenden Sekundärantikörpers gegeben, um anschließend je 100 µl auf die Objektträger zu pipettieren. Nachfolgend wurden die mit Parafilm abgedeckten Schnitte für eine Stunde bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer inkubiert. Ab diesem Schritt musste darauf geachtet werden, dass die Schnitte keinem Licht ausgesetzt waren, da die Sekundärantikörper lichtempfindlich sind.

Anschließend wurde der Sekundärantikörper von den Schnitten entfernt und die Objektträger dreimal für 10 Minuten in Küvetten mit 1x PBS auf dem Taumeltisch gewaschen. Abschließend wurden sie mit Hilfe von zwei Tropfen *Vectashield mounting medium* (Fa. Vector Laboratories) eingedeckelt. Diesem Extrakt waren zuvor pro 100 µl 2 µl DAPI (5 mg/ml) zugesetzt worden, so dass auch nicht primärantikörpergekoppelte Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar werden und somit die Lokalisation des zu untersuchenden Proteins vereinfacht wird.

Nach einer einstündigen Inkubation im Dunkeln bei 4°C konnte mit der Auswertung begonnen werden. Falls die Analyse der Schnitte nicht direkt stattfand, konnte man sie zwei bis drei Wochen im Kühlschrank lagern.

3. Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der *KI-Wt1-tTA Effektor-Mauslinie (WE2)*

Vor dem Beginn der Herstellung der konditionalen reversiblen Wilms-Tumor-Modelle sollte zunächst in Vorversuchen die WE2-Effektor-Mauslinie (siehe Material und Methoden 2.1.11) charakterisiert werden. Im Zuge dessen wurde überprüft, ob es zur Wt1-analogen Expression des tetrazyklinabhängigen Transaktivators (tTA) in denen von der Literatur beschriebenen embryonalen, sowie adulten murinen Geweben kommt. Dies wäre die Voraussetzung für die Herstellung der Wilms-Tumor-Modelle.

Um nun die Charakterisierung der WE2-Effektor-Mauslinie durchzuführen, wurden WE2-Mäuse mit der *Responder*-Mauslinie EZ verpaart (siehe Material und Methoden 2.1.11). Des Weiteren sollte eine Verpaarung mit den *Responder*-Mauslinien TC und RR (siehe Material und Methoden 2.1.11) stattfinden. Durch die Integration der Transgene beinhalteten die doppeltransgenen (WE2 EZ) bzw. tripeltransgenen (WE2 TC RR) Nachkommen zwei wichtige Systeme der Mausgenetik. Es handelte sich dabei um das *Tet off*-System bzw. das *Cre/loxP*-System. Diese sollen vor der Erläuterung der beiden Modelle WE2 EZ bzw. WE2 TC RR kurz erklärt werden.

Das *Tet off*-System basiert auf der Fusion eines *Tet-Repressors* (TetR) aus *E.coli* mit einer Transaktivierungsdomäne des *Herpes simplex*-Virus, wodurch ein tTA als sogenannte Effektorkomponente entsteht (Gossen und Bujard, 1992; Furth *et. al.*, 1994). In Abwesenheit von Tetrazyklin (in dieser Dissertation wird alternativ Doxycyclin verwendet) bindet tTA an eine spezifische Tet-Operator-Konsensussequenz (TetO). Wird die TetO-Kassette mit einem Minimalpromotor kombiniert, kann die Expression einer nachgeschalteten *Responder*-Komponente aktiviert werden und es kommt zur Transkription des nachgeschalteten *Responder*-Transgens (siehe Abb. 3.1). Im Gegensatz dazu kommt es durch die Gabe von Tetrazyklin zu einer Konformationsänderung des tTA, wodurch der Aktivator nicht mehr an DNA binden kann und die Expression des *Responder*-Transgens ausbleibt. Im Laufe der Entwicklung des *Tet off*-Systems sind viele Modifikationen vorgenommen worden, so dass z.B. durch das Einfügen spezieller Minimalpromotoren eine bidirektionale Expression von eingefügten *Responder*-Transgenen möglich ist oder eine erhöhte Stabilität des Transaktivators gewährleistet wird (Baron *et. al.*, 1995, Kistner *et. al.*, 1996; Bockkamp *et. al.*, 2002).

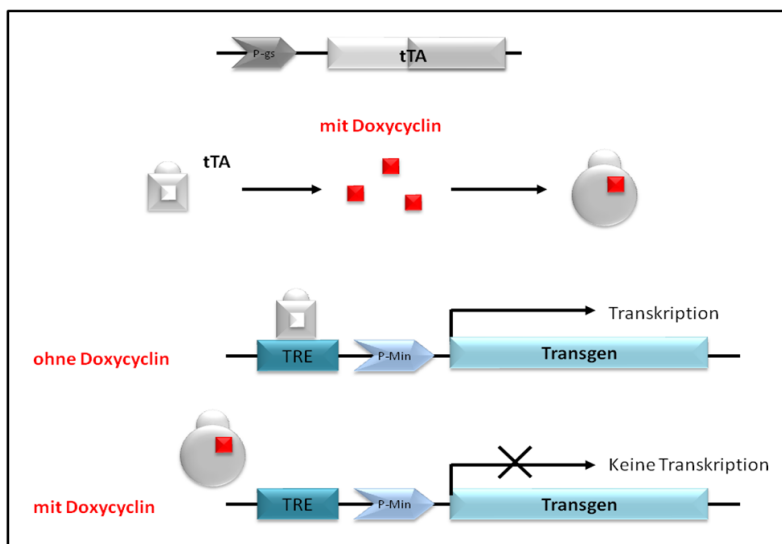


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung des Tet off-Systems

Durch das *Tet off*-System kann die Expression von Zielgenen konditional gesteuert werden. Dafür sind zwei Komponenten notwendig. Eine davon ist ein tetrazyklinabhängiger Transaktivator (tTA), dem ein wählbarer Promotor (P-gs) vorgeschaltet ist und somit eine gewebespezifische Expression gewährleistet. Die zweite Komponente ist ein *Responder*-Transgen (transgene cDNA eines Zielgens), welches von einem Minimalpromotor (P-Min) mit Tet-responsivem Element (TRE) transaktivatorabhängig reguliert wird. Generell wird das System durch Doxycyclin gesteuert. Ohne Doxycyclin

ist eine Bindung des tTA an das TRE möglich, wodurch der Minimalpromotor aktiviert und nachfolgend das *Responder*-Transgen exprimiert wird. In Anwesenheit von Doxycyclin erfährt der tTA eine Konformationsänderung, so dass der gewebespezifisch exprimierte tTA nicht an das TRE binden kann und die Expression des *Responder*-Transgens ausbleibt.

Das zweite System ist das Cre/*loxP*-System. Dieses hat sich zu Beginn der 90er Jahre im Zuge der Herstellung sogenannter konditionaler *knock out*-Mäuse (k.o.-Mäuse) entwickelt (Lakso *et al.* 1992, Orban *et al.* 1992, Kuhn *et al.* 1995). In diesem System können durch die Eigenschaften eines Promotors einer genomisch integrierten Cre-Rekombinase (Cre), sowie eingefügter *locus of crossing-over of P1* (*loxP*)-Sequenzen in einem nachgeschalteten *Responder*-Transgen, bestimmte Bereiche des Transgens entfernt werden. Somit kann die Expression des *Responder*-Transgens gewebespezifisch aktiviert oder ausgeschaltet werden (siehe Abb. 3.2).

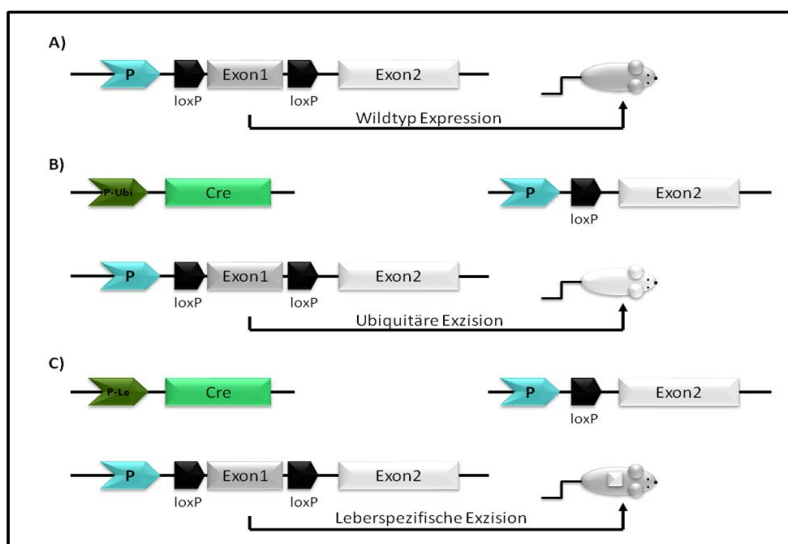


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung des Cre/*loxP*-Systems

Die Eigenschaften des Promotors der Cre-Rekombinase (Cre) bedingen die räumliche und zeitliche Deletion von Bereichen eines nachgeschalteten modifizierten Zielgens mit *loxP*-Sequenzen. **A)** In diesem Teilabschnitt ist ein aus zwei Exons bestehendes Transgen mit eingefügten *loxP*-Sequenzen (*loxP*) um das erste Exon dargestellt. Die Modifikation hat keinen Einfluss auf die Expression des Gens, die somit wildtypisch bleibt. **B)** Durch den Einsatz eines ubiquitär aktivierten Promotors (P-Ubi) für die Cre-Rekombinase kommt es bei Expression des Enzyms zum Erkennen der *loxP*-

Sequenzen in dem nachgeschalteten modifizierten Transgen. Somit wird dessen erstes Exon herausgeschnitten und in der gesamten Maus das Transgen aktiviert bzw. ausgeschaltet. **C)** Durch den Einsatz eines Leber-spezifischen Promotors (P-Le) kommt es zur Exzision in einem definierten Kompartiment des Organismus. Die Expression der Cre-Rekombinase bewirkt in diesem Fall eine Aktivierung oder Ausschaltung des nachgeschalteten Transgens ausschließlich in der Leber.

Nach der kurzen Einführung in die verwendeten Mausgenetiksysteme sollen nun die Modelle WE2 EZ und WE2 TC RR erläutert werden, die die Überprüfung der Expressionsdomäne der WE2-Effektor-Mauslinie ermöglichen.

Das doppeltransgene Modell WE2 EZ basiert auf dem *Tet off*-System. Durch die genomische Integration des WE2-Transgens kann es zur Wt1-analogen tTA-Expression kommen, wodurch eine tetrazyklinabhängige Regulation des nachgeschalteten *Responder*-Transgens EZ möglich ist. Mit Doxycyclin, das in der vorliegenden Arbeit immer über das Trinkwasser verabreicht wurde, kommt es zu keiner Bindung des tTA an den bidirektionalen Promotor von EZ. Die Transkription der *Responder*-Transgene *EGFP* und *lacZ* bleibt aus (siehe Abb. 3.3). Ohne Doxycyclin bindet der tTA an den bidirektionalen Promotor. Es kommt zur Transkription von *EGFP* und *lacZ* mit anschließender Translation der Proteine EGFP und β -Galaktosidase. Diese Proteine ermöglichen durch verschiedene histologische Methoden die visuelle Darstellung der Wt1- bzw. der Wt1-tTA-Expression und somit die Überprüfung der Aktivität und Regulierbarkeit des WE2-Effektors.

Generell kann mit diesem System die aktuelle Expression von Wt1 bzw. Wt1-tTA im Embryo oder in Organen von adulten Tieren dargestellt werden.

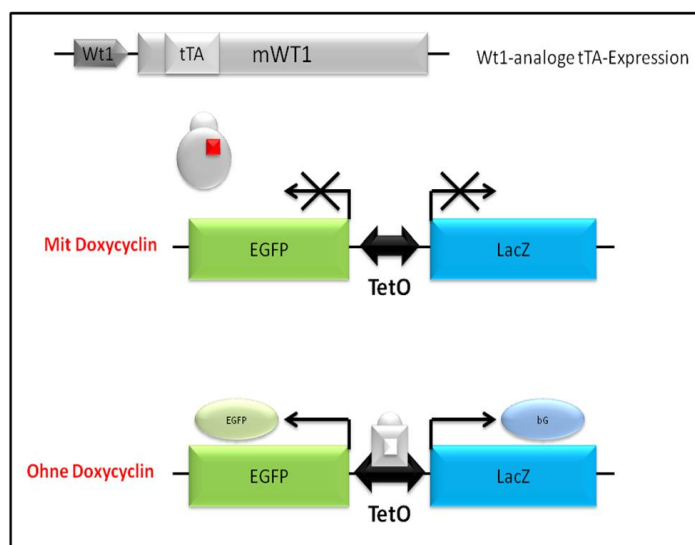


Abbildung 3.3: Schematische Darstellung des WE2 EZ-Mausmodells

Durch den im WE2-Transgen integrierten tetrazyklinabhängigen Transaktivator (tTA) kann durch Doxycyclin die Regulation des *Responder*-Transgens EZ analog zur endogenen Wt1-Expression gesteuert werden. In Abwesenheit von Doxycyclin bindet tTA an den bidirektionalen Promotor (TetO) von EZ. Nachfolgend kommt es zur Transkription der *Responder*-Transgene *EGFP* und *lacZ*. Die bei der anschließenden Translation gebildeten Proteine EGFP und β -Galaktosidase (bG) entsprechen der aktuellen Expression von Wt1 im Embryo und adulten Tieren und können durch verschiedene Methoden detektiert werden. Mit Doxycyclingabe bleibt die Bindung von tTA an den bidirektionalen Promotor aus und die Transkription von EZ wird unterbunden.

Das tripeltransgene Modell WE2 TC RR ist eine Kombination aus dem *Tet off*- und dem *Cre/loxP*-System. Wie auch im WE2 EZ-Mausmodell ist durch die genomische Integration des

WE2-Transgens eine Wt1-analoge tTA-Expression gewährleistet. Nachgeschaltete Tet-responsive Transgene können somit reguliert werden. Im Falle des WE2 TC RR-Modells verhindert die Anwesenheit von Doxycyclin die Bindung des tTA an den tTA-regulierbaren Promotor des TC-Transgens. Somit kommt es nicht zur Transkription der Cre-Rekombinase (siehe Abb. 3.4). Im Gegensatz dazu kann ohne Doxycyclin der tetrazyklinabhängige Transaktivator an den tTA-regulierbaren Promotor binden. Dieser wird aktiviert und die Cre-Rekombinase transkribiert. Nach anschließender Translation erkennt die Cre-Rekombinase die integrierten *loxP*-Sequenzen im RR-Responder-Transgen und schneidet dabei eine Neomycin-Resistenz-Kassette aus dem Gen. Dadurch gelangt das *Responder*-Transgen unter die transkriptionelle Kontrolle des konstitutiv aktiven *Rosa26*-Promotors. Nachfolgend kommt es zur Transkription und Translation des RR-Gens, wodurch eine β -Galaktosidase exprimiert wird. Die Aktivität dieses Enzyms kann durch verschiedene histologische Methoden visualisiert werden und ermöglicht somit die Darstellung der Wt1-tTA Expression im Gewebe. Zudem ist es mit diesem Modell möglich, alle Zellen zu markieren, die einmal Wt1-tTA exprimiert haben, da die tTA-induzierte Cre-Rekombinase-Expression eine nicht reversible Exzision der Neomycin-Resistenz-Kassette zur Folge hat. Das WE2 TC RR-Modell unterscheidet sich somit wesentlich vom WE2 EZ-Modell, in dem nur aktuell Wt1-tTA exprimierende Zellen dargestellt werden können.

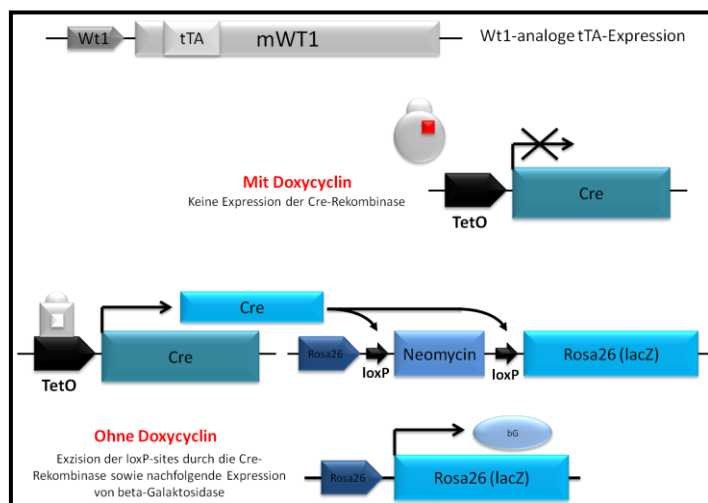


Abbildung 3.4: Schematische Darstellung des WE2 TC RR-Modells

Durch den im WE2-Transgen integrierten tetrazyklinabhängigen Transaktivator (tTA) kann durch Doxycyclin die Regulation nachgeschalteter Transgene des WE2 TC RR-Modells beeinflusst werden. So kommt es z.B. mit Doxycyclin zu einer Konformationsänderung des tTA, wodurch er nicht an den tTA-regulierbaren Promotor (TetO) des TC-Transgens (Cre) binden kann. Nachfolgend bleibt die Transkription des TC-Transgens aus und eine Cre-Rekombinase wird nicht exprimiert. Ohne Doxycyclin kann der tTA an den tTA-regulierbaren Promotor binden, so dass es zur Transkription und Translation des TC-Transgens bzw. der Cre-Rekombinase kommt.

Dieses Enzym erkennt nun die in das RR-Responder-Transgen (*Rosa 26 (lacZ)*) integrierten *loxP*-Sequenzen (*loxP*) und entfernt eine Neomycin-Resistenz-Kassette, wodurch das *Rosa26 (lacZ)*-Gen unter die transkriptionelle Kontrolle des konstitutiv aktiven *Rosa26*-Promotors (*Rosa 26*) kommt. Nachfolgend wird das Gen transkribiert und translatiert. Die bei der Translation gebildete β -Galaktosidase kann anschließend durch verschiedene histologische Methoden nachgewiesen werden.

Beide Modelle ergänzen sich und stellen eine gute Möglichkeit zur Überprüfung der Expressionsdomäne und Induzierbarkeit der WE2-Effektor-Mauslinie dar.

3.1.1 Embryonale Wt1-tTA Expression

Zur Analyse der embryonalen Wt1-tTA Expression wurden jeweils doppeltransgene WE2 EZ-Mäuse, sowie tripeltransgene WE2 TC RR-Mäuse ohne Doxycyclin miteinander verpaart und die Embryonen an Tag 11,5 *d.p.c.* (WE2 EZ-Modell) bzw. Tag 12,5 *d.p.c.* (WE2 TC RR-Modell) präpariert. Anschließend färbte man sie mit X-Gal, wodurch sich alle Zellen blau färben, die Wt1-tTA aktuell exprimieren (im WE2 EZ) oder einmal exprimiert haben (im WE2 TC RR-Modell). Von den X-Gal behandelten Embryonen wurden nach der Dokumentation unter dem Binokular Paraffinschnitte hergestellt und mit KER gegengefärbt. Des Weiteren behandelte man einzelne ausgewählte Embryonen mit Benzylbenzoat, so dass eine Wt1-tTA Expression besser sichtbar wird.

Zusätzlich zu den X-Gal-Expressionsanalysen wurden von Embryonen (Tag 11,5 *d.p.c.*) des WE2 EZ-Modells Paraffinschnitte angefertigt, um anschließend Immunfluoreszenz-Färbungen durchzuführen. Durch die Darstellung von Wt1 und EGFP mit Hilfe spezifischer Antikörper sollte somit durch eine zusätzliche Methode eine mögliche Wt1-tTA Expression überprüft werden.

3.1.1.1 Embryonale Wt1-tTA Expression im WE2 EZ-Modell

Während in WE2 EZ-negativen, X-Gal gefärbten Embryonen keine Blaufärbung zu detektieren war, wiesen WE2 EZ-positive Embryonen eine eindeutige Blaufärbung im Bereich des sich entwickelnden Urogenitalsystems auf (siehe Abb. 3.5). Zudem waren die Somiten unterhalb der Urogenitalanlage durch die enzymatische Umsetzung des Substrats X-Gal blau gefärbt worden.

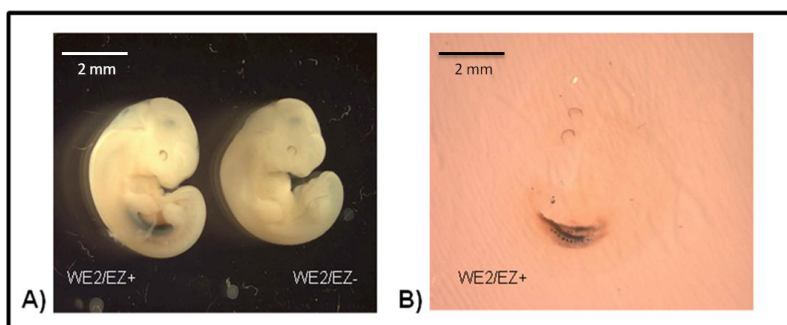


Abbildung 3.5: Nachweis der Wt1-tTA Expression durch X-Gal-Färbung WE2 EZ-positiver Embryonen (Tag 11,5 *d.p.c.*)

In Abb. 3.5 sind WE2 EZ-positive Embryonen und deren Negativkontrolle (alle Tag 11,5 *d.p.c.*) nach einer X-Gal-Färbung bzw. einer zusätzlichen Benzylbenzoat-Behandlung dargestellt. Eine Wt1-tTA Expression ist anhand einer Blaufärbung erkennbar. **A)** Eine

Expression von Wt1-tTA ist nur im doppeltransgenen WE2 EZ-Embryo zu sehen. Die Färbung beschränkt sich auf den dorsalen Bereich des Embryos in dem die Anlagen des Urogenitalsystems liegen. Die Negativkontrolle bleibt ungefärbt. **B)** Nach einer Behandlung mit Benzylbenzoat erscheint der doppeltransgene WE2 EZ-Embryo transparent und die gefärbten Zellen sind besser sichtbar. Eindeutig ist die paarige Anlage des Urogenitalsystems erkennbar und die darunter liegenden blau gefärbten, kugeligen Somiten.

Die genauere Untersuchung der Wt1-tTA Expression mit Hilfe der angefertigten Paraffinschnitte zeigte positive Signale in mehreren Organen des Embryos. Blaugefärbt waren die Gonadenanlagen, der Urnierengang und dessen Kanälchen, sowie das Endothel der linken und rechten Kardinalvene (siehe Abb. 3.6).

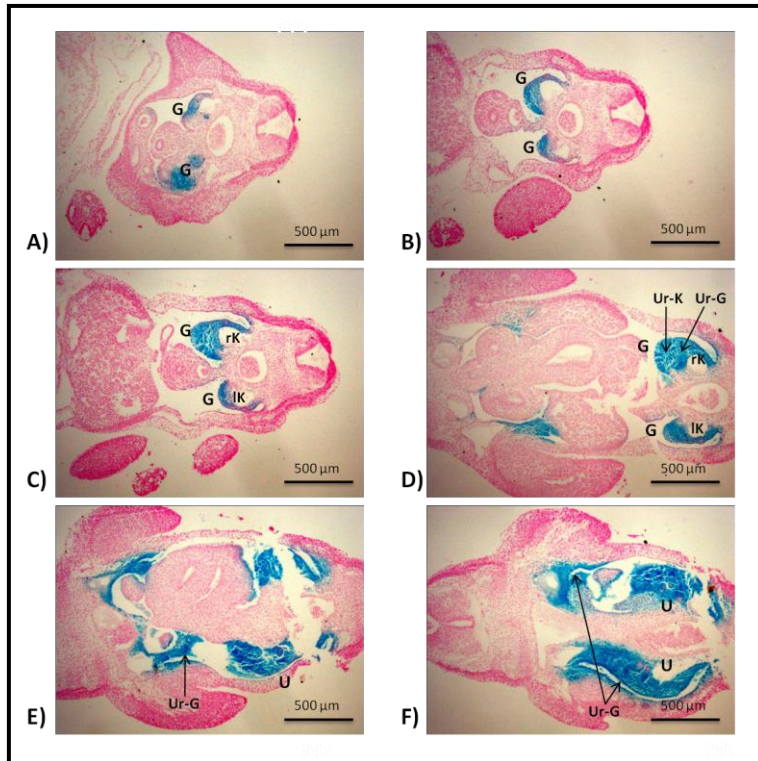


Abbildung 3.6: Expressionsdomäne von Wt1-tTA in WE2 EZ-positiven Embryonen (Tag 11,5 d.p.c.)

In dieser Abbildung sind transversale Paraffinschnitte eines X-Gal gefärbten WE2 EZ-positiven Embryos (Tag 11,5 d.p.c.) dargestellt. Wt1-tTA exprimierende Zellen sind unter dem Mikroskop anhand einer Blaufärbung zu erkennen. KER-gefärbte Zellen sind rosa. Die Abbildungsreihenfolge A-F) erfolgt in seriellen, transversalen Schnitten (cranial Richtung caudal), wobei alle Abbildungen in einer 4-fachen Vergrößerung dargestellt sind. Eine Wt1-tTA Expression ist in den Gonadenanlagen (G), den Gefäßwänden der linken und rechten Kardinalvene (IK bzw. rK), sowie dem Urnierengang (Ur-G) und dessen Kanälchen (Ur-K) nachweisbar.

Bei den Immunfluoreszenz-Färbungen konnte in WE2 EZ-negativen Embryonen (Tag 11,5 d.p.c.) eine eindeutige Expression von Wt1 (rot/TRITC) in den paarig angelegten Gonadenanlagen, den Komma-Vesikeln der entstehenden Niere, sowie dem Endothel der linken und rechten Kardinalvenen detektiert werden. Dieses Expressionsmuster entsprach der X-Gal-Färbung in doppeltransgenen WE2 EZ-Embryonen (Tag 11,5 d.p.c.). Zusätzlich war eine Wt1-tTA Expression im Endothel und dem darunterliegenden Mesenchym der dorsalen Aorta erkennbar. Eine Expression von EGFP konnte in den Kontrollen nicht nachgewiesen werden.

Diese wurde aber in doppeltransgenen WE2 EZ-Embryonen detektiert. Ebenso wie die Wt1-Expression (rot/TRITC) war die durch Wt1-tTA aktivierte EGFP-Expression (grün/FITC) in den Gonadenanlagen, den Komma- und S-förmigen Vesikeln der Nierenanlage, dem Endothel der rechten und linken Kardinalvene und dem Endothel mit darunterliegendem Mesenchym des mittleren und ventralen Bereichs der dorsalen Aorta nachweisbar (siehe Abb. 3.7). Generell wurde die Koexpression von Wt1 und EGFP im Zuge der Überlagerung der roten und grünen Farbe durch eine gelb erscheinende Fluoreszenz dargestellt. Dabei fiel auf, dass nicht alle Wt1-

exprimierenden Zellen auch EGFP-positiv sind. Dies ist möglicherweise durch die verschiedenen Halbwertszeiten der Proteine bedingt.

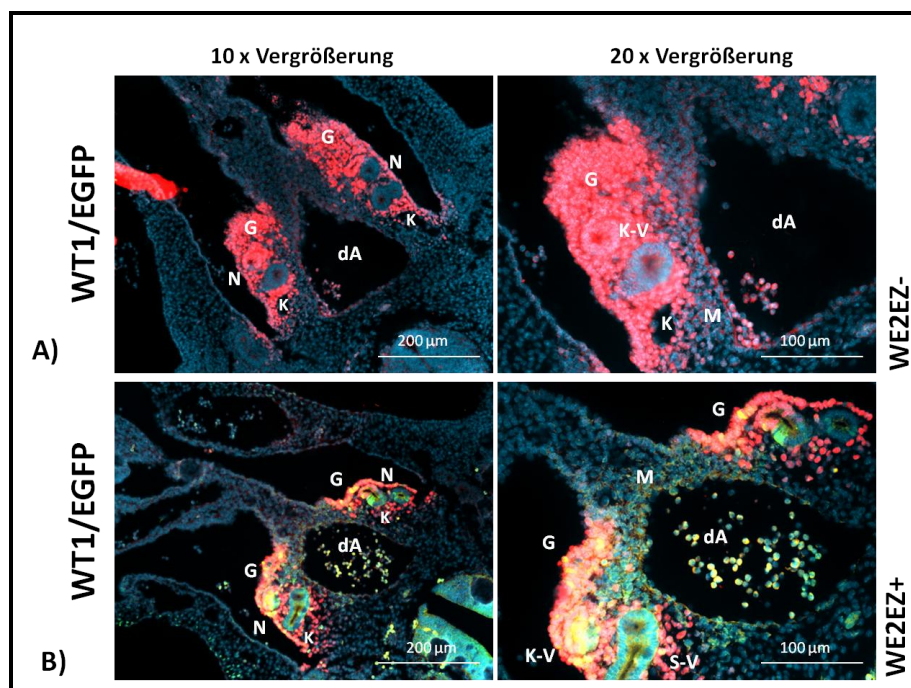


Abbildung 3.7: Vergleich der endogenen Wt1-Expression mit EGFP in WE2 EZ-positiven und -negativen Embryonen (Tag 11,5 *d.p.c.*) nach Immunfluoreszenz-Färbung

A) In diesen beiden Abbildungen ist die Expression von Wt1 und EGFP auf Paraffinschnitten von WE2 EZ-negativen Embryo erkennbar. Während eine Expression von EGFP (grün/FITC) nicht nachweisbar ist, ist die Expression von Wt1 (rot/TRITC) zu detektieren. Wt1 exprimieren die paarigen Gonadenanlagen (G), die Komma-Vesikel (K-V) der entstehenden Niere (N), das Endothel der rechten und linken Kardinalvene (K), sowie das Endothel mit darunterliegendem Mesenchym (M) der dorsalen Aorta (dA). **B)** Diese zwei Abbildungen zeigen die Wt1- und EGFP-Expression auf Paraffinschnitten von WE2 EZ-positiven Embryonen. Dabei wird Wt1 (rot/TRITC) und EGFP (grün/FITC) in vielen Geweben koexprimiert, was an der gelben bis orangenen Fluoreszenz erkennbar ist. Die Orte der Koexpression sind die Gonadenanlagen (G), die Komma- und S-förmigen Vesikel (K-V/ S-V) der Nierenanlage (N), das Endothel der rechten und linken Kardinalvene (K), sowie das Endothel mit darunterliegendem Mesenchym (M) des mittleren und dorsalen Bereichs der dorsalen Aorta (dA).

Die Ergebnisse der histologischen Untersuchungen von WE2 EZ-positiven Embryonen sprachen dafür, dass die WE2-Effektor-Mauslinie induzierbar ist und tTA-regulierbare Transgene aktivieren kann. Zudem stimmte die Expressionsdomäne von Wt1-tTA (u.a. in den Strukturen der entstehenden Niere und der Gonadenanlage) weitestgehend mit der von endogenem Wt1 an Tag 11,5 *d.p.c.* überein (Armstrong *et. al.*, 1993; Rackley *et. al.*, 1993).

3.1.1.2 Embryonale Wt1-tTA Expression im WE2 TC RR-Modell

Nach Präparation, Fixierung und X-Gal-Färbung der Embryonen (Tag 12,5 *d.p.c.*) konnte weder in den tripeltransgenen WE2 TC RR-Embryonen noch in den Negativkontrollen eine Expression von Wt1-tTA nachgewiesen werden. Erst durch die Behandlung mit Benzylbenzoat und der

damit verbundenen Transparenz der Embryonen wurde in den WE2 TC RR-positiven Embryonen eine Blaufärbung sichtbar. So exprimierten Zellen der entstehenden Lunge, der Leber, des Herzens, des Darms und des Urogenitalsystems Wt1-tTA. Ganglien des Knochenmarks, des Gehirns und der Augen waren ebenso schwach bläulich zu erkennen. Auch in der Aorta-Gonaden-Mesonephros (AGM)-Region konnten Zellen durch das WE2 TC RR-Modell blau gefärbt werden (siehe Abb. 3.8). Dagegen wiesen die Kontrollen auch nach der Behandlung mit Benzylbenzoat keine Blaufärbung auf (Daten nicht gezeigt).

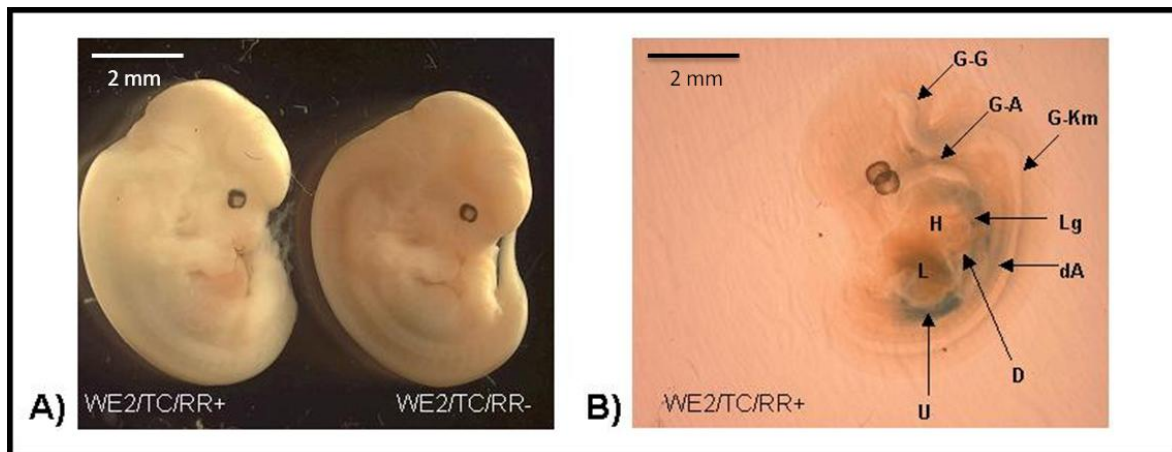


Abbildung 3.8: Nachweis der Wt1-tTA Expression durch X-Gal-Färbung WE2 TC RR-positiver Embryonen (Tag 12,5 d.p.c.)

In Abb. 3.8 sind WE2 TC RR-positive Embryonen und deren Negativkontrolle (alle Tag 11,5 d.p.c.) nach einer X-Gal-Färbung bzw. einer zusätzlichen Benzylbenzoat-Behandlung dargestellt. Eine Wt1-tTA Expression ist anhand einer Blaufärbung erkennbar. **A)** Die WE2 TC RR-positiven (links) und -negativen (rechts) Embryonen weisen kaum oder gar keine Expression von Wt1-tTA auf. **B)** Durch die Transparenz der mit Benzylbenzoat behandelten Embryonen werden in tripeltransgenen Embryonen viele Bereiche sichtbar, in denen eine Blaufärbung stattgefunden hat. Dazu zählen das entstehende Herz (H), die Leber (L), der Darm (D), das Urogenitalsystem (U) und die Lunge (Lg). Ebenso sind Zellen der Aorta-Gonaden-Mesonephros (AGM)-Region und einige Ganglien des Gehirns (G-G), des Knochenmarks (G-Km) und der Augen (G-A) Wt1-tTA positiv.

Nach dem Überführen der tripeltransgenen WE2 TC RR-Embryonen in Paraffin wurden Schnitte in transversaler Ebene angefertigt, um die Bereiche der Wt1-tTA Expression genauer bestimmen zu können. Unter dem Mikroskop war erkennbar, dass die Gefäßwände der absteigenden, dorsalen Aorta und das darunterliegende Mesenchym blau gefärbt sind. Auch die Komma- und S-förmigen Vesikel der entstehenden Niere wiesen eine starke Wt1-tTA-Aktivität auf (siehe Abb. 3.9). Des Weiteren waren einzelne Zellen der Lungenknospe, des Lumens des Duodenums und der Leber Wt1-tTA positiv. Zudem färbte sich die *Chorda dorsalis* komplett blau und auch Teilen des Rückenmarks wiesen eine Wt1-tTA Expression auf.

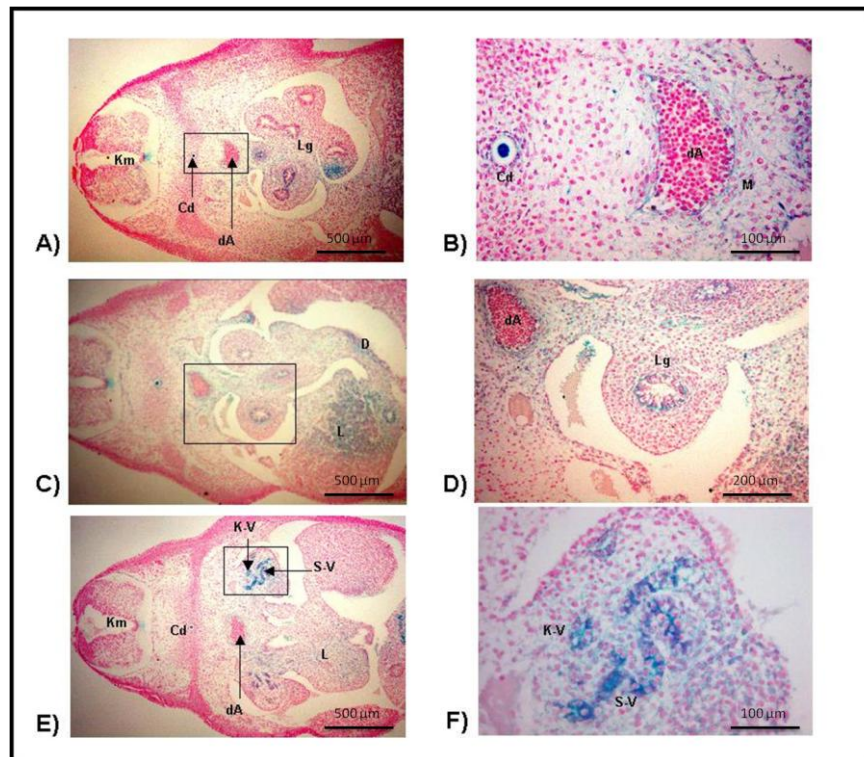


Abbildung 3.9: Expressionsdomäne von Wt1-tTA in WE2 TC RR-positiven Embryonen (Tag 12,5 d.p.c.)

In dieser Abbildung sind transversale Paraffinschnitte eines X-Gal gefärbten WE2 TC RR-positiven Embryos (Tag 11,5 d.p.c.) dargestellt. Wt1-tTA exprimierende Zellen sind unter dem Mikroskop anhand einer Blaufärbung zu erkennen. KER-gefärbte Zellen sind rosa. Die Abbildungsreihenfolge **A)-F)** erfolgt in seriellen, transversalen Schnitten (cranial Richtung caudal), wobei vergrößerte Bereiche durch Kästchen gekennzeichnet und auf der rechten Seite der Abbildung dargestellt sind. **A) C) E)** sind in einer 4-fach Vergrößerung, **D)** in einer 10-fach Vergrößerung und **B) F)** in einer 20-fach Vergrößerung dargestellt. Wt1-tTA exprimierende Zellen sind im Knochenmark (Km), der *Chorda dorsalis* (Cd), dem Endothel der dorsalen Aorta (dA) mit darunterliegendem Mesenchym (M), der Leber (L), dem Lumen des Duodenums (D), der Lunge (Lg) und den Komma (K-V)- bzw. S-förmigen Vesikeln (S-V) der entstehenden Niere erkennbar.

Auch die Ergebnisse der histologischen Untersuchung von WE2 TC RR-positiven Embryonen wiesen darauf hin, dass die WE2-Effektor-Mauslinie induzierbar ist und die Expressionsdomäne von Wt1-tTA der von endogenen Wt1 entspricht. Endogenes Wt1 wird nämlich im Embryo als erstes an Tag 9,5 d.p.c. im intermediären und lateralen Mesoderm exprimiert (Armstrong *et. al.*, 1993; Rackley *et. al.*, 1993) und ist nachfolgend an der Entwicklung von Organen aus Derivaten des Mesoderms und Ektoderms beteiligt (siehe Einleitung 1.3.2). Dies erklärt u.a. den Nachweis von Wt1-tTA im Darm, in der Lunge, im Herz, der AGM-Region und der Urogenitalleiste (Derivate des Mesoderms), sowie dem Gehirn und den Ganglien der Sinnesorgane (Derivate des Ektoderms) in WE2 TC RR-positiven Embryonen (Tag 12,5 d.p.c.).

3.1.2 Adulte Wt1-tTA Expression

Auch zur Untersuchung der Wt1-tTA Expression in adulten Mäusen wurden die Mausmodelle WE2 EZ und WE2 TC RR verwendet. Dazu präparierte man von doppeltransgenen WE2 EZ- bzw. tripeltransgenen WE2 TC RR-Mäusen (Aufzucht ohne Doxycyclin) die Nieren, Hoden und Ovarien. Die Organe wurden anschließend mit X-Gal gefärbt, um die Zellen sichtbar zu machen, die Wt1-tTA aktuell exprimieren oder einmal exprimiert haben. Nachfolgend stellte man von den X-Gal gefärbten Organen nach deren Dokumentation unter dem Binokular Paraffinschnitte her und färbte sie mit KER. Die Wt1-tTA Expression wurde abschließend unter dem Mikroskop analysiert.

3.1.2.1 Adulte Wt1-tTA Expression im WE2 EZ-Modell

In Nieren von doppeltransgenen WE2 EZ-Mäusen wurde nur in den Glomeruli der Nierenrinde eine starke Blaufärbung beobachtet (siehe Abb. 3.10). Eine höhere mikroskopische Auflösung wies darauf hin, dass es sich dabei um die Podozyten und die Bowman-Kapseln mit deren Endothelien handelt. In nicht doppeltransgenen Mäusen war keine Blaufärbung erkennbar.

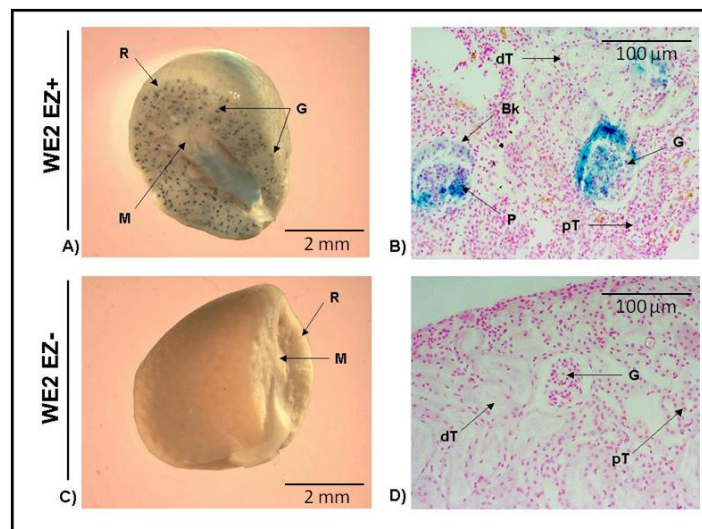


Abbildung 3.10: Expressionsdomäne von Wt1-tTA in adulten Nieren (3 Monate) von WE2 EZ-positiven und -negativen Mäusen

In **A)** und **B)** ist eine X-Gal gefärbte Niere einer WE2 EZ-positiven Maus dargestellt. **A)** Durch das Binokular wird eine Expression von Wt1-tTA (Blaufärbung) in allen Glomeruli (G) der Nierenrinde (R) sichtbar. Alle weiteren Zellen der Nierenrinde und des Nierenmarks (M) bleiben ungefärbt. **B)** Auf einem Paraffinschnitt ist in einer 20-fachen Vergrößerung eine Blaufärbung in den Bowman-Kapseln (Bk) und den Podozyten (P) erkennbar. Proximale Tubuli (pT) und distale Tubuli (dT) weisen keine Wt1-tTA Expression auf. **C)** und **D)** zeigen eine X-Gal gefärbte Niere einer WE2 EZ-negativen Maus. **C)** Die Nierenrinde (R) und das Nierenmark (M) erscheinen nach der Aufnahme mit dem Binokular nicht Wt1-tTA positiv. **D)** Auch auf einem Paraffinschnitt ist in einer 20-fach Vergrößerung keine Färbung der Glomeruli (G) und Tubuli (pT/dT) nachweisbar.

In den Hoden von doppeltransgenen WE2 EZ-Mäusen war makroskopisch eine deutliche Blaufärbung des intermediären Bereichs zwischen den Hodenkanälchen erkennbar (Interstitium). Zudem wies der epitheliale Überzug des Hodens (Deckepithel) X-Gal gefärbte Zellen auf. Unter dem Mikroskop wurden außerdem die blau gefärbten, hormonproduzierenden Leydig-Zellen im Interstitium und die Wt1-tTA positiven Sertoli-Zellen (Stütz- und Nährzellen) in den Hodenkanälchen identifiziert. Dagegen waren alle Zellstadien der Spermatogenese innerhalb der Hodenkanälchen Wt1-tTA negativ (siehe Abb. 3.11). Hoden von Kontrolltieren wiesen keine Blaufärbungen auf.

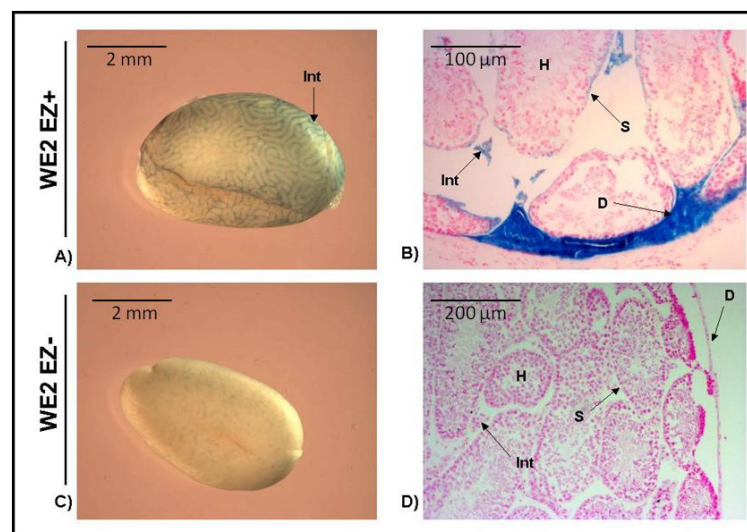


Abbildung 3.11: Expressionsdomäne von Wt1-tTA in adulten Hoden (3 Monate) von WE2 EZ-positiven und -negativen Mäusen

In **A)** und **B)** ist ein X-Gal gefärbter Hoden einer WE2 EZ-positiven Maus dargestellt. **A)** Eine Wt1-tTA-Expression (Blaufärbung) ist unter dem Binokular eindeutig im Interstitium (Int) zwischen den Hodenkanälchen erkennbar. **B)** Auf einem Paraffinschnitt weisen die Leydig-Zellen im Interstitium (Int) eine deutliche Wt1-tTA Expression auf (20-fach Vergrößerung). Auch die Sertoli-Zellen (S) der Hodenkanälchen (H) sind blau gefärbt. Zudem exprimiert das Deckepithel (D) Wt1-tTA. **C)** und **D)** zeigen einen X-Gal gefärbten Hoden einer WE2 EZ-negativen Maus. **C)** Unter dem Binokular ist keine Wt1-tTA Expression erkennbar. **D)** Auch auf einem Paraffinschnitt ist keine Färbung nachweisbar (10-fach Vergrößerung).

Ovarien von WE2 EZ-positiven Mäusen wiesen eine Wt1-tTA Expression in mehreren ovarialen Gewebeanteilen auf. Wt1-tTA positiv waren das spinözelluläre Bindegewebe des Ovars (Stroma), sowie einzelne Granulosa-Zellen in Gelbkörpern und primären Follikeln (siehe Abb. 3.12). Zudem zeigten einige Oozyten eine schwache Blaufärbung. In den Ovarien der Kontrolltiere waren keine blau gefärbten Zellen erkennbar.

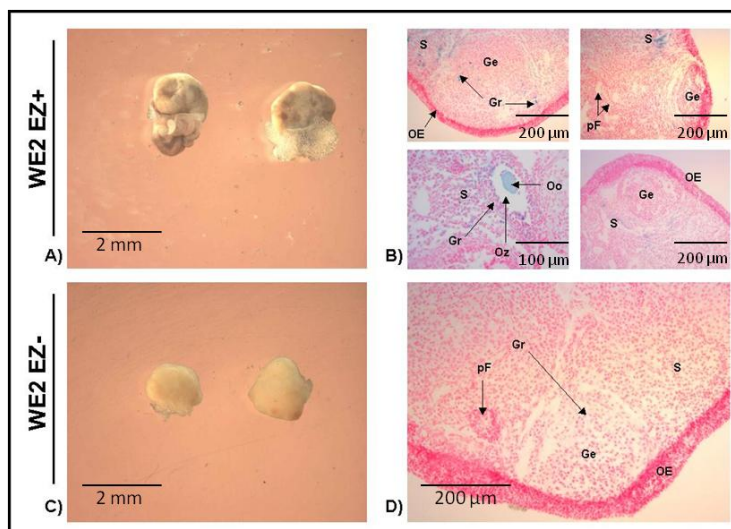


Abbildung 3.12: Expressionsdomäne von Wt1-tTA in adulten Ovarien (3 Monate) von WE2 EZ-positiven und -negativen Mäusen

In **A)** und **B)** sind X-Gal gefärbte Ovarien einer WE2 EZ-positiven Maus zu sehen. Wt1-tTA exprimierende Zellen sind blau gefärbt. **A)** Eine Wt1-tTA Expression (Blaufärbung) ist unter dem Binokular nur diffus erkennbar und keiner Gewebestruktur zuzuordnen. **B)** Auf den Paraffinschnitten ist die Wt1-tTA Expression in WE2 EZ-positiven Ovarien besser zu erkennen. So weisen stromale Zellen (S), einzelne Granulosa-Zellen (Gr) von Gelbkörpern (Ge) und primären Follikeln eine Wt1-tTA Expression auf. Zudem sind in einzelnen primären Follikeln die Oozyten (Oo) mit dessen Oozytenplasma (Oz) schwach blau gefärbt. Keine Wt1-tTA Expression ist in primordialen Follikeln (pF) und dem ovarialen Epithelium (OE) erkennbar. Bis auf die Abbildung unten links (20-fache Vergrößerung) sind alle anderen Abbildungen in einer 10-fach Vergrößerung aufgenommen worden. In **C)** und **D)** sind X-Gal gefärbte Ovarien einer WE2 EZ-negative Maus dargestellt. **C)** Im Binokular ist keine Blaufärbung WE2 EZ-negativer Ovarien erkennbar. **D)** Auch in einer 10-fach Vergrößerung ist keine Wt1-tTA Expression nachzuweisen.

In adulten Mäusen ist die Wt1-Expression auf hochspezialisierte Zellen beschränkt (Pritchard-Jones *et. al.*, 1990; Pelletier *et. al.*, 1991). Dazu gehören u.a. die Podozyten der Niere, die Sertoli-Zellen des Hodens, sowie die Granulosa-Zellen des Ovars. Diese Zellen wiesen auch im WE2 EZ-Modell eine Wt1-tTA Expression auf und sprechen für eine Wt1-analoge Expressionsdomäne der WE2-Effektor-Mauslinie. Die zu beobachtende Wt1-tTA Expression in den Leydig-Zellen, dem Deckepithel des Hodens, sowie den stromalen Zellen und den Oozyten des Ovars sind in der Literatur noch nicht beschrieben.

3.1.2.2 Adulte Wt1-tTA Expression im WE2 TC RR-Modell

Im Fall der Untersuchung der Wt1-tTA Expression in den Nieren von tripeltransgenen WE2 TC RR-Mäusen konnte eine bis auf wenige Bereiche komplett blau gefärbte Niere beobachtet werden (siehe Abb. 3.13), so dass eine Wt1-tTA Expression in nahezu allen Zellen der Nierenrinde und des Nierenmarks stattgefunden haben muss. So wurde bei der Analyse der hergestellten Paraffinschnitte unter dem Mikroskop erkennbar, dass alle Glomeruli und fast alle proximalen und distalen Tubuli Wt1-tTA exprimierten. Auch die meisten Tubuli der Henle-

Schleife exprimierten Wt1-tTA, wohingegen die Sammelrohre nicht Wt1-positiv waren (Daten nicht gezeigt). Die Nieren von Kontrolltieren wiesen keine Wt1-tTA Expression auf.

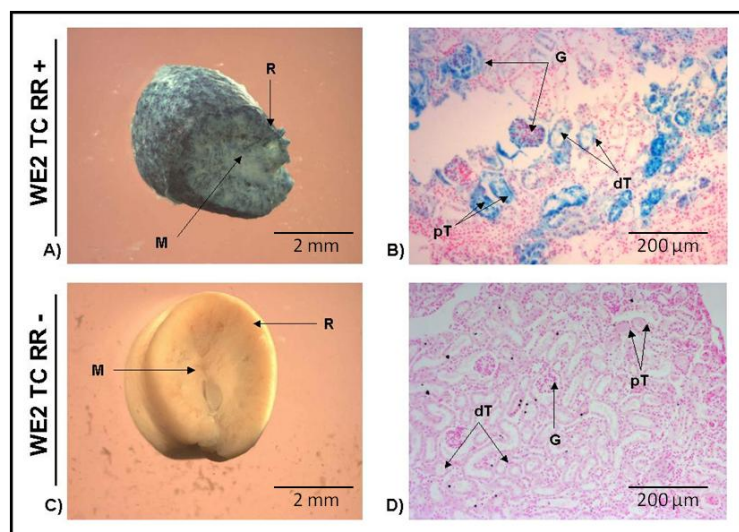


Abbildung 3.13: Expressionsdomäne von Wt1-tTA in adulten Nieren (3 Monate) von WE2 TC RR-positiven und -negativen Mäusen

In **A**) und **B**) ist eine X-Gal gefärbte Niere einer WE2 TC RR-positiven Maus dargestellt. **A**) Unter dem Binokular ist eine Wt1-tTA Expression (Blaufärbung) in fast allen Zellen der Nierenrinde (R) und des Nierenmarks (M) zu erkennen. **B**) In einer 10-fachen Vergrößerung ist auf einem Paraffinschnitt eine Blaufärbung in allen Glomeruli (G) und fast allen proximalen und distalen Tubuli (pT/dT) nachweisbar. **C**) und **D**) zeigen die Wt1-tTA Expression in einer Niere einer WE2 TC RR-negativen Maus. **C**) Unter dem Binokular ist keine Blaufärbung der Nierenrinde (R) und des Nierenmarks (M) zu erkennen. **D**) Auch in einer 10-fach Vergrößerung sind auf einem Paraffinschnitt keine Wt1-tTA positiven Glomeruli (G), sowie proximalen und distalen Tubuli (pT/dT) nachweisbar.

Im Gegensatz zu der unterschiedlichen Expression von Wt1-tTA in den Nieren beider Mausmodelle, wiesen die Hoden von Mäusen des WE2 EZ bzw. WE2 TC RR-Modells eine fast identische Blaufärbung auf (siehe Abb. 3.11 bzw. 3.14). Auch in tripeltransgenen WE2 TC RR-Hoden wurde makroskopisch eine Wt1-tTA Expression im Interstitium und im Deckepithel beobachtet. Zudem waren unter dem Mikroskop eindeutig die blau gefärbten Leydig-Zellen des Interstitiums und die Sertoli-Zellen im Randbereich der Hodenkanälchen sichtbar. Wie auch schon im WE2 EZ-Modell exprimierten auch im WE2 TC RR-Modell alle anderen Zellen der Kanälchen kein Wt1-tTA. Ebenfalls keine Wt1-tTA Expression konnte in Hoden von Kontrolltieren detektiert werden.

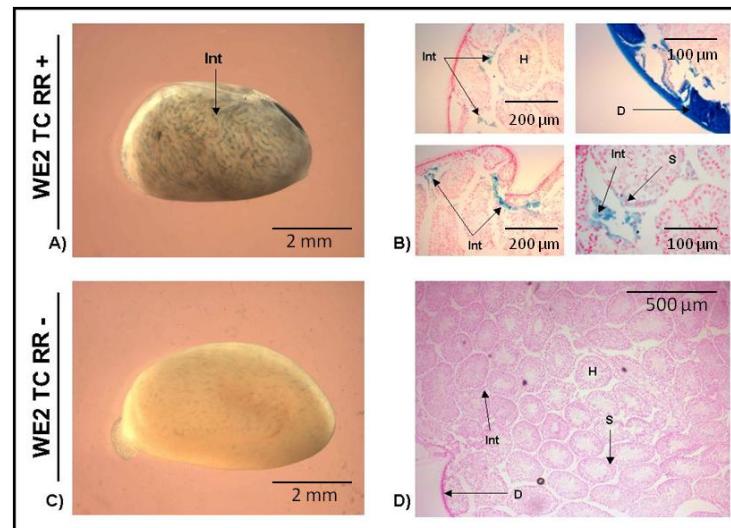


Abbildung 3.14: Expressionsdomäne von Wt1-tTA in adulten Hoden (3 Monate) von WE2 TC RR-positiven und -negativen Mäusen

In **A)** und **B)** ist der X-Gal gefärbte Hoden einer tripeltransgenen Maus dargestellt. Wt1-tTA exprimierende Zellen sind blau gefärbt. **A)** Unter dem Binokular ist das blau gefärbte Interstitium (Int) deutlich erkennbar. **B)** Eine genauere Lokalisation der Wt1-tTA Expression ist unter dem Mikroskop auf den angefertigten Paraffinschnitten möglich. Wt1-tTA positiv sind die Leydig-Zellen im Interstitium (Int), sowie die Sertoli-Zellen (S) der Hodenkanälchen (H). Auch das Deckepithel (D) ist in manchen Abschnitten des Hodens blau gefärbt. Dabei sind die beiden rechten Abbildungen mit einer 20-fachen Vergrößerung aufgenommen worden und die beiden linken mit einer 10-fachen Vergrößerung. In **C)** und **D)** ist der X-Gal gefärbte Hoden einer nicht tripeltransgenen Maus dargestellt. **C)** Unter dem Binokular ist keine Blaufärbung erkennbar. **D)** Auch auf einem Paraffinschnitt ist keine Wt1-tTA Expression nachweisbar (4-fach Vergrößerung).

Die Wt1-tTA Expression in Ovarien von tripeltransgenen WE2 TC RR-Ovarien ähnelte dem der WE2 EZ-Ovarien. Allerdings war die Blaufärbung in wesentlich mehr Zellen nachweisbar als in den Ovarien der doppeltransgenen Tiere. So wurden in primären Follikeln und Gelbkörpern nahezu alle Granulosa-Zellen blau gefärbt (siehe Abb. 3.15). Im Vergleich dazu exprimierten in WE2 EZ-Ovarien nur einzelne Granulosa-Zellen Wt1-tTA. Zudem waren in WE2 TC RR-Ovarien auch die Granulosa-Zellen von einzelnen sekundären Follikeln Wt1-tTA positiv, welche im anderen Modell nicht blau gefärbt waren. Des Weiteren konnte neben den gefärbten Granulosa-Zellen wiederum eine Expression von Wt1-tTA im Stroma, sowie in einzelnen Oozyten nachgewiesen werden. Keine Wt1-tTA Expression war in den Ovarien von nicht tripeltransgenen WE2 TC RR-Ovarien erkennbar.

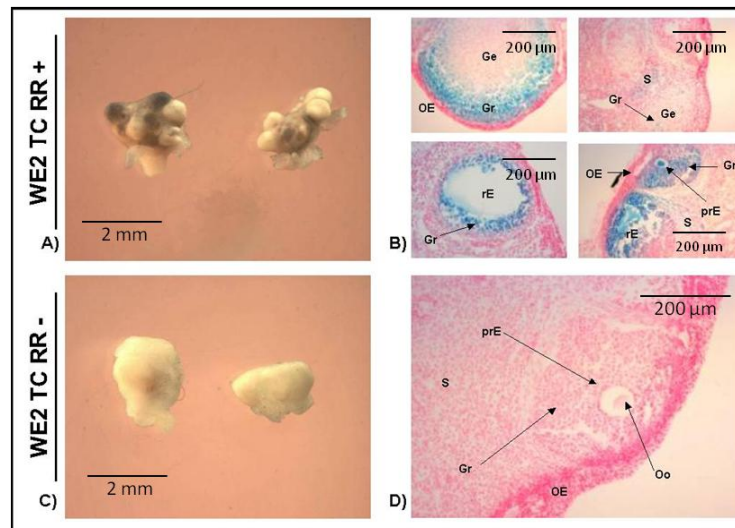


Abbildung 3.15: Expressionsdomäne von Wt1-tTA in adulten Ovarien (3 Monate) von WE2 TC RR-positiven und -negativen Mäusen

In **A)** und **B)** sind X-Gal gefärbte Ovarien einer WE2 TC RR-positiven Maus zu sehen. Wt1-tTA exprimierende Zellen sind blau gefärbt. **A)** Die tripeltransgenen WE2 TC RR-Ovarien färben sich stark blau. **B)** In einer 10-fachen Vergrößerung ist auf Paraffinschnitten die Wt1-tTA Expression in fast allen Granulosa-Zellen (Gr) von Gelbkörpern (Ge), primären Eizellen (pE) und reifen Eizellen (rE) nachweisbar. Auch einzelne stromale Zellen (S) sind Wt1-tTA positiv. Lediglich das ovariale Epithelium weist keine Blaufärbung auf. In **C)** und **D)** sind X-Gal gefärbte Ovarien von Kontrolltieren dargestellt. **C)** Unter dem Binokular ist keine Wt1-tTA Expression erkennbar. **D)** Auch unter dem Mikroskop (10-fach Vergrößerung) wird keine Blaufärbung in Oozyten (Oo), primären Eizellen (pE), Granulosa-Zellen (Gr), stromalen Zellen (S) und dem ovarialen Epithelium (OE) nachgewiesen.

Die Ergebnisse der Analysen der adulten Wt1-tTA Expression im WE2 TC RR-Modell ähnelten denen des WE2 EZ-Modells. Auch in diesem Modell war die Expression von Wt1-tTA meistens auf hochspezialisierte Zellen beschränkt. Eine Ausnahme stellte die zu beobachtende Wt1-tTA Expression in den Nieren von WE2 TC RR-positiven Mäusen dar. Sie ist darauf zurückzuführen, dass Wt1 während der Nephrogenese an Tag 11,5 *d.p.c.* im metanephrischen Mesenchym exprimiert wird, aus dem fast alle Elemente der Nephrone entstehen (Armstrong *et. al.*, 1993; Übersicht: Rivera und Haber, 2005). Dies kann nach der Färbung mit X-Gal zu einer fast kompletten Blaufärbung von adulten WE2 TC RR-positiven Nieren führen. Somit sprachen auch diese Ergebnisse für die Induzierbarkeit und Wt1-analogen Expressionsdomäne des WE2-Transgens.

Zusammenfassend konnte nach der Charakterisierung der WE2-Effektor-Mauslinie festgehalten werden, dass die embryonale und adulte Expressionsdomäne von Wt1-tTA weitgehend mit der Expression von endogenen Wt1 übereinstimmt. Zusammen mit dem Beweis der Induzierbarkeit und der Aktivität des WE2-Transgens waren somit die Voraussetzungen gegeben, dass es unter der Kontrolle der WE2-Effektor-Mauslinie zur Aktivierung von tTA-regulierbaren Transgenen kommt, die einen positiven Einfluss auf die Wilms-Tumorgenese haben, so dass in den Wt1-

exprimierenden Nierenvorläuferzellen des metanephrischen Mesenchyms eine Wilms-Tumorerkrankung induziert werden kann.

3.2 Herstellung und Charakterisierung von konditional reversiblen Wilms-Tumor-Modellen

3.2.1 Herstellung und Analyse des WE2 DDS-Modells

Der erste experimentelle Ansatz zur Herstellung eines murinen Wilms-Tumors war das WE2 DDS-Modell. Mit diesem Modell sollte ein reversibler Funktionsverlust von *Wt1* durch einen dominant-negativen Effekt einer *Wt1*-Punktmutation ausgeübt werden (Hastie *et. al.*, 1992; Bardeesy *et. al.*, 1994; Moffet *et. al.*, 1995), so dass ein DDS simuliert werden kann, welches mit einem erhöhten Risiko einer Wilms-Tumorerkrankung assoziiert ist (Pelletier *et. al.*, 1991 a).

Um nun dieses Syndrom zu simulieren, sollten die zur Verfügung stehenden transgenen Mauslinien WE2, DDS2 und DDS4 (siehe Material und Methoden 2.1.11) so verpaart werden, dass doppeltransgene Mäuse des WE2 DDS-Modells entstehen. In diesen Tieren kann es nach Entzug von Doxycyclin durch die *Wt1*-analoge tTA-Expression des WE2-Transgens zur Bindung des tTA an den tTA-regulierbaren Promotor der Transgene DDS2 bzw. DDS4 kommen. Durch eine anschließende Transkription und Translation des DDS-Transgens wird eine Punktmutante von *Wt1* (R394Q) exprimiert, die den zuvor beschriebenen dominant-negativen Effekt auf die *Wt1*-Funktion ausüben kann. Nachfolgend könnte dies zur Fehlregulation von *Wt1*-Zielgenen führen, die eine Entstehung des Denys-Drash Syndroms (DDS) mit assoziiertem Wilms-Tumor begünstigt. Das WE2 DDS-Modell ist in Abbildung 3.16 genauer beschrieben.

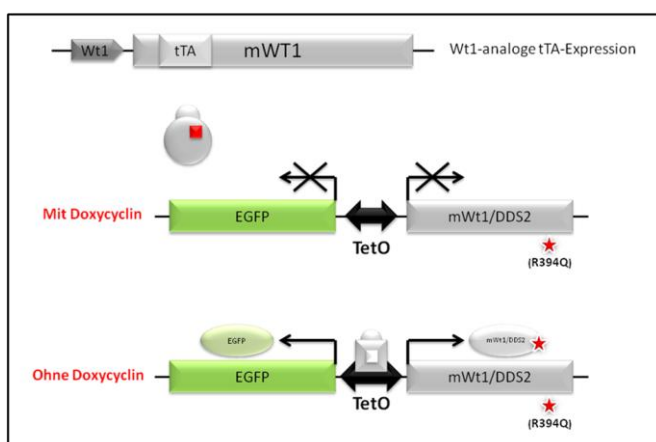


Abbildung 3.16: Schematische Darstellung des Wilms-Tumor-Modells WE2 DDS

In doppeltransgenen WE2 DDS-Mäusen kommt es durch den *Wt1*-Promotor des WE2-Transgens zur zeitlichen und räumlichen *Wt1*-analogen Expression des tetrazyklinabhängigen Transaktivators (tTA). In Anwesenheit von Doxycyclin ändert der tTA seine Konformation und es kommt zu keiner Bindung dieses Aktivators an den tTA regulierten Promotor (TetO) des DDS-Transgens. Dadurch bleibt dessen Transkription und Translation aus. In Abwesenheit von Doxycyclin ist eine Bindung von tTA an den TetO-Promotor möglich, wodurch es nachfolgend zur Expression des DDS-Transgens kommt und

neben EGFP auch die *Wt1*-Punktmutante (R394Q) exprimiert wird. Durch den dominant-negativen Effekt dieser *Wt1*-Punktmutante kann es zur Entwicklung eines DDS mit assoziiertem Wilms-Tumor kommen. Generell ist in dieser Abbildung das WE2 DDS-Modell anhand des DDS2-Transgens beschrieben. Es bewirkt denselben Effekt wie das DDS4-Transgen. Der einzige Unterschied besteht darin, dass die beiden Mauslinien aus unterschiedlichen Pronucleus-Injektionen (Klon 2 und 4) bei der Generierung dieser transgenen Mäuse entstanden sind.

Zur Generierung von doppeltransgenen WE2 DDS-Mäusen wurden WE2-positive Weibchen mit DDS2-positiven Männchen unter Doxycyclingabe bzw. WE2-positive Weibchen mit DDS4-positiven Männchen ohne Doxycyclingabe verpaart. Doppeltransgene WE2 DDS2-Mäuse sollten durch die Gabe von Doxycyclin kein DDS mit dessen Symptome entwickeln. Dagegen bestand in WE2 DDS4-positiven Mäusen durch die Abwesenheit von Doxycyclin die Möglichkeit, dass sich ein DDS entwickelt und sich nachfolgend Symptome wie z.B. Wilms-Tumore, Geschlechtsanomalien und diverse Glomerulopathien manifestieren.

Daher beobachtete man die Schwangerschaften der Verpaarungen genauso wie die aus ihnen resultierenden Jungtiere und deren Geschlechterverteilung. Nachfolgend wurden Kontroll- und Versuchstiere nach der achten Lebenswoche präpariert, um zum einen die Geschlechtsentwicklung zu beurteilen und zum anderen das Vorhandensein von Wilms-Tumoren zu überprüfen. Zudem entnahm man die Nieren für weitere Analysen. So sollten neben histologischen Analysen zur Feststellung eines möglichen Wilms-Tumors (nephrogene Reste oder triphasisches Tumorgewebe) auch RNA und Proteine aus dem Nierengewebe isoliert werden, um durch semiquantitative PCR und *Western blot*-Analysen die Expression der Transgene und deren möglichen Effekte zu beurteilen. Der Versuchsablauf und alle Verpaarungen dieses Modells sind in Abbildung 3.17 dargestellt und beschrieben.

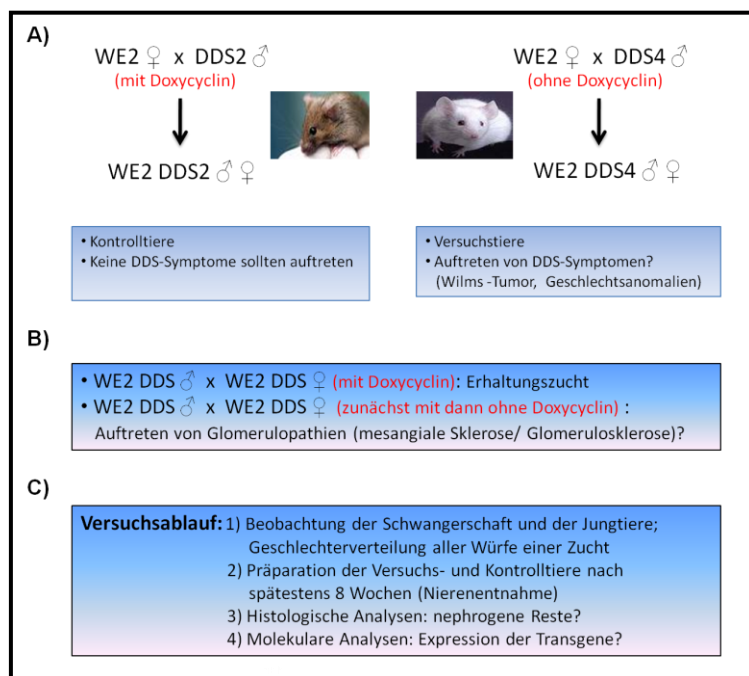


Abbildung 3.17: Verpaarungsschema und Versuchsablauf zur Herstellung eines Wilms-Tumors durch das murine WE2 DDS-Modell

In dieser Abbildung ist neben den Verpaarungen zur Herstellung und Analyse des Wilms-Tumor-Modells WE2 DDS auch der Versuchsablauf beschrieben. Während in **A)** die Zuchten für die ersten Analysen abgebildet sind, werden in **B)** die Zuchtangaben zum Erhalt von doppeltransgenen Nachkommen dargestellt. Der Abschnitt **C)** zeigt die chronologische Abfolge der Analysen dieses Wilms-Tumor-Modells.

Neben den bereits beschriebenen Verpaarungen sollten auch Erhaltungszuchten von WE2 DDS2-positiven bzw. WE2 DDS4-positiven Weibchen und Männchen angesetzt werden. Die Erhaltungszuchten wurden dabei zum einen mit ständiger Doxycyclingabe und zum anderen mit einem Doxycyclinentzug nach dem Absetzen der Jungtiere von den Eltern durchgeführt. Im

letzteren Fall könnten auch bei doppeltransgenen Nachkommen dieser Verpaarung Symptome des DDS auftreten, die sich z.B. in einer mesangialer Sklerose und einer Glomerulosklerose manifestieren (siehe Abb. 3.17). Daher sollten mit diesen Tieren genau dieselben zuvor beschriebenen histologischen und molekularen Untersuchungen durchgeführt werden, um die Funktionalität des WE2 DDS-Modell besser beurteilen zu können.

3.2.1.1 Auswertung der Genotypen und Geschlechterverteilung von Nachkommen des WE2 DDS-Modells

Insgesamt gingen aus der Verpaarung von WE2-positiven Weibchen mit DDS2-positiven Männchen (mit Doxycyclin) 33 Jungtiere hervor, von denen acht Tiere den Genotyp WE2 DDS2 besaßen. Von diesen acht Jungtieren waren sechs männlich und zwei weiblich (siehe Tabelle 3.1). Bei der Verpaarung von WE2-positiven Weibchen mit DDS4-positiven Männchen (ohne Doxycyclin) wurden insgesamt 25 Tiere geboren, wobei vier den Genotyp WE2 DDS4 aufwiesen. Auch bei dieser Zucht wurden mehr doppeltransgene Männchen als Weibchen geboren. Von den vier WE2 DDS4-positiven Nachkommen waren drei männlich und eins weiblich.

Tabelle 3.1: Zusammenfassung der Analysen der Zuchten WE2 x DDS2 (mit Doxycyclin) und WE2 x DDS4 (ohne Doxycyclin)

Die Tabelle zeigt in Abschnitt **A)** die Auswertung der Verpaarung von WE2-positiven Weibchen mit DDS2-positiven Männchen, die mit Doxycyclin durchgeführt worden ist. Abschnitt **B)** der Tabelle listet in gleicher Weise die Angaben zur Zucht von WE2-positiven Weibchen mit DDS4-positiven Männchen auf, deren Verpaarung ohne Doxycyclin durchgeführt worden ist. **Abkürzungen und Symbole:** (dtg): doppeltransgen; (♂): Männchen; (♀): Weibchen.

A)

Verpaarung: WE2 x DDS2 (mit Doxycyclin)	Tieranzahl
Anzahl geborener Nachkommen	33
Anzahl geborener Männchen	19
Anzahl geborener Weibchen	14
Anzahl dtg-Nachkommen	8 (6 ♂ und 2 ♀)
Anzahl nicht dtg-Nachkommen	25

B)

Verpaarung: WE2 x DDS4 (ohne Doxycyclin)	Tieranzahl
Anzahl geborener Nachkommen	25
Anzahl geborener Männchen	15
Anzahl geborener Weibchen	10
Anzahl dtg-Nachkommen	4 (3 ♂ und 1 ♀)
Anzahl nicht dtg-Nachkommen	21

Zusammenfassend konnte festgehalten werden, dass es zu keiner Verschiebung der Geschlechterverteilung bei den Nachkommen der Verpaarung von WE2-positiven Weibchen mit DDS4-positiven Männchen ohne Doxycyclin kam. Es wurden sogar mehr Männchen als Weibchen geboren, was vergleichbar mit der Zucht der Kontrollverpaarung mit Doxycyclin ist.

3.2.1.2 Phänotyp der Mäuse des WE2 DDS-Modells

Während der Schwangerschaft wurden zwischen der Kontrollverpaarung (WE2 x DDS2 mit Doxycyclin) und der Verpaarung, bei der es zur Entstehung des DDS kommen kann (WE2 x DDS4 ohne Doxycyclin), keine Auffälligkeiten und Unterschiede beobachtet. Es wurden in gleicher Weise und Anzahl in regelmäßigen Abständen von drei Wochen Jungtiere geboren, die bei der Geburt phänotypisch unauffällig waren. Auch im weiteren Verlauf konnte eine normale Entwicklung der Nachkommen beider Verpaarungen festgestellt werden. WE2 DDS4-positive Tiere, die ohne Doxycyclin aufgewachsen waren, entwickelten also keinen äußerlich sichtbaren Phänotyp. Daher wurden sie, zusammen mit WE2 DDS2-positiven Tieren, die mit Doxycyclin aufgewachsen waren, im Alter von 8 Wochen präpariert, um makroskopische Veränderungen der Organe zu beurteilen. Zum Vergleich präparierte man Kontrolltiere.

Bei der Präparation der doppeltransgenen Nachkommen beider Verpaarungen waren keine Organe phänotypisch auffällig. Neben der normalen Geschlechtsentwicklung wiesen auch die Nieren der Jungtiere beider Verpaarungen keine Veränderungen auf.

Somit stellten diese Ergebnisse die Expression der DDS-Transgene in Frage, da bei einer Simulation des DDS Wilms-Tumore und XY-Hermaphroditismen auftreten sollten (Pelletier *et. al.*, 1991 a). Über morphologische und molekulare Veränderungen in den Nieren, die auf eine Funktionalität des Modells hinweisen würden, konnten nur weitere histologische und molekulare Untersuchungen Aufschluss geben. Dazu wurden von allen doppeltransgenen Tieren beider Verpaarungen, sowie Kontrolltieren gleichen Alters, die Nieren entnommen.

3.2.1.3 Histologische und molekulare Analysen der Nieren von WE2 DDS-positiven Tieren

Von Kontrolltieren, sowie von WE2 DDS2- und WE2 DDS4-positiven Mäusen, die mit bzw. ohne Doxycyclin aufgewachsen waren, wurden beide Nieren entnommen. Jeweils eine Niere wurde für histologische Analysen fixiert und in Paraffin eingebettet, so dass Schnitte für anschließende HE-Färbungen hergestellt werden konnten. Diese sollten nachfolgend nach dem Vorhandensein von nephrogenen Resten, triphasischen Wilms-Tumorgewebe und Glomerulopathien untersucht werden, die für eine Simulation eines DDS sprechen würden (Pelletier *et. al.*, 1991 a).

Die andere Niere wurde für molekulare Analysen halbiert, so dass aus einem Teil RNA und aus dem anderen Teil Proteine isoliert werden konnten. Die RNA sollte nach Umschreiben zu cDNA (RT-PCR) Aufschluss über die Expression der Transgene auf RNA-Ebene geben (semiquantitative PCR). Des Weiteren sollte durch die Isolation von Proteinen ein möglicher molekularer Effekt der Wt1-Punktmutante auf Proteinebene untersucht werden (*Western blot*-Analysen von Wt1-Zielgenen), um die Aktivität der DDS-Transgene einschätzen zu können.

3.2.1.3.1 Histologische Analyse von WE2 DDS-positiven Nieren

Nach der Beurteilung der HE-gefärbten Nierenparaffinschnitte wiesen weder die WE2 DDS2-positiven Nieren (mit Doxycyclin) noch die WE2 DDS4-positiven Nieren (ohne Doxycyclin) eine morphologische Veränderung auf. Wie in den HE-gefärbten Nierenparaffinschnitten der wildtypischen Tiere waren in der Rinde der Nieren beider Verpaarungen nur normal entwickelte Glomeruli, sowie proximale und distale Tubuli zu erkennen (siehe Abb. 3.18). Auch das Mark wies keine morphologischen Veränderungen auf. Wie im Wildtyp waren nur normal entwickelte Sammelrohre und Tubuli der Henle-Schleife erkennbar. Insgesamt konnten also keine nephrogenen Reste, Glomerulopathien oder triphasisches Tumorgewebe nachgewiesen werden, die auf einen Wilms-Tumor oder ein DDS hingewiesen hätten.

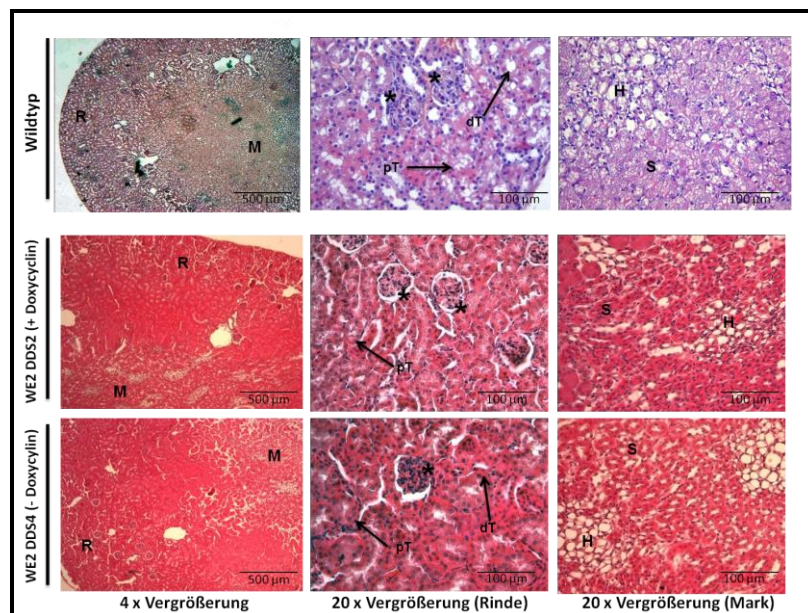


Abbildung 3.18: Unauffällige Histologie der Nieren von WE2 DDS2 (mit Doxycyclin)- und WE2 DDS4 (ohne Doxycyclin)-positiven Tieren

In dieser Abbildung sind die HE-gefärbten Nierenparaffinschnitte eines wildtypischen, eines WE2 DDS2 (mit Doxycyclin)-positiven und eines WE2 DDS4 (ohne Doxycyclin)-positiven Tieres dargestellt. Es sind keine Veränderungen zu erkennen. **Abkürzungen und Symbole:** (dT) distale Tubulus; (H): Tubuli der Henle-Schleife (M): Nierenmark; (pT) proximale Tubulus; (R): Nierenrinne; (S): Sammelrohre; (*): Glomerulus.

Auch bei denen auf gleicher Weise durchgeführten histologischen Untersuchungen der Erhaltungszuchten (siehe Abb. 3.17) konnten keine Hinweise auf mögliche DDS-Symptome festgestellt werden. So wurden in den untersuchten Nieren keine Glomerulopathien wie z. B. eine mesangiale Sklerose oder eine Glomerulosklerose beobachtet (Daten nicht gezeigt). Die somit in Frage gestellte Aktivität des DDS-Transgens sollte daher in nachfolgenden molekularen Analysen untersucht werden.

3.2.1.3.2 Molekulare Analyse von WE2 DDS-positiven Nieren

Bei den molekularen Analysen sollte zunächst die Expression der Transgene auf RNA-Ebene durch semiquantitative PCR-Analysen untersucht werden. Neben der RNA-Präparation der oben beschriebenen Nieren mit entsprechendem Genotyp und Doxycyclingabe (siehe Ergebnisse 3.2.1.3.1) wurde dazu auch RNA von Tieren der Erhaltungszuchten WE2 DDS4 x WE2 DDS4 (mit Doxycyclin) und WE2 DDS2 x WE2 DDS2 (zunächst mit dann ohne Doxycyclin) isoliert. Somit war eine bessere Einschätzung der Induzierbarkeit der beiden DDS-Transgene möglich.

Der Nachweis einer Expression des WE2-Transgens (*tTA*-PCR) war in allen Kontrollen zu beobachten, die auch einen positiven *tTA*-Nachweis in zuvor durchgeführten Genotypisierungs-PCRs hatten. Auch alle WE2 DDS2- und WE2 DDS4-positiven Tiere (mit oder ohne Doxycyclin) wiesen eine Expression des *tTA* auf. Keine *tTA*-Expression war in den Nieren von Kontrolltieren nachweisbar, die nach Genotypisierungs-PCRs nur DDS2 bzw. DDS4-positiv waren (siehe Abb. 3.19).

Die Expression des DDS2 bzw. DDS4-Transgens (DDS-PCR) konnte nur in WE2 DDS2-positiven und WE2 DDS4-positiven Mäusen nachgewiesen werden, die ohne Doxycyclin aufgewachsen waren (WE2 DDS4 -Dox) oder denen es nach den Absetzen von den Eltern entzogen worden war (WE2 DDS2 -Dox). Zudem konnte festgestellt werden, dass es in WE2 DDS2-positiven Tieren zu einer höheren Expression des DDS-Transgens kam, als in WE2 DDS4-positiven Tieren. Alle anderen Nieren wiesen keine Aktivität dieses Transgens auf (siehe Abb.3.19).

Um Aussagen über die gesamte Menge der *Wt1*-RNA-Expression machen zu können, wurde eine semiquantitative *mWt1 Ex8/10*-PCR durchgeführt. Somit konnte mit Hilfe spezifischer Primer die Expression aller drei *Wt1*-Allele detektiert werden, die im Genom von einfachtransgenen Kontrolltieren und doppeltransgenen Tieren vorhanden waren (wildtypisches *Wt1*, WE2 und DDS2 bzw. DDS4). Im Normalfall sollte dabei in den WE2 DDS2- und WE2 DDS4-positiven Tieren, denen Doxycyclin entzogen worden war, eine höhere Gesamtexpression von *Wt1* nachweisbar sein, da drei anstatt zwei *Wt1*-Allele *Wt1* exprimieren. Doch unabhängig vom

Genotyp und der Doxycyclingabe schwankte die *Wt1*-Expression sehr stark. Eine deutlich erniedrigte oder erhöhte *Wt1*-Expression, die genau auf einen bestimmten Genotyp mit oder ohne Doxycyclingabe zutraf, konnte nicht festgestellt werden (siehe Abb. 3.19).

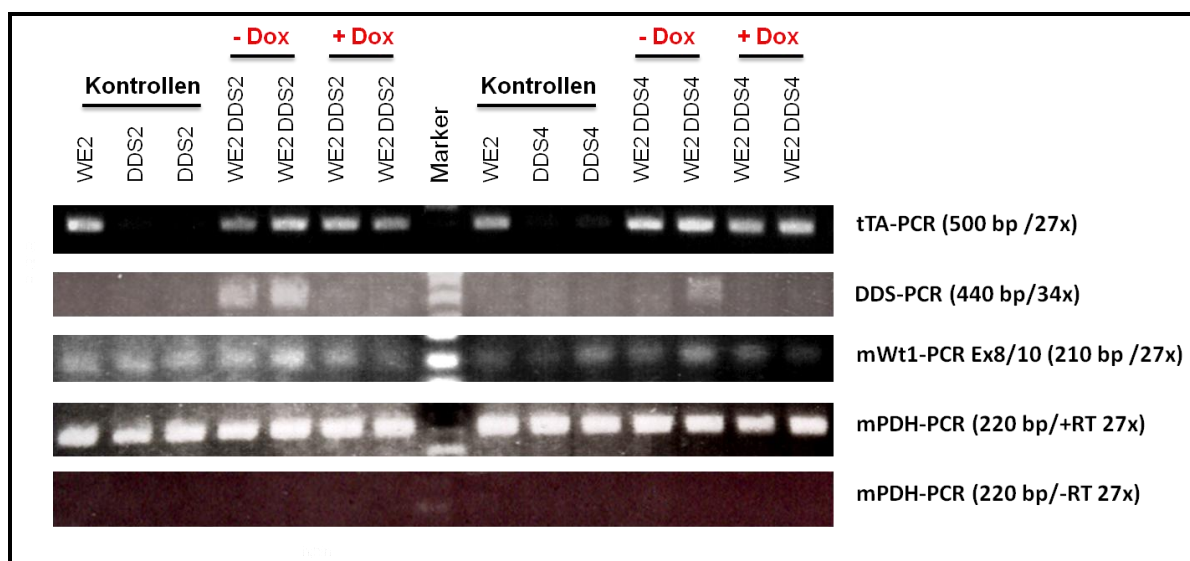


Abbildung 3.19: Nachweis der Expression der Transgene des WE2 DDS-Modells auf RNA-Ebene

In dieser Abbildung ist exemplarisch der Nachweis der Expression der Transgene des WE2 DDS2 bzw. WE2 DDS4-Modells auf RNA-Ebene mittels semiquantitativer PCR-Analysen dargestellt. Von links nach rechts sind Kontrollen und WE2 DDS-positive Nieren (ohne und mit Doxycyclin/ + bzw. - Dox) erkennbar. Durch einen Marker getrennt sind auf der linken Seite die Ergebnisse des WE2 DDS2-Modells dargestellt und auf der rechten Seite die des WE2 DDS4-Modells. Rechts neben den Abbildungen sind die Angaben zur jeweiligen semiquantitativen PCR, der Bandengröße des PCR-Produkts (bp = base pairs) und Zyklenanzahl der PCR zu finden. Durch die gleichmäßige Expression des Haushaltsgens *PDH* (*pyruvatdehydrogenase*) (mPDH +RT) bzw. dessen fehlende Expression (mPDH -RT) kann zum einen die gleiche Menge von eingesetzter RNA bewiesen und zum anderen eine Verunreinigung durch genomische DNA ausgeschlossen werden. **Abkürzungen:** (mPDH): murine *pyruvatdehydrogenase*; (+RT): mit Reverse Transkriptase; (-RT): ohne Reverse Transkriptase.

Die Analysen zur Expression der Transgene auf RNA-Ebene bewiesen, dass es in WE2 DDS2- und WE2 DDS4-positiven Mäusen zu einer durch Doxycyclin regulierbaren Überexpression der *Wt1*-Punktmutation (R394Q) kommt. Entsprechend des zuvor in Genotypisierungs-PCRs ermittelten Genotyps und je nach Gabe und Entzug von Doxycyclin wurden die Transgene WE2, DDS2 und DDS4 auf RNA-Ebene aktiviert und exprimiert. Allerdings hatte dies keine Auswirkungen auf die Gesamtexpression von *Wt1* auf RNA-Ebene. Generell schien die Expression des DDS-Transgens in WE2 DDS2-positiven Mäusen stärker zu sein, als in WE2 DDS4-positiven Mäusen, so dass nur diese Tiere zum Nachweis eines möglichen dominant-negativen Effekts auf Protein-Ebene analysiert wurden.

Zur Analyse der Auswirkung der Expression des DDS2-Transgens auf Protein-Ebene wurden aus Nieren von einfachtransgenen und WE2 DDS2-positiven Mäusen (Aufzucht mit und ohne Doxycyclin) Proteine isoliert. Nachfolgend sollte durch *Western blot*-Analysen neben der *Wt1*-

Expression auch die Expression der Wt1-Zielgene TGF- β (*Transforming Growth Factor- β*) und p21 (*CDK-Inhibitor 1*) untersucht werden, um einen möglichen dominant-negativen Effekt der Wt1-Punktmutante (R394Q) feststellen zu können.

Bei den Analysen der Wt1-Expression fiel auf, dass Wt1 unabhängig vom Genotyp und Doxycyclingabe gleich stark exprimiert wurde (siehe Abb. 3.20). Im Falle einer Expression des DDS2-Transgens sollte diese in den Nieren von WE2 DDS2-positiven Mäusen (ohne Doxycyclin) wesentlich höher sein, als in Kontrolltieren und doppeltransgenen Tieren, deren Zucht mit Doxycyclin durchgeführt worden ist, da Wt1 in WE2 DDS2-positiven Tieren (ohne Doxycyclin) von drei anstatt zwei Allelen exprimiert wird.

Auch die Expression von TGF- β war in allen untersuchten Nieren ähnlich und somit unabhängig vom Genotyp und Doxycyclingabe (siehe Abb. 3.20). TGF- β ist ein direktes Zielgen von WT1 und dessen Expression wird durch die Bindung des Transkriptionsfaktors WT1 inhibiert (Dey *et al.*, 1994). Durch einen dominant-negativen Effekt des DDS2-Transgens sollte daher in Nieren von WE2 DDS2-positiven Tieren, die ohne Doxycyclin aufgewachsen sind, eine Derepression des Wt1-Zielgens zu beobachten sein, die zu einer erhöhten TGF- β -Expression führt.

Der Nachweis eines dominant-negativen Effektes konnte auch bei den *Western blot*-Analysen der p21-Expression nicht festgestellt werden (siehe Abb. 3.20). Alle Nieren wiesen eine ähnliche Expression von p21 auf. Durch die Bindung des Transkriptionsfaktors WT1 wird normalerweise die Expression von p21 verstärkt (Englert *et al.*, 1997), so dass ein dominant-negativer Effekt des DDS2-Transgens die Induktion der p21-Expression aufheben sollte.

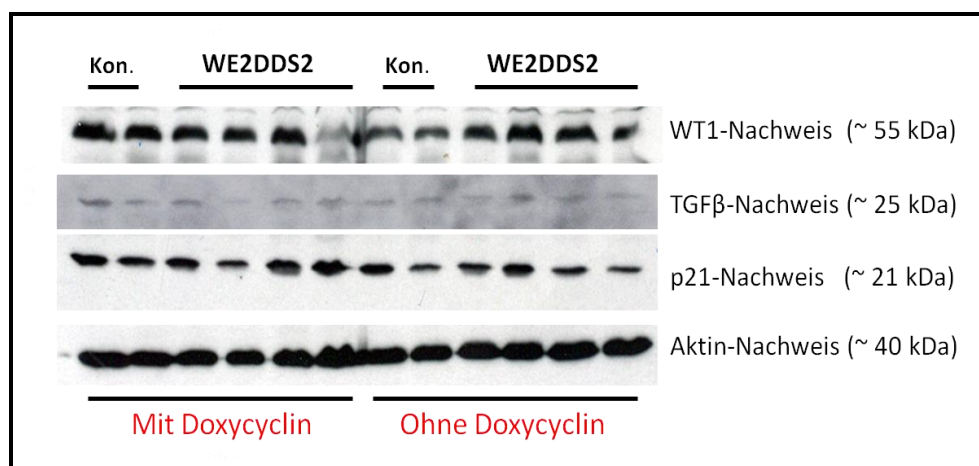


Abbildung 3.20: Die Expression des DDS2-Transgens bewirkt keinen dominant-negativen Effekt auf Protein-Ebene

Proteine aus Nieren von einfachtransgenen Tieren (Kon. = Kontrolltiere), sowie von WE2 DDS2-positiven Mäusen, die mit und ohne Doxycyclin aufgewachsen waren, wurden isoliert. Anschließend wurde in diesen Proben mit Hilfe von *Western blot*-Analysen die Expression von Wt1 und dessen Zielgenen (TGF- β und p21) untersucht. Zur Kontrolle der analysierten Gesamtproteinmenge analysierte man die Expression des Haushaltsgens Aktin analysiert. Die Expression von Aktin war in allen Nieren gleich (Angabe des Molekulargewichts der jeweiligen Proteine in Klammern).

Die Ergebnisse der *Western blot*-Analysen sprachen dafür, dass die auf RNA-Ebene beobachtete Expression des DDS2-Transgens keine Auswirkung auf Protein-Ebene hat. Weder eine erhöhte *Wt1*-Expression in Nieren von WE2 DDS2-positiven Mäusen, die ohne Doxycyclin aufgewachsen waren, noch ein dominant-negativer Effekt auf *Wt1*-Zielgene konnte festgestellt werden.

Die Analysen des WE2 DDS-Modells ließen darauf schließen, dass sich dieses Modell nicht zur Herstellung eines Wilms-Tumors eignet. Denn trotz regulierbarer Überexpression des DDS-Transgens übte die *Wt1*-Punktmutante R394Q keinen dominant-negativen Effekt auf *Wt1*-Zielgene aus, so dass kein DDS mit entsprechenden Symptomen simuliert werden konnte.

3.2.2 Herstellung und Analyse der Wilms-Tumor-Modelle WE2 TC bCat Δ Ex3 und WE2 LC bCat Δ Ex3

Der zweite experimentelle Ansatz zur Herstellung eines Wilms-Tumors war das WE2 TC bCat Δ Ex3- bzw. das WE2 LC bCat Δ Ex3-Modell. In beiden Modellen sollte es in *Wt1*-exprimierenden Zellen des metanephrischen Mesenchyms durch eine *Ctnnb1*-Mutation zur Aktivierung der kanonischen Wnt-Signalkaskade kommen. Die dadurch bedingte Deregulation dieses in der Entwicklung zentralen Signalwegs könnte in den sich differenzierten Zellen des metanephrischen Mesenchyms zum Verbleib und einer erhöhten Proliferation führen und nachfolgend die Entstehung eines triphasischen Wilms-Tumors begünstigen (Li *et. al.*, 2004; Fukuzawa *et. al.*, 2009).

Um nun die Modelle zu erhalten und zu analysieren, sollten die Mauslinien WE2, LC, TC und bCat Δ Ex3 (siehe Material und Methoden 2.1.11) so verpaart werden, das tripeltransgene WE2 TC bCat Δ Ex3- bzw. WE2 LC bCat Δ Ex3-Mäuse entstehen. In diesen Tieren kann es durch den *Wt1*-Promotor des WE2-Transgens zur zeitlichen und räumlichen *Wt1*-analogen Expression eines tetrazyklinabhängigen Transaktivators (tTA) kommen. Dieser kann ohne die Gabe von Doxycyclin in *Wt1*-tTA exprimierenden Zellen des metanephrischen Mesenchyms eine Cre-Rekombinase aktivieren (TC/LC-Transgen), wodurch das Exon 3 von *Ctnnb1* entfernt wird (bCat Δ Ex3-Transgen). Durch das Fehlen des dritten Exons werden wichtige Stellen zur Phosphorylierung des *Ctnnb1*-Proteins β -Catenin entfernt (Polakis, 1999), so dass eine Degradation dieses Proteins ausbleibt und es zur Aktivierung von kanonischen Wnt-Zielgenen kommt (Clevers, 2006). Somit könnte die Wilms-Tumorgenese nach der oben beschriebenen Theorie positiv beeinflusst werden. Generell nutzen beide Modelle eine Kombination des *Tet off*- und *Cre/loxP*-Systems (siehe Ergebnisse 3.1) und unterscheiden sich nur durch das Cre-

Rekombinase-Transgen (LC oder TC). Beide Modelle sind in Abbildung 3.21 anhand des WE2 TC bCat Δ Ex3-Modells beschrieben.

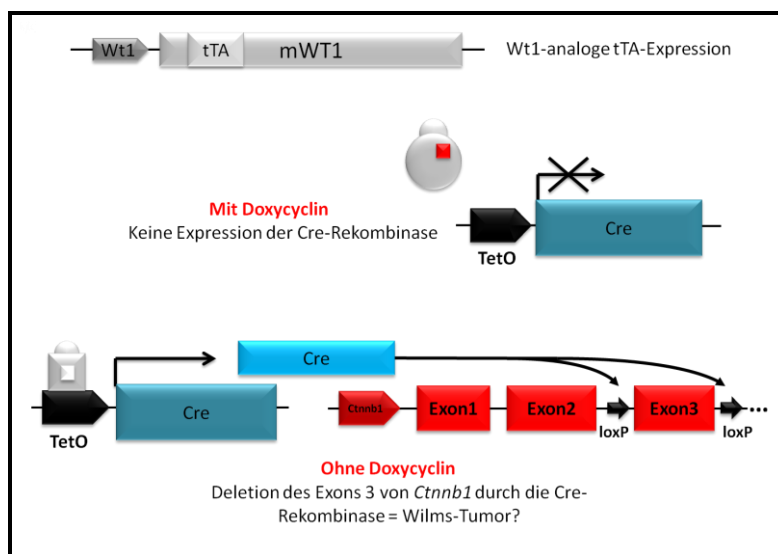


Abbildung 3.21: Schematische Darstellung des WE2 TC bCat Δ Ex3-Modells

In WE2 TC bCat Δ Ex3-positiven Mäusen kommt es durch den *Wt1*-Promotor des WE2-Transgens zur zeitlichen und räumlichen *Wt1*-analogen Expression eines tetrazyklinabhängigen Transaktivators (tTA). Der gebildetete tTA verändert durch die Anwesenheit von Doxycyclin seine Konformation und kann somit nicht an den tTA regulierten Promotor (TetO) des TC-Transgens (Cre) binden. Es kommt zu keiner Expression der Cre-Rekombinase. Dies ändert sich in Abwesenheit von Doxycyclin. Ohne dieses kann der tTA an den TetO-Promotor des TC-Transgens binden und es kommt zur nachfolgenden Expression der Cre-Rekombinase. Dieses Enzym erkennt die *locus of crossing-over of P1-sides (loxP)* im dritten Transgen des Modells (bCat Δ Ex3) und deletiert somit das Exon 3 von *Ctnnb1*. Nachfolgend wird dadurch ein Abbau β -Catenin verhindert und die kanonische Wnt-Signalkaskade dereguliert, so dass ein Wilms-Tumor entstehen kann.

Zur Generierung von tripeltransgenen WE TC bCat Δ Ex3-Mäusen verpaarte man WE2-positive Weibchen und TC bCat Δ Ex3^{+/+}-positiven Männchen mit Doxycyclin. Mit denen aus dieser Verpaarung resultierenden tripeltransgenen Weibchen und Männchen wurden anschließend zum einen Erhaltungszuchten durchgeführt und zum anderen *timed matings* angesetzt (siehe Abb. 3.22), bei denen man an jeweils unterschiedlichen Tagen der Schwangerschaft (Tag 0,5; 4,5; 6,5 und 10,5 *d.p.c.*) Doxycyclin entzog, um die Entstehung eines Wilms-Tumors zu induzieren.

Durch ein Absetzen von Doxycyclin an Tag 0,5 *d.p.c.* sollte das WE2 TC bCat Δ Ex3-Modell während der gesamten frühen embryonalen Entwicklung aktiv sein, so dass es durch die *Wt1*-analoge Aktivierung von β -Catenin zu Fehlbildungen oder dem intrauterinen Tod der Embryonen kommen kann (Grigoryan *et. al.*, 2008). Ein Absetzen von Doxycyclin an Tag 4,5 bzw. 6,5 *d.p.c.* könnte in den Embryonen eine Stabilisierung von β -Catenin kurz vor und nach dem Beginn der Metanephrogenese bewirken. Da *Wt1* während dieser Phase der Embryogenese im metanephrischen Mesenchym exprimiert wird (Armstrong *et. al.*, 1993), wäre somit die Entstehung nephrogener Reste möglich. Bei *timed matings* bei denen Doxycyclin an Tag 10,5

d.p.c. absetzt wird, sollte die Metanephrogenese der entstehenden Embryonen nicht zu beeinflussen sein. Nephrogene Reste sollten daher nicht entstehen, doch die späte Nephrogenese könnte beeinflusst werden (Übersicht: Rivera und Haber, 2005).

Bei allen *timed matings* beobachtet man den Verlauf der Schwangerschaften. Nachfolgend wurden die Nachkommen nach drei Wochen abgesetzt und genotypisiert, um die Anzahl an tripeltransgenen Tieren der *timed matings* mit unterschiedlichen Zeitpunkten des Doxycyclinzugs zu vergleichen. Abschließend präparierte man die tripeltransgenen Tiere nach dem dritten Lebensmonat, so dass sie histologisch und molekular untersucht werden konnten.

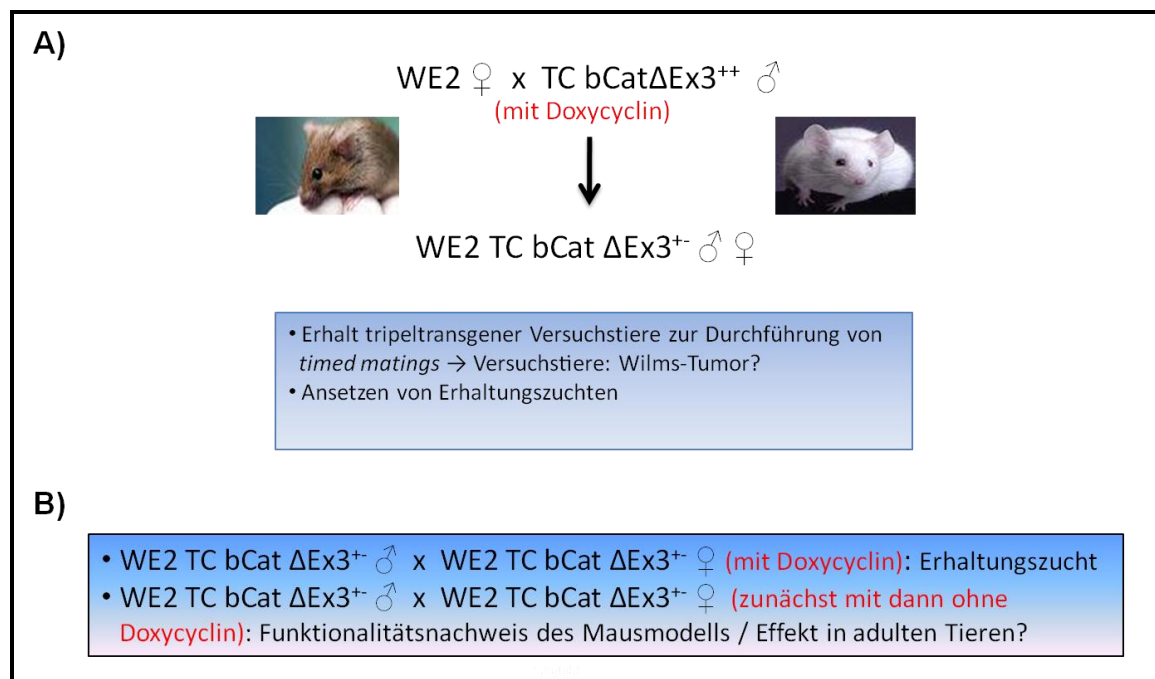


Abbildung 3.22: Verpaarungsschema zur Herstellung des WE2 TC bCatΔEx3-Modells

In dieser Abbildung ist das Verpaarungsschema zur Herstellung des WE2 TC bCatΔEx3-Modells und der nachfolgenden Erhaltungszuchten dargestellt. Während in **A)** die Zuchten für die Herstellung der ersten tripeltransgenen (ttg) Mäuse abgebildet sind, sind in **B)** die Zuchtangaben zum Erhalt von ttg-Nachkommen aufgeführt. Die Symbole ⁺ und ⁺⁺ geben an, ob das Transgen bCatΔEx3 heterozygot oder homozygot im Genom der Tiere integriert vorliegt.

Zur Generierung von tripeltransgenen WE LC bCatΔEx3-Mäusen wurden zunächst WE2 LC V1ko⁺⁺-positive Männchen mit bCatΔEx3⁺⁺-positiven Weibchen unter Doxycyclingabe zusammengesetzt. Die daraus resultierenden WE2 LC bCat⁺ V1ko⁺-positiven Männchen und Weibchen verpaarte man anschließend mit Doxycyclin, um WE2 LC bCatΔEx3⁺⁺-positive Mäuse zu erhalten (siehe Abb. 3.23).

Die aus der letzten Verpaarung resultierenden, tripeltransgenen Weibchen und Männchen sollten im Anschluss auf gleiche Weise, wie im WE2 TC bCatΔEx3-Modell, miteinander verpaart werden, um eine größere Anzahl an tripeltransgenen Tieren zu erhalten. Gleichzeitig wurden,

wie im WE2 TC bCat Δ Ex3-Modell, mit den zuerst generierten, tripeltransgenen Tieren *timed matings* durchgeführt und an Tag 0,5, 4,5, 6,5 und 10,5 *d.p.c.* Doxycyclin abgesetzt, um die Wilms-Tumorgenese zu induzieren. Die weitere Abfolge der Analysen entsprach der des WE2 TC bCat Δ Ex3-Modells.

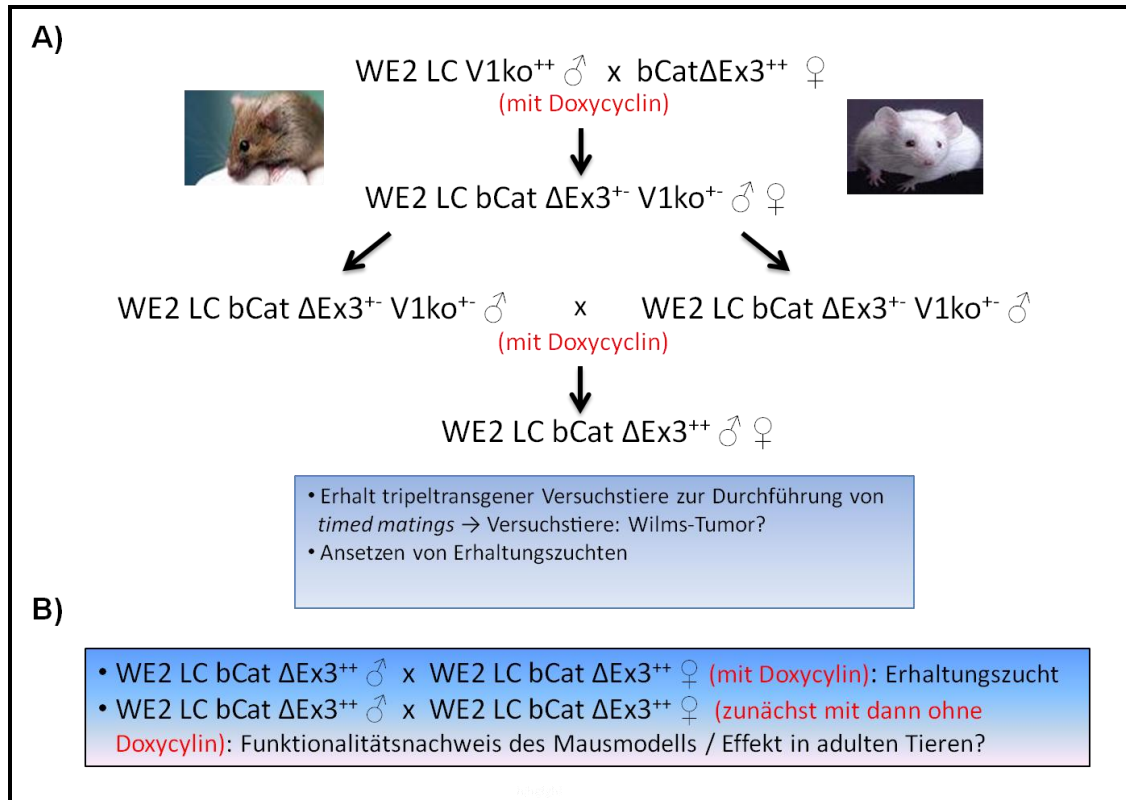


Abbildung 3.23: Verpaarungsschema zur Herstellung des WE2 LC bCat Δ Ex3-Modells

In dieser Abbildung ist das Verpaarungsschema zur Herstellung des WE2 LC bCat Δ Ex3-Modells und der nachfolgenden Erhaltungszuchten dargestellt. Während in **A)** die Zuchten für die Generierung der ersten tripeltransgenen (ttg) Mäuse abgebildet sind, sind in **B)** die Zuchtangaben zum Erhalt von ttg-Nachkommen aufgelistet. Die Symbole ⁺ und ⁺⁺ geben an, ob die Transgene bCat Δ Ex3 und V1ko heterozygot oder homozygot im Genom der Tiere integriert vorliegen.

3.2.2.1 Auswertung der *timed matings* tripeltransgener Tiere

Bei allen durchgeführten *timed matings* des WE2 TC bCat Δ Ex3-Modells wurden keine Auffälligkeiten während der Schwangerschaft beobachtet. Auch die aus diesen Verpaarungen hervorgehenden Jungtiere zeigten bis zum Absetzen von den Eltern keine phänotypischen Auffälligkeiten. Bei der Auswertung der Genotypisierungen der abgesetzten Jungtiere fiel auf, dass die Anzahl an tripeltransgenen Nachkommen stieg, umso später Doxycyclin während der Schwangerschaft entzogen wurde (siehe Abb. 3.24).

Insgesamt waren 25 % der geborenen Jungtiere tripeltransgen, wenn man Doxycyclin an Tag 0,5 *d.p.c.* absetzte. Bei einem Doxycyclinentzug an Tag 4,5 bzw. 6,5 *d.p.c.* (die Werte der beiden Tage werden zusammen angegeben, da die Verpaarungen in einem Käfig stattfanden und eine

Unterscheidung der beiden Weibchen später nicht mehr möglich war) waren 11,8 % der Jungtiere WE2 TC bCatΔEx3-positiv. Des Weiteren wiesen 85,7 % aller Nachkommen einen tripeltransgenen Genotyp auf, wenn man Doxycyclin an Tag 10,5 *d.p.c.* entzog und 91,6 % aller Nachkommen waren WE2 TC bCatΔEx3-positiv bei ständiger Doxycyclingabe.

Generell konnte festgehalten werden, dass die Anzahl an tripeltransgenen Nachkommen stark zunahm, wenn Doxycyclin mindestens bis zum Tag 6,5 *d.p.c.* gegeben wurde.

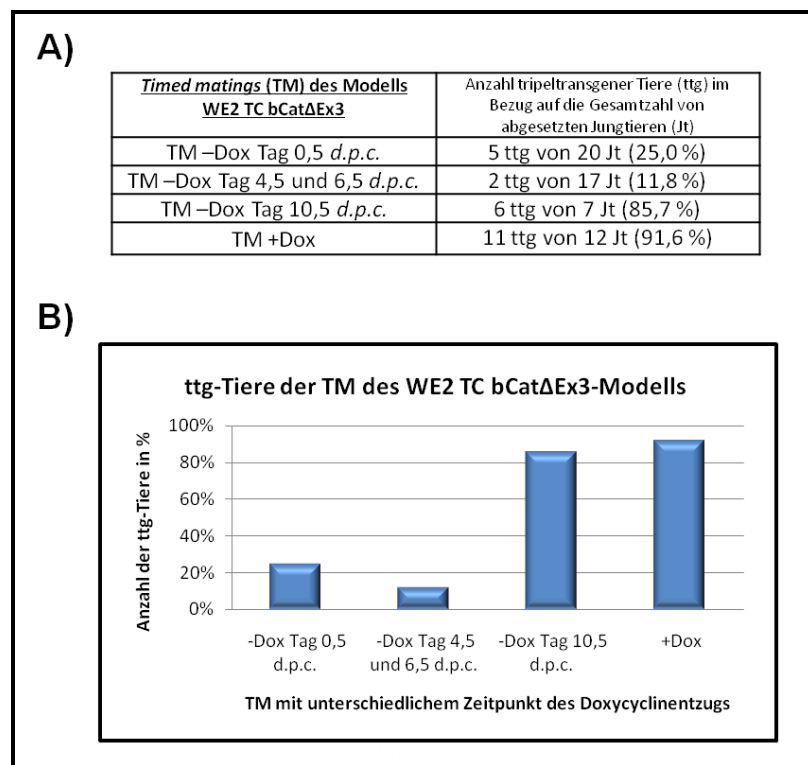


Abbildung 3.24: Zunahme der Anzahl WE2 TC bCatΔEx3-positiver Tiere bei längerer Doxycyclingabe während der Schwangerschaft

In der Abbildung 3.24 ist unter **A)** die Auswertung aller *timed matings* des WE2 TC bCatΔEx3-Modells in Tabellenform aufgelistet, während in **B)** die Ergebnisse graphisch dargestellt sind. Die y-Achse stellt dabei die Anzahl von ttg-Nachkommen in Prozent dar und die X-Achse die jeweiligen *timed matings* mit unterschiedlicher zeitlicher Absetzung von Doxycyclin. Als Vergleichswert dienen die Ergebnisse der *timed matings* mit ständiger Doxycyclingabe. **Abkürzungen:** (-Dox): Doxycyclinentzug; (+Dox): ständige Doxycyclingabe; (*d.p.c.*): *days post coitum*; (Jt): Jungtiere; (TM): *timed matings*; (ttg): tripeltransgen.

Bei den *timed matings* mit WE2 LC bCatΔEx3-positiven Tieren fiel auf, dass die Anzahl an Aborten sehr hoch war, wenn Doxycyclin vor Tag 6,5 *d.p.c.* abgesetzt wurde. So kam es bei 40 % der *timed matings*, denen man Doxycyclin an Tag 0,5 *d.p.c.* der Schwangerschaft entzog, zum intrauterinen Tod der Embryonen. Stoppte man die Doxycyclingabe an Tag 4,5 *d.p.c.* so wurden keine Jungtiere geboren und selbst bei einem Entzug an Tag 6,5 *d.p.c.* traten bei noch 72,7 % der *timed matings* Aborte auf (siehe Abb. 3.25). Erst wenn Doxycyclin zu einem späteren Zeitpunkt der Schwangerschaft abgesetzt wurde, kam es nicht mehr zum intrauterinen Tod der Embryonen.

Lebende Nachkommen zeigten keine phänotypischen Auffälligkeiten. Doch bei der Auswertung der Genotypisierung der abgesetzten Jungtiere fiel auch in diesem Modell auf, dass die Anzahl an tripeltransgenen Nachkommen stieg, umso länger Doxycyclin während der Schwangerschaft gegeben wurde.

Insgesamt waren 9,1 % der geborenen Jungtiere tripeltransgen, wenn Doxycyclin an Tag 0,5 *d.p.c.* abgesetzt wurde. Bei Doxycyclinentzug an Tag 6,5 *d.p.c.* waren 46,2 % und an Tag 10,5 *d.p.c.* 16,7 % WE2 LC bCat Δ Ex3-positiv. Unter ständiger Doxycyclingabe wurden 87,3 % der Nachkommen mit einem tripeltransgenen Genotyp geboren.

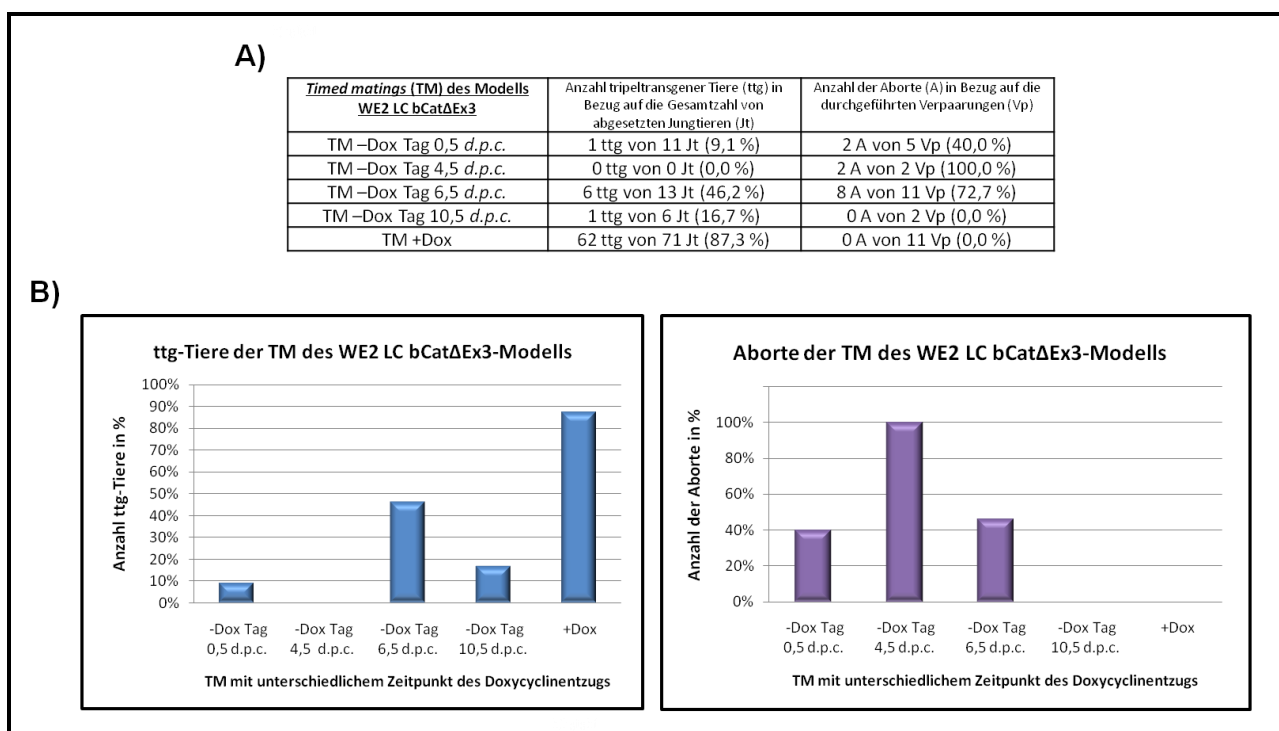


Abbildung 3.25: Zunahme der Anzahl WE2 LC bCat Δ Ex3-positiver Tiere und Abnahme der Anzahl von Aborten bei längerer Doxycyclingabe während der Schwangerschaft

In der Abbildung 3.25 ist unter **A)** die Auswertung aller *timed matings* des WE2 LC bCat Δ Ex3-Modells in Tabellenform aufgelistet, während in **B)** die Ergebnisse graphisch dargestellt sind. Die y-Achse stellt dabei die Anzahl von tripeltransgenen Nachkommen bzw. der Aborte in Prozent dar und die X-Achse die jeweiligen *timed matings* mit unterschiedlicher zeitlicher Absetzung von Doxycyclin. Als Vergleichswert dienen die Ergebnisse der *timed matings* mit ständiger Doxycyclingabe. **Abkürzungen:** (A): Aborte; (-Dox): Doxycyclinentzug; (+Dox): ständige Doxycyclingabe; (*d.p.c.*): *days post coitum*; (Jt): Jungtier; (TM): *timed mating*; (ttg): tripeltransgen; (Vp): Verpaarung.

Um den Grund für die gehäuften Aborte im WE2 LC bCat Δ Ex3-Modell zu untersuchen, führte man zusätzliche *timed matings* durch, bei denen Doxycyclin an Tag 6,5 *d.p.c.* entzogen wurde. Anschließend wurden die Embryonen an Tag 11,5, 14,5 und 18,5 *d.p.c.* entnommen und fixiert. Nach ihrer Genotypisierung überführte man je einen tripeltransgenen und nicht-tripeltransgenen Embryo des jeweiligen Zeitpunktes der Schwangerschaft in Paraffin. Nachfolgend wurden

Schnitte hergestellt, um morphologische Veränderungen unter dem Mikroskop nach HE-Färbung zu beurteilen.

Alle präparierten Embryonen, egal ob tripeltransgen oder nicht, wiesen keine morphologischen Unterschiede auf. Zudem war die Anzahl an tripeltransgenen Embryonen in allen durchgeführten *timed matings* sehr hoch (Tag 11,5 *d.p.c.*: 7 von 7; Tag 14,5 *d.p.c.*: 6 von 6; Tag 18,5 *d.p.c.*: 8 von 11). Des Weiteren konnten bei den Untersuchungen der HE-Schnitte keine morphologischen Veränderungen festgestellt werden, die einen intrauterinen Tod der Embryonen erklären könnten. Die Ergebnisse sind daher in der Dissertation nicht dargestellt.

Die tripeltransgenen Nachkommen der *timed matings* beider Modelle wurden im Anschluss weiter regelmäßig untersucht. Doch bis zum Abschluss des dritten Lebensmonats ohne Doxycyclingabe konnten keine Auffälligkeiten bei tripeltransgenen Tieren beider Modelle beobachtet werden, so dass je zwei tripeltransgene Tiere pro *timed mating* des WE2 TC bCat Δ Ex3-Modells mit unterschiedlichem Doxycyclin-Absatzzeitpunkt histopathologisch untersucht wurden. Dabei wiesen die Organe aller präparierten Tiere morphologisch keine Auffälligkeiten auf.

Um die Nieren dieser tripeltransgenen Tiere genauer auf das Vorhandensein von nephrogenen Resten und triphasische Wilms-Tumorgewebe zu untersuchen, wurden nachfolgend Paraffinschnitte hergestellt und mit Hämatoxylin und Eosin (HE-Färbung) gefärbt (siehe Abb. 3.26). Alle Nieren wiesen dabei keine histologischen Veränderungen auf und glichen in ihrem Aussehen wildtypischen Nieren.

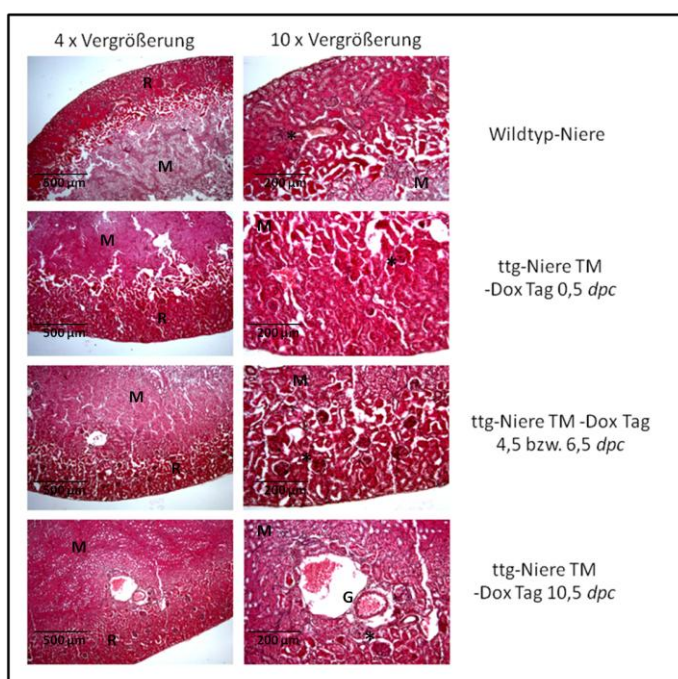


Abbildung 3.26: Unauffällige Histologie tripeltransgener Nieren der WE2 TC bCat Δ Ex3-*timed matings*

In dieser Abbildung sind HE-gefärbte Nieren-Paraffinschnitte einer wildtypischen Maus, sowie von tripeltransgenen Tieren dargestellt, denen während der Schwangerschaft Doxycyclin an Tag 0,5, 4,5 bzw. 6,5 und 10,5 *d.p.c.* entzogen worden ist. Die Nieren der Versuchstiere weisen dabei keine Veränderungen auf. **Abkürzungen und Symbole:** (-Dox): Doxycyclinentzug; (*dpc*): *days post coitum*; (G): Gefäß; (M): Nierenmark; (R): Nierenrinde; (ttg): tripeltransgen; (TM): *Timed mating*; (*): Glomerulus.

Die Ergebnisse der *timed matings* wiesen darauf hin, dass beide Modelle in einem aktivierten Zustand einen selektiven Druck während der Schwangerschaft erzeugen. Dies ist daran zu erkennen, dass es zu einer Zunahme von tripeltransgenen Nachkommen und einer Abnahme von Aborten kam, umso später Doxycyclin während der Schwangerschaft entzogen wurde. Somit war fraglich, ob die beiden Modelle zur Herstellung eines Wilms-Tumors geeignet sind, da wohl eine konstitutive β -Catenin-Aktivierung in der Frühschwangerschaft nicht mit dem embryonalen Überleben vereinbar ist. Trotzdem wurden unabhängig vom Zeitpunkt des Doxycyclinentzugs tripeltransgene Tiere geboren, die aber selbst nach drei Monaten ohne Doxycyclingabe phänotypisch unauffällig waren und in deren Nieren keine nephrogenen Reste oder triphasisches Wilms-Tumorgewebe detektiert werden konnten. Ob sich diese Tiere durch eine nicht stattfindende Deletion des Exons 3 von *Ctnnb1* dem selektiven Druck entzogen hatten, sollte in nachfolgenden Analysen genauso geklärt werden, wie die Frage, ob sich in diesen Tieren doch noch Wilms-Tumore entwickelten.

3.2.2.2 Auswertung der Präparation tripeltransgener Tiere

Um nicht zu voreilig zu urteilen, dass beide Modelle nicht zur Herstellung eines Wilms-Tumors geeignet sind und nur bedingt funktionieren, sollten die tripeltransgenen Nachkommen aller Verpaarungen der WE2 TC bCat Δ Ex3- und WE2 LC bCat Δ Ex3-Modelle (siehe Abb. 3.22 und Abb. 3.23) sechs Monate ohne Doxycyclin heranwachsen, um anschließend präpariert zu werden.

Bei den durchgeführten Präparationen wurden dabei neben möglicherweise auffälligen Organen immer die Wt1-exprimierenden Nieren, Hoden, Ovarien und der Uterus je nach Geschlecht der tripeltransgenen Tiere entnommen. Die Organe wurden anschließend photographisch dokumentiert und jeweils ein Stück zur Isolation von DNA und Proteinen verwendet. Im Zuge dessen konnte mit Hilfe der DNA durch eine PCR ein *lox-out* des Exons 3 von *Ctnnb1* analysiert werden. Somit war nachweisbar, ob das Modell WE2 TC bCat Δ Ex3 bzw. WE2 LC bCat Δ Ex3 in der jeweiligen tripeltransgenen Maus induziert gewesen ist. Die isolierten Proteine wurden für molekulare Analysen verwendet und des Weiteren ein Stück des jeweiligen Organs histologisch untersucht. Durch die histologischen und molekularen Untersuchungen konnten somit die tripeltransgenen Tiere der Modelle WE2 TC bCat Δ Ex3- und WE2 LC bCat Δ Ex3 charakterisiert werden.

Generell werden im weiteren Verlauf alle Analysen der tripeltransgenen Tiere beider Modelle gemeinsam dargestellt, da sie den gleichen Phänotyp unabhängig von der Verpaarung aufwiesen.

Insgesamt wurden dabei 79 tripeltransgene Versuchstiere des WE2 TC bCat Δ Ex3-Modells präpariert (zwei starben vor dem Ablauf des sechsmonatigen Doxycyclinentzugs) von denen 32 männlich und 47 weiblich waren.

Bei den Männchen konnte bei neun Tieren mittels PCR ein *lox-out* des Exons 3 von *Ctnnb1* in allen entnommenen Organen nachgewiesen werden (siehe Tabelle 3.2 und Ergebnisse 3.2.2.4). Zwei Männchen hatten eine Veränderung der Nieren (genauere Phänotyp-Beschreibung siehe Ergebnisse 3.2.2.3). Bei den Weibchen war bei 25 von den 47 tripeltransgenen Versuchstieren ein *lox-out* des Exons 3 von *Ctnnb1* festzustellen (siehe Ergebnisse 3.2.2.4). Insgesamt konnte bei 11 Weibchen eine Veränderung von Organen beobachtet werden (siehe Tabelle 3.2), wobei bei neun Weibchen die Ovarien betroffen waren und bei zwei die Nieren (genauere Phänotyp-Beschreibung siehe Ergebnisse 3.2.2.3).

Tabelle 3.2: Zusammenfassung der Genotyp-Analyse und Präparation WE2 TC bCat Δ Ex3-positiver Männchen und Weibchen nach sechs Monaten ohne Doxycyclingabe

Die Tabelle zeigt die Auswertung der Präparation und Genotyp-Analyse von tripeltransgenen Männchen (A) und Weibchen (B) des WE2 TC bCat Δ Ex3-Modells.

A)

WE2 TC bCat Δ Ex3-Männchen	Tieranzahl
Anzahl tripeltransgener (ttg) Männchen	32
Anzahl von ttg-Männchen mit nachgewiesenem <i>Ctnnb1 lox-out</i>	9
Anzahl phänotypisch auffälliger ttg-Männchen mit Veränderungen der Niere	2
Anzahl phänotypisch auffälliger ttg-Männchen mit Veränderungen des Hodens	0

B)

WE2 TC bCat Δ Ex3-Weibchen	Tieranzahl
Anzahl tripeltransgener (ttg) Weibchen	47
Anzahl von ttg-Weibchen mit nachgewiesenem <i>Ctnnb1 lox-out</i>	25
Anzahl phänotypisch auffälliger ttg-Weibchen mit Veränderungen der Niere	2
Anzahl phänotypisch auffälliger ttg-Weibchen mit Veränderungen des Ovars	9
Anzahl phänotypischer ttg-Weibchen mit Veränderungen des Uterus	0

Zur Charakterisierung des WE2 LC bCat Δ Ex3-Modells wurden insgesamt 52 tripeltransgene Tiere präpariert von denen je 26 männlich und weiblich waren.

Bei den Männchen konnte bei 21 Tieren mittels PCR eine Deletion des Exons 3 von *Ctnnb1* in allen entnommenen Organen nachgewiesen werden (siehe Tabelle 3.3 und Ergebnisse 3.2.2.4). Zwei Männchen hatten eine Veränderung der Nieren (genauere Phänotyp-Beschreibung siehe

Ergebnisse 3.2.2.3). Bei den Weibchen konnte bei 17 Versuchstieren ein *lox-out* des Exon 3 von *Ctnnb1* mittels PCR in allen entnommenen Organen nachgewiesen werden (siehe Ergebnisse 3.2.2.4). Insgesamt wurde bei 14 Weibchen eine Veränderung der Organe festgestellt (siehe Tabelle 3.3), wobei bei 12 Weibchen die Ovarien betroffen waren und bei zwei die Nieren (genauere Phänotyp-Beschreibung siehe Ergebnisse 3.2.2.3).

Tabelle 3.3: Zusammenfassung der Genotyp-Analyse und Präparation WE2 LC bCatΔEx3-positiver Männchen und Weibchen nach sechs Monaten ohne Doxycyclingabe

Die Tabelle zeigt die Auswertung der Präparation und Genotyp-Analyse von tripeltransgenen Männchen (A) und Weibchen (B) des WE2 LC bCatΔEx3-Modells.

A)

WE2 LC bCatΔEx3-Männchen	Tieranzahl
Anzahl tripeltransgener (ttg) Männchen	26
Anzahl von ttg-Männchen mit nachgewiesenem <i>Ctnnb1 lox-out</i>	21
Anzahl phänotypisch auffälliger ttg-Männchen mit Veränderungen der Niere	2
Anzahl phänotypisch auffälliger ttg-Männchen mit Veränderungen des Hodens	0

B)

WE2 LC bCatΔEx3-Weibchen	Tieranzahl
Anzahl tripeltransgener (ttg) Weibchen	26
Anzahl von ttg-Weibchen mit nachgewiesenem <i>Ctnnb1 lox-out</i>	17
Anzahl phänotypisch auffälliger ttg-Weibchen mit Veränderungen der Niere	2
Anzahl phänotypisch auffälliger ttg-Weibchen mit Veränderungen des Ovarss	12
Anzahl phänotypischer ttg-Weibchen mit Veränderungen des Uterus	0

Zusammenfassend war nach der Präparation der tripeltransgenen Tiere festzuhalten, dass nicht in allen tripeltransgenen Nachkommen die Deletion des Exons 3 von *Ctnnb1* in den *Wt1*-exprimierenden Organen nachgewiesen werden konnte und dies nicht zwangsläufig zu einer Veränderung von Organen führte. Konnte ein *lox-out* von *Ctnnb1* nachgewiesen werden, war dies fast ausschließlich in tripeltransgenen Weibchen und Männchen der Fall, denen man Doxycyclin erst im Alter von drei Wochen entzogen hatte. Lediglich in zwei tripeltransgenen Tieren, die aus den *timed matings* hervorgangen waren (ein Männchen ab Tag 10,5 *d.p.c.* und ein Weibchen ab Tag 10,5 *d.p.c.* ohne Doxycyclin), wies die Deletion des Exons 3 von *Ctnnb1* auf ein funktionierendes Modell hin. Ob es sich bei den veränderten Nieren um Wilms-Tumore handelte, musste in nachfolgenden histologischen und molekularen Analysen untersucht werden (siehe Ergebnisse 3.2.2.4.1 bzw. 3.2.2.4.2). Gleichzeitig sollte auch die Veränderungen der

Ovarien genauer analysiert werden (siehe Ergebnisse 3.2.2.4.1 bzw. 3.2.2.4.2). Zudem konnten die histologischen und molekularen Untersuchungen Aufschluss darüber geben, ob die Veränderungen der Organe auf die Aktivierung von β -Catenin zurückzuführen waren.

3.2.2.3 Phänotyp der Mäuse des WE TC bCat Δ Ex3- und WE LC bCat Δ Ex3-Modells

Die tripeltransgenen Tiere des WE2 TC bCat Δ Ex3-Modells, die nach sechs Monaten ohne Doxycyclin präpariert wurden, waren vor der Eröffnung der Bauchhöhle phänotypisch unauffällig. Erst nach dem Eröffnen der Bauchhöhle wurden bei mehreren Tieren veränderte Organe sichtbar (siehe Abbildung 3.27). Ähnliches war bei einem Großteil der tripeltransgenen Mäuse des WE2 LC bCat Δ Ex3-Modells zu beobachten. Nur ein paar Tiere zeigten nach sechs Monaten ohne Doxycyclin eine starke Vergrößerung des Abdomens. Nach Abziehen des Bauchfells war eine große Ansammlung an Flüssigkeit in der Bauchhöhle zu sehen, die klar und leicht rötlich erschien.

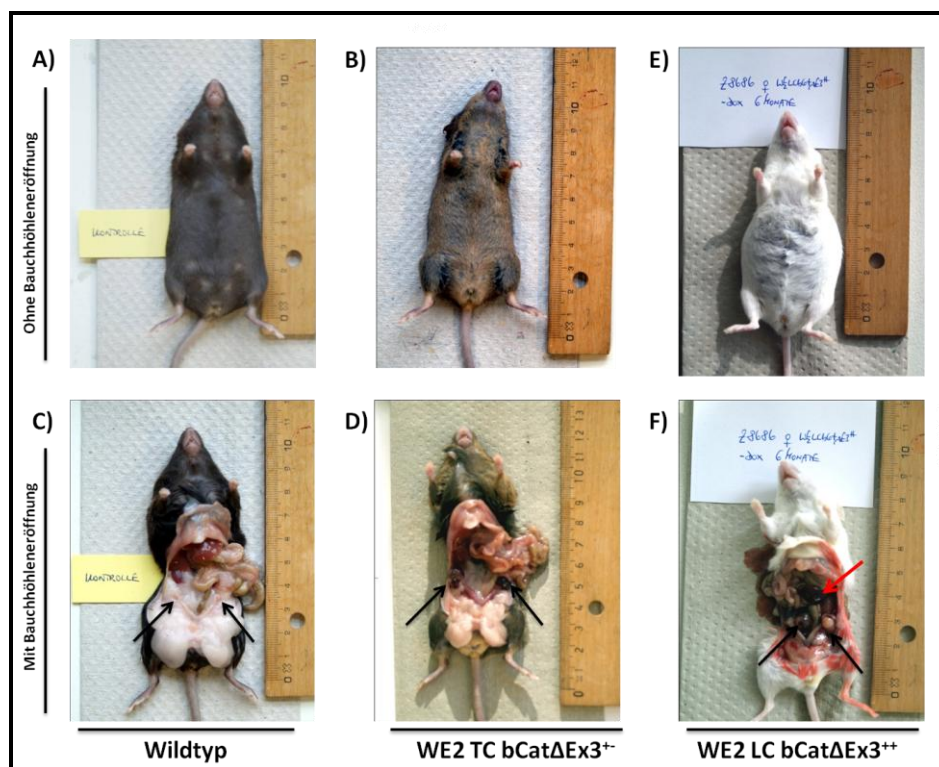


Abbildung 3.27: Darstellung des WE2 TC bCat Δ Ex3- und WE2 LC bCat Δ Ex3-Phänotyps

In der Abbildung ist auf der linken Seite eine wildtypische Maus und daneben exemplarisch eine phänotypisch auffällige WE2 TC bCat Δ Ex3⁺-positive bzw. eine WE2 LC bCat Δ Ex3⁺⁺-positive Maus (ohne und mit der Eröffnung der Bauchhöhle) zu sehen. Nur die tripeltransgene Maus des WE2 LC bCat Δ Ex3-Modells weist eine deutliche Vergrößerung des Abdomens auf. Nach der Eröffnung des Bauchraums sind bei der wildtypischen Maus keine Veränderungen der Organe zu erkennen, während bei den tripeltransgenen Mäusen der beiden Modelle deutlich vergrößerte Ovarien zu sehen sind (schwarze Pfeile). In dieser Abbildung nicht zu sehen sind die Veränderungen der Niere, doch ist bei der WE2 LC bCat Δ Ex3-positiven Maus eine stark vergrößerte Milz zu erkennen (roter Pfeil).

Bei den veränderten Organen fielen bei den tripeltransgenen Weibchen beider Modelle als erstes die vergrößerten Ovarien auf. Während ein normales Ovar ungefähr 0,1 cm groß ist, waren die veränderten Ovarien des WE2 TC bCat Δ Ex3-Modells zwischen 0,2 und 2,5 cm groß (im Durchschnitt 0,84 cm). Die Ovarien des WE2 LC bCat Δ Ex3-Modells wiesen eine Größe zwischen 0,2 und 2 cm auf und waren im Durchschnitt mit 0,94 cm etwas größer als im Vergleich zum anderen Modell. Generell schien es keinen Unterschied zu machen, ob das bCat Δ Ex3-Transgen heterozygot oder homozygot vorlag, da in beiden Fällen unterschiedlich große Veränderungen des Ovars zu beobachten waren. Die Vergrößerungen wurden generell durch einzelne oder mehrfach auftretende Zysten hervorgerufen, die entweder mit klarer oder blutgeronnener Flüssigkeit gefüllt waren (siehe Abb. 3.28). Zudem konnte zwischen den Zysten stellenweise gelbliches, tumorös verändertes Gewebe erkannt werden, so dass von dem normalen ovarialen Gewebe kaum mehr etwas zu sehen war. Die Veränderungen traten uni- oder bilateral auf.

Neben den zystischen Ovarien zeigten auch einige Weibchen und Männchen beider Modelle Veränderungen der Nieren. Diese waren dabei mal schwächer oder auch stärker vaskularisiert, als dies bei wildtypischen Nieren der Fall ist. Zudem wiesen diese Nieren Verkleinerungen oder Vergrößerungen auf. Im Falle einer Verkleinerung waren die auffälligen Nieren mit vielen kleinen, blasenförmigen Zysten überzogen. Bei einer Vergrößerung nahm das normalerweise eher bohnenförmige Organ die Form einer Birne an (siehe Abb. 3.28). Diese Verbreiterung, die stellenweise die Nieren um das Doppelte vergrößerten, wurde durch einzelne Zysten hervorgerufen, die an der blutgeronnenen Flüssigkeit zu erkennen waren. Generell konnten die Veränderungen dieses Organs unilateral oder auch bilateral beobachtet werden.

Nur bei Tieren des WE2 LC bCat Δ Ex3-Modells, die schon rein äußerlich eine starke Vergrößerung des Bauchraums aufwiesen, war nach Eröffnung der Bauchhöhle eine stark vergrößerte Milz zu erkennen (siehe Abb. 3.28). Makroskopisch zeigte die Milz bei diesen Tieren keine zystischen oder tumorösen Veränderungen, doch nahm das Volumen dieses Organs um mehr als das Doppelte zu. Generell trat die Veränderung dieses Organs als Nebeneffekt einer sehr weit vorangeschrittenen Tumorgenese des Ovars auf (Boerboom *et. al.*, 2005), so dass auf sie nicht weiter eingegangen werden soll.

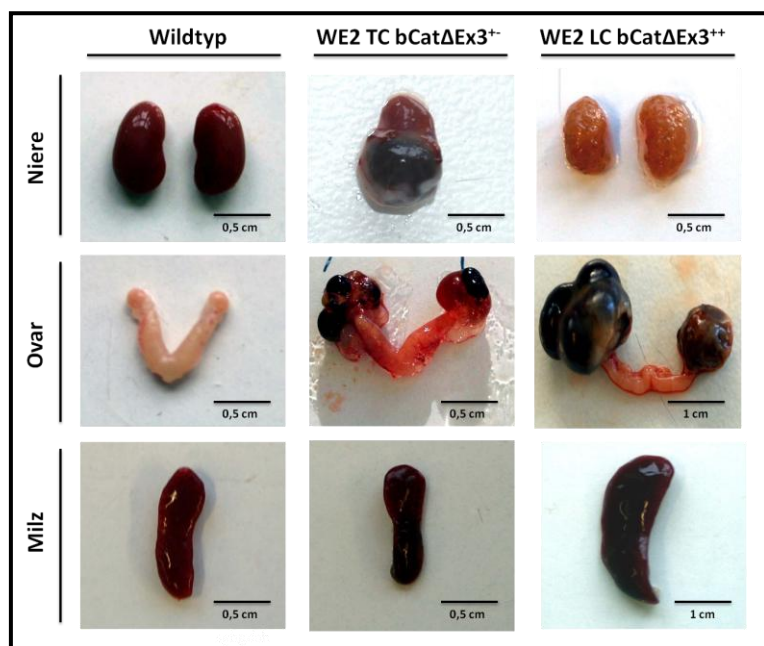


Abbildung 3.28: Bei WE2 LC bCatΔEx3- und WE2 TC bCatΔEx3-positiven Tieren entwickeln sich nach sechsmonatigem Doxycyclinentzug Veränderungen der Milz, der Nieren und der Ovarien

In dieser Abbildung sind die Nieren, Ovarien mit Uterus und die Milz einer wildtypischen Maus und zweier phänotypisch auffälliger Tiere des Genotyps WE2 TC bCatΔEx3⁺ bzw. WE2 LC bCatΔEx3⁺⁺ dargestellt. Bei den tripeltransgenen Mäusen beider Modelle kann eine Veränderung von Nieren und Ovarien beobachtet werden. Dagegen ist nur in der WE2 LC bCatΔEx3-positiven Maus die Milz verändert.

Neben den Veränderungen der Nieren, der Ovarien und der Milz konnten bei den phänotypisch auffälligen, tripeltransgenen Tieren beider Modelle keine weiteren Veränderungen von Organen beobachtet werden. Wie in 3.2.2.2 beschrieben, wurden die veränderten Organe im Anschluss für weitere molekulare und histologische Untersuchungen verwendet.

3.2.2.4 Histologische und molekulare Analyse von veränderten, tripeltransgenen Organen

Bevor mit genaueren Analysen der auffälligen Organe angefangen werden konnte, musste zunächst der Nachweis des *lox-outs* des Exons 3 von *Ctnnb1* in den veränderten Organen erbracht werden. Dies ist mit Hilfe einer PCR möglich und beweist die Induzierbarkeit und Expression einer durch den tetrazyklinabhängigen Aktivator (tTA) aktivierten Cre-Rekombinase, die das Exon 3 von *Ctnnb1* herausschneidet. Durch diese aktivierende *Ctnnb1*-Mutation kann es zur Akkumulation von β -Catenin im Nukleus und zur Transkription vieler kanonischer Wnt-Zielgene kommen, die für eine Veränderung von Organen verantwortlich sein kann (Clevers, 2006).

In allen phänotypisch auffälligen Organen konnte nach einer DNA-Extraktion der *lox-out* des Exons 3 von *Ctnnb1* in Abhängigkeit von dem Genotyp heterozygot oder homozygot nachgewiesen werden. Durch den von der Cre-Rekombinase bedingten *lox-out* des Exons 3 von *Ctnnb1* wurde das PCR-Produkt von ursprünglich 690 bp (wildtypisch) um 200 bp verkürzt, so dass nach einer Agarose-Gelelektrophorese bei einem heterozygot vorliegenden bCatΔEx3-Transgen neben der wildtypischen DNA-Bande auch eine 490 bp große *lox-out*-Bande auf dem Agarosegel zu erkennen war (siehe Abb. 3.29). Die wildtypische Bande konnte im Falle von

tripeltransgenen Tieren mit homozygot integriertem bCat Δ Ex3-Transgen nicht mehr nachgewiesen werden.

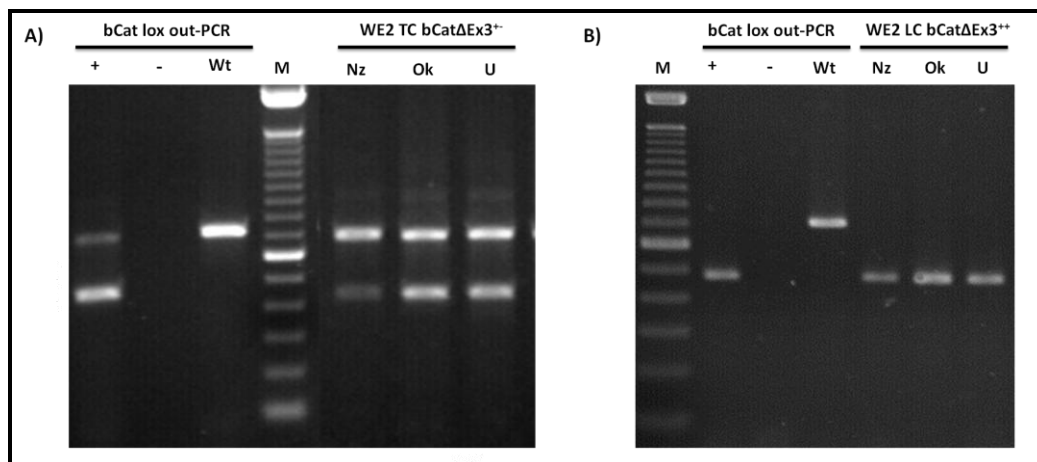


Abbildung 3.29: PCR-Nachweis der Deletion des Exons 3 von *Ctnnb1* in phänotypisch auffälligen Organen von WE2 TC bCat Δ Ex3- und WE2 LC bCat Δ Ex3-positiven Tieren

In der Abbildung ist in **A)** ein Agarosegel einer bCat Δ Ex3-lox out (bCat lox out)-PCR zu erkennen. Links des 100 bp-Markers (M) sind von links nach rechts die Positivkontrolle (+), die Negativkontrolle (-) und eine Wildtypprobe (Wt) erkennbar. Rechts des 100 bp-Markers sind die PCR-Proben eines phänotypisch auffälligen WE2 TC bCat Δ Ex3⁺-positiven Weibchens aufgetragen (zystischen Niere (Nz), Ovarkarzinom (Ok), Uterus (U)). Die DNA-Bande für ein wildtypisches *Ctnnb1*-Gen ist dabei bei 690 bp nachweisbar und eine Deletion des dritten Exons von *Ctnnb1* führt zu einem Nachweis einer DNA-Bande bei 490 bp. Alle Proben des tripeltransgenen Tieres zeigen einen heterozygoten lox-out von *Ctnnb1*. In **B)** ist in gleicher Art ein Agarosegel einer bCat Δ Ex3-lox out (bCat lox out)-PCR eines phänotypisch auffälligen WE2 LC bCat Δ Ex3⁺⁺-positiven Weibchens dargestellt. In diesem Fall ist in allen Proben aufgrund des Genotyps des Weibchens ein homozygoter lox-out von *Ctnnb1* zu erkennen.

Ob die aktivierende *Ctnnb1*-Mutation auch wirklich die Tumorgenese der veränderten Nieren und Ovarien induzierte, sollte in den anschließenden, genaueren histologischen und molekularen Analysen untersucht werden.

3.2.2.4.1 Histologische Analyse von veränderten, tripeltransgenen Organen

Mit Hilfe der histologischen Untersuchungen der zystischen und tumorösen Nieren und Ovarien sollte zunächst das Ursprungsgewebe und somit die Art der Veränderung genauer analysiert werden. Im Anschluss wurde die Expression und Lokalisation von β -Catenin untersucht, damit dessen Beteiligung an der Tumorgenese genauer bestimmt und bewiesen werden kann.

Zum Zweck dieser Analysen wurden von den zystischen bzw. tumorösen Nieren und Ovarien Paraffinschnitte hergestellt, damit die phänotypischen Veränderungen durch HE-Färbungen charakterisiert werden kann. Um das mutierte β -Catenin nachzuweisen, wurden nach den HE-Färbungen mit neuen Paraffinschnitten immunhistochemische Färbungen (IHC-Färbung) durchgeführt.

Auf den Paraffinschnitten der veränderten Nieren beider Modelle waren nach den durchgeführten HE-Färbungen keine triphasischen, tumorösen Gewebe eines Wilms-Tumors identifizierbar (siehe Abb. 3.30). Auch keine Ansammlungen von multipotenten Nierenvorläuferzellen (nephrogenen Resten) zwischen normal differenziertem Nierengewebe konnten nachgewiesen werden. Lediglich einige Glomeruli wiesen im Vergleich zu wildtypischen Mäusen eine veränderte Morphologie und eine Flüssigkeitsansammlung auf. Zudem waren Zysten zu erkennen, die an Anzahl und Größe variierten und deren Ursprung wohl von proximalen und distalen Tubuli der Nierenrinde und Tubuli der Henle-Schleife des Nierenmarks ausging. Sie waren alle flüssigkeitsgefüllt und verdrängten gesundes Gewebe. Somit ähnelten die veränderten Nieren in ihrem histologischen Bild einer polyzystischen Nierenerkrankung (Saadi-Kheddouci *et. al.*, 2001).

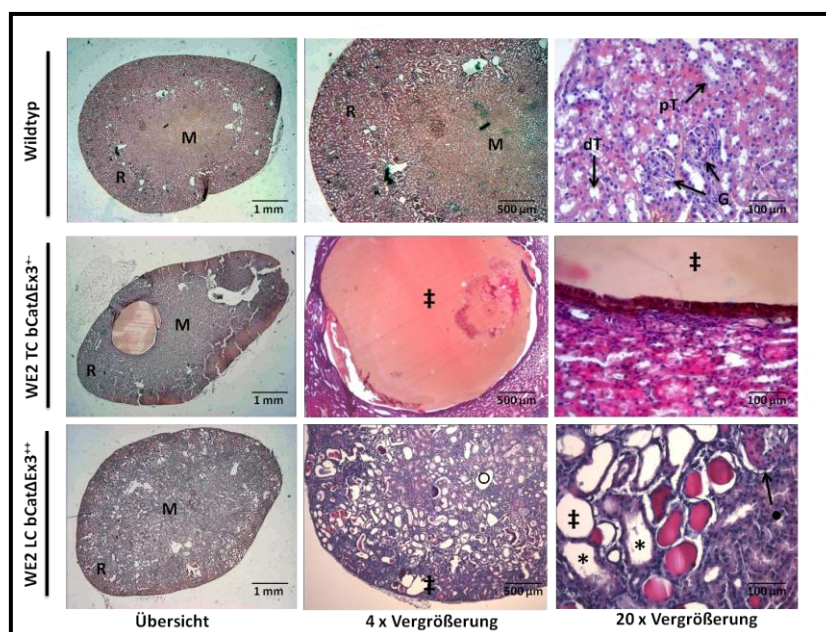


Abbildung 3.30: Polyzystische Nieren WE2 TC bCat Δ Ex3- und WE2 LC bCat Δ Ex3-positiver Mäuse

In dieser Abbildung ist ein HE-gefärbter Nieren-Paraffinschnitt einer wildtypischen, einer WE2 TC bCat Δ Ex3⁺-positiven und einer WE2 LC bCat Δ Ex3⁺⁺-positiven Maus dargestellt. Während in der wildtypischen Niere keine Veränderungen zu erkennen sind, weisen Nieren tripeltransgener Mäuse Zysten in der Nierenrinde und im Nierenmark auf. Zudem werden bei einigen Glomeruli eine veränderte Morphologie und eine Flüssigkeitsansammlung festgestellt. **Symbole und Abkürzungen:** (dT): distaler

Tubulus; (G): Glomerulus; (M): Nierenmark; (pT): proximaler Tubulus; (R): Nierenrinde; (♯): Zyste/Ursprung: distaler Tubulus; (*): Zyste/Ursprung: proximaler Tubulus; (○): Zyste/Ursprung: Tubulus der Henle-Schleife; (●): Glomerulus mit veränderter Morphologie und Flüssigkeitsansammlung.

Im Falle der veränderten Ovarien konnte auf HE-gefärbten Paraffinschnitten ein ähnliches Bild beobachtet werden, wie bei den Nieren tripeltransgener Tiere. Gesundes, ovariales Gewebe wurde durch Zysten verdrängt, die ebenfalls an Größe und Anzahl variierten. Zudem war tumoröses Gewebe zu erkennen (siehe Abb. 3.31).

Die Zysten schienen dabei aus veränderten Granulosa-Zellen der Oozyten des Ovars hervorzugehen. Denn häufig waren mehrere Schichten von Granulosa-Zellen um diese zystischen Strukturen zu erkennen und eine aus diesen Zellen stattfindende Zystenbildung konnte beobachtet werden. Dies erkannte man an der beginnenden Flüssigkeitsansammlung zwischen den Schichten der Granulosazellen. Generell waren die Zysten mit einer klaren,

rötlichen Flüssigkeit gefüllt. Umso weiter die Vergrößerung des Ovars fortschritt, desto größere Zysten konnten beobachtet werden, wodurch normal entwickelte Oozyten kaum noch zu entdecken waren.

Bei den beobachteten tumorösen Gewebe handelte es sich zu Beginn einer ovariellen Veränderung um Ansammlungen von strukturell unorganisierten pleomorphen Granulosa-Zellen, die keine Oozyten umschlossen. Diese Strukturen wurden auch in stark vergrößerten Ovarien gefunden, wobei sie sich über weite Teile dieser Ovarien erstreckten und von Zysten variabler Größe mit klarer, rötlicher Flüssigkeit umgeben waren. Zudem wurden zwischen diesen Granulosa-Zellen sehr viele kleine Zysten mit klarer Flüssigkeit entdeckt. Auch spindelförmige Zellen, die Vorläuferzellen von Osteoblasten ähnelten, konnten beobachtet werden. Insgesamt glich das histologische Bild der zystischen bzw. tumorösen Ovarien dem von Granulosazelltumoren (Boerboom *et. al.*, 2005).

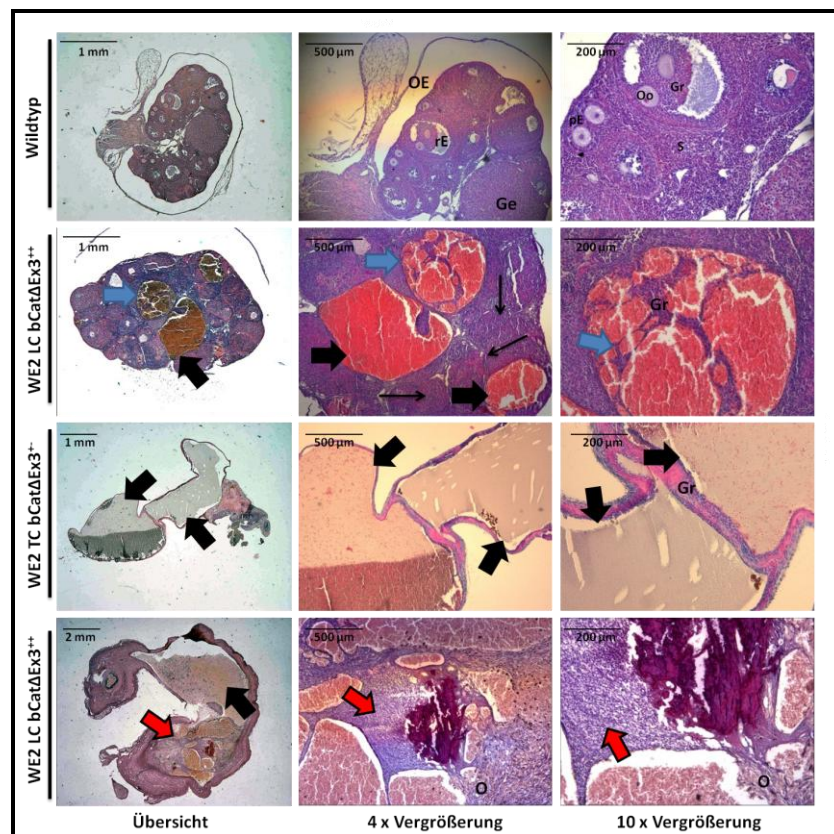


Abbildung 3.31: Veränderte Ovarien von WE2 TC bCat Δ Ex3- und WE2 LC bCat Δ Ex3-positiven Tieren ähneln Granulosazelltumoren

In dieser Abbildung ist ein HE-gefärbter Ovar-Paraffinschnitt einer wildtypischen, einer WE2 TC bCat Δ Ex3⁺-positiven und zweier WE2 LC bCat Δ Ex3⁺-positiven Mäuse dargestellt. Während im wildtypischen Ovar keine Veränderungen festzustellen sind, gleicht das histologische Bild der Ovarien der tripeltransgenen Tiere dem von Granulosazelltumoren. Generell nimmt in der Abbildung der Grad der ovariellen Veränderung von oben nach unten zu. **Abkürzungen und Symbole:** (Ge): Gelbkörper; (Gr): Granulosazellen; (O): Osteoblasten; (OE): Ovariales Epithel; (Oo): Oozyte; (pE): primäre Eizelle; (rE): reife Eizelle; (S): stromale Zellen; (dicker, blauer Pfeil): Entstehung einer Zyste aus Granulosazellen; (dicker, roter Pfeil): tumoröses Gewebe eines Granulosazelltumors; (dicker, schwarzer Pfeil): Zyste; (dünner, schwarzer Pfeil): Ansammlung von strukturell unorganisierten pleomorphen Granulosa-Zellen.

Bei dem immunhistochemischen Nachweis von β -Catenin wurde in Nieren von wildtypischen Mäusen (Kontrollen) eine zytoplasmatische Expression des Proteins in allen Zelltypen der Niere detektiert. Sie war zumeist schwach und generell in der Rinde der Niere stärker als im Mark.

Auch in den zystischen Nieren von WE2 TC bCat Δ Ex3-positiven und WE2 LC bCat Δ Ex3-positiven Mäusen konnte die zytoplasmatische Expression von β -Catenin in allen Zelltypen der Niere nachgewiesen werden, doch war der Nachweis des Proteins insgesamt um ein vielfaches stärker (siehe Abb. 3.32). Zudem war speziell im Epithel der Zysten, die wohl aus den proximalen und distalen Tubuli, sowie den Tubuli der Henle-Schleife hervorgingen, eine starke Akkumulation von β -Catenin in den Nuklei zu beobachten, was auf eine Stabilisierung des Proteins schließen ließ. Diese konnte in den veränderten Glomeruli dagegen nicht nachgewiesen werden.

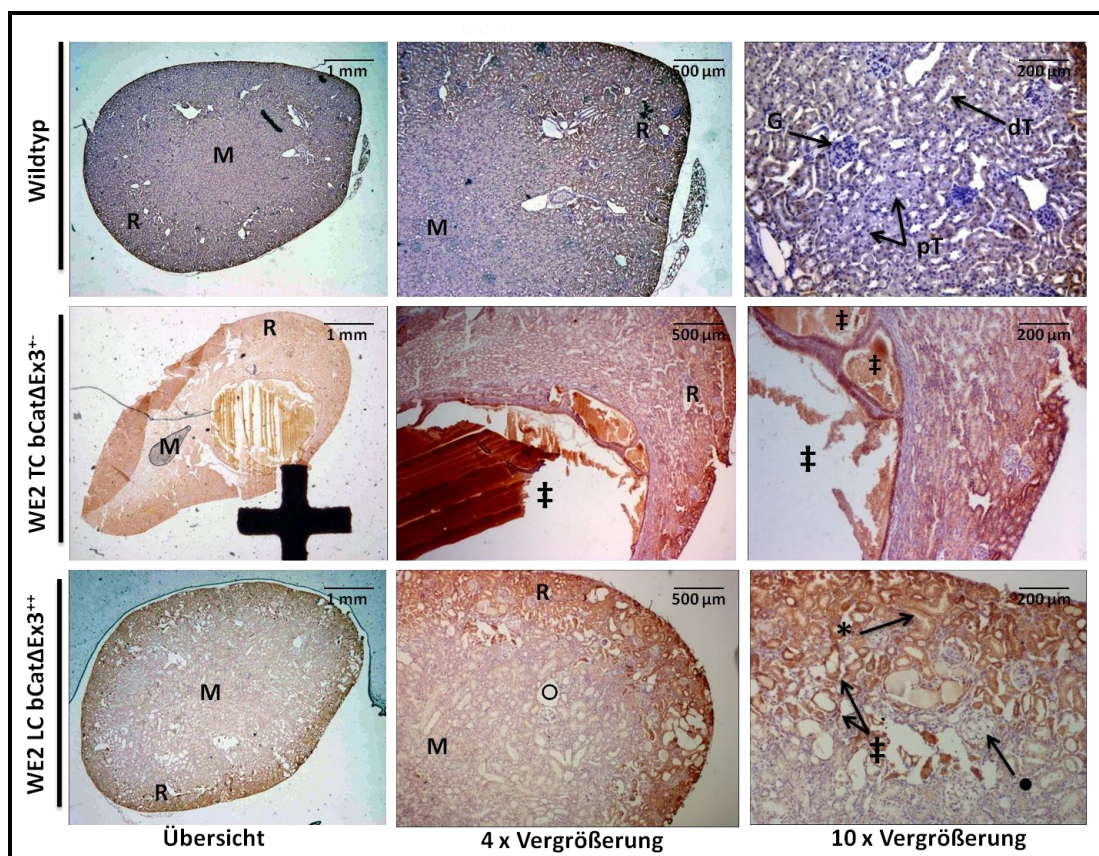


Abbildung 3.32: Nachweis von β -Catenin in polyzystischen Nieren von WE2 TC bCat Δ Ex3-positiven und WE2 LC bCat Δ Ex3-positiven Mäusen

In dieser Abbildung ist die Expression und Lokalisation von β -Catenin durch IHC-Färbung auf Paraffinschnitten einer wildtypischen Niere und zweier tripeltransgener, polyzystischer Nieren dargestellt. Dabei sind β -Catenin exprimierende Zellen an einer braunen Färbung zu erkennen. Eine zytoplasmatische Expression des Proteins ist in der wildtypischen Niere in allen charakteristischen Zelltypen dieses Organs nachweisbar. Dies ist auch in tripeltransgenen polyzystischen Nieren der Fall, wobei zudem eine starke nukleäre Akkumulation von β -Catenin in allen Epithelien der Zysten zu erkennen ist. Die veränderten Glomeruli der tripeltransgenen Nieren weisen dagegen keine nukleäre Akkumulation von β -Catenin auf. **Symbole und Abkürzungen:** (dT): distaler Tubulus; (G): Glomerulus; (M): Nierenmark; (pT): proximaler Tubulus; (R): Nierenrinde; (‡): Zyste/Urspung: distaler Tubulus; (*): Zyste/Urspung: proximaler Tubulus; (o): Zyste/Urspung: Tubulus der Henle-Schleife; (•): Glomerulus mit veränderter Morphologie und Flüssigkeitsansammlung.

In den Ovarien von wildtypischen Mäusen war eine zytoplasmatische Expression von β -Catenin in allen Zelltypen des Organs nachweisbar. Das Protein wurde dabei am stärksten im ovariellen Epithelium, den stromalen Zellen und in den Granulosa-Zellen der verschiedenen Entwicklungsstufen der Oozyten exprimiert. Im Falle der Granulosa-Zellen konnte die stärkste Expression von β -Catenin in der Nähe des Antrums und in Cumulus-Zellen nachgewiesen werden.

Auch in den zystischen bzw. tumorösen Ovarien von WE2 TC bCat Δ Ex3-positiven und WE2 LC bCat Δ Ex3-positiven Mäusen war die zytoplasmatische Expression von β -Catenin in allen ovariellen Zelltypen zu erkennen. Der Nachweis des Proteins war aber wesentlich stärker als in den Ovarien der Wildtypen. Zudem konnte mit voranschreitender Tumorgenese der Ovarien eine zunehmende nukleäre Akkumulation von β -Catenin vor allem in den Granulosa-Zellen beobachtet werden. Dies war besonders stark ausgeprägt in den Ansammlungen von pleomorphen unstrukturierten Granulosa-Zellen. Auch in denen von mehreren Granulosazellschichten umgebenen Zysten mit klarer, rötlicher Flüssigkeit konnte eine starke nukleäre Akkumulation von β -Catenin identifiziert werden (siehe Abb. 3.33). Dagegen ließ sie in den Ovarien, bei denen die Tumorgenese am weitesten fortgeschritten war, etwas nach.

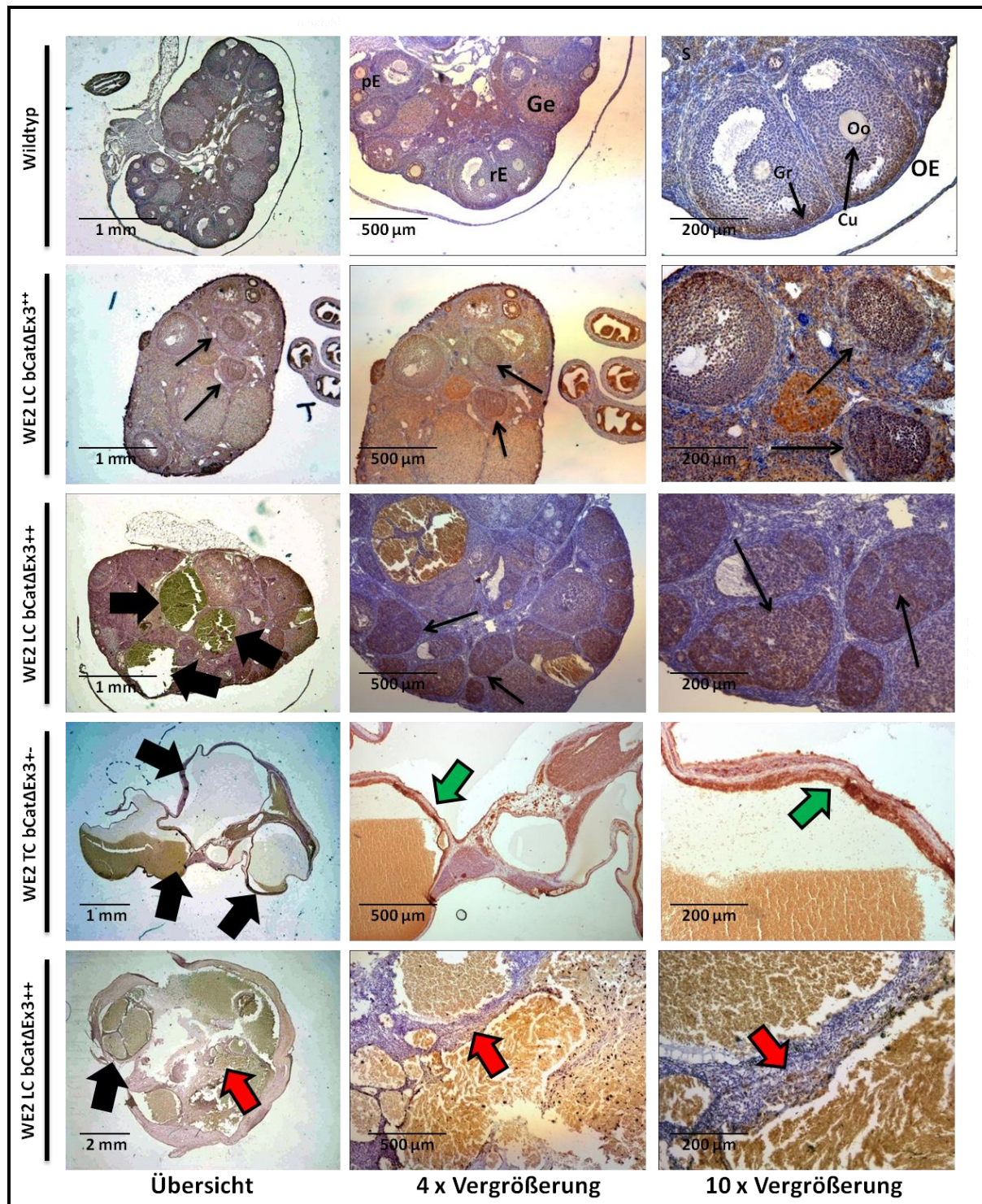


Abbildung 3.33: Nachweis von β -Catenin in veränderten Ovarien von WE2 TC bCat Δ Ex3-positiven und WE2 LC bCat Δ Ex3-positiven Mäusen

In dieser Abbildung ist die Expression und Lokalisation von β -Catenin durch IHC-Färbung auf Paraffinschnitten eines wildtypischen Ovars und mehrerer tripeltransgener, veränderter Ovarien dargestellt. Von oben nach unten nimmt der Grad der ovariellen Veränderung zu und β -Catenin exprimierende Zellen sind an einer braunen Färbung zu erkennen. Dabei ist im Ovar der wildtypischen Maus eine zytoplasmatische Expression von β -Catenin in allen Zelltypen des Organs nachweisbar. Dies ist auch in den veränderten Ovarien der Fall, wobei in diesen zudem eine nukleäre Akkumulation von β -Catenin in allen für den Granulosazelltumor typischen histologischen Strukturen zu erkennen ist. **Abkürzungen und Symbole:** (Cu): Cumulus-Zellen; (Ge): Gelbkörper; (Gr): Granulosazellen; (OE): Ovariales Epithel; (Oo): Oozyte; (pE): primäre Eizelle; (rE): reife Eizelle; (S): stromale Zellen; (dicker, grüner Pfeil): Mehrlagige Granulosazellschicht einer Zyste; (dicker, roter Pfeil): tumoröses Gewebe eines Granulosazelltumors; (dicker, schwarzer Pfeil): Zyste; (dünner, schwarzer Pfeil): Ansammlung von strukturell unorganisierten pleomorphen Granulosa-Zellen.

Nach den Analysen der HE-Schnitte (Niere und Ovar) von tripeltransgenen Mäusen konnte festgehalten werden, dass es sich bei den veränderten Nieren um polyzystische Nieren handelt (Saadi-Kheddouci *et. al.*, 2001) und bei den zystischen bzw. tumorösen Ovarien um Granulosazelltumore (Boerboom *et. al.*, 2005). Zudem wiesen die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen darauf hin, dass β -Catenin an der Veränderung dieser Organe beteiligt ist.

3.2.2.4.2 Molekulare Analyse von veränderten, tripeltransgenen Organen

Durch einen *lox-out* des Exons 3 von *Ctnnb1* werden wichtige Aminosäuren (z.B. S33, S37, T41, S45) entfernt, die für die Phosphorylierung von β -Catenin gebraucht werden (Polakis, 1999). Dadurch kann β -Catenin nicht mehr abgebaut werden, akkumuliert im Nukleus und führt zur verstärkten Expression von β -Catenin-Zielgenen (Clevers, 2006). Zu diesen Zielgenen gehören die Onkogene *c-myc* und *Cyclin D1*, die in vielen Tumoren die Tumorgenese positiv beeinflussen (Pelengaris *et. al.*, 2003; Tashiro *et. al.*, 2007). Somit sollte auch eine Aktivierung bzw. ein trunkiertes β -Catenin in den zystischen bzw. tumorösen Organen beider Modelle nachweisbar sein, wodurch eine erhöhte Expression der β -Catenin-Zielgene *c-myc* und *Cyclin D1* induziert werden könnte. Ist dies der Fall wären diese Ergebnisse eine Bestätigung der immunhistochemischen Analysen.

Zu diesem Zweck wurden von den phänotypisch auffälligen, tripeltransgenen Nieren und Ovarien Proteine isoliert und die Aktivierung bzw. Expression von β -Catenin und dessen Zielgenen (*c-myc* und *Cyclin D1*) durch *Western blot*-Analysen untersucht. Als Kontrollen dienten Proteine von wildtypischen und nicht tripeltransgenen Organen. Zudem wurden auch Proteine von phänotypisch unauffälligen, tripeltransgenen Organen analysiert, bei denen der Nachweis eines *lox-outs* des Exons 3 von *Ctnnb1* durch PCR nicht möglich gewesen war. Generell werden im Folgenden nur die *Western blot*-Ergebnisse des WE2 TC bCat Δ Ex3-Modells dargestellt. Sie gleichen den Ergebnissen des WE2 LC bCat Δ Ex3-Modells.

Die *Western blot*-Ergebnisse der präparierten Nieren zeigten einen Nachweis von β -Catenin in fast allen untersuchten Proben (siehe Abb. 3.34). Lediglich die wildtypische Niere und zwei tripeltransgene Nieren ohne nachgewiesenen *lox-out* des dritten Exons von *Ctnnb1* wiesen keine β -Catenin-Expression auf. Generell war die Expression des Proteins in den verschiedenen Nieren unterschiedlich. Nur die Niere des Versuchstiers z5942 zeigte eine auffällig starke β -Catenin-Expression und genauso wie die Niere der Maus z6264 einen schwachen Nachweis eines *lox-outs* des Exons 3 von *Ctnnb1*, der an der zusätzlichen kleineren Bande erkennbar war.

Auch die Expression von c-myc und Cyclin D1 war in den untersuchten Proben sehr unterschiedlich. Während in der wildtypischen Niere und den nicht tripeltransgenen Nieren der Kontrolltiere eine Expression der β -Catenin-Zielgene nicht bzw. kaum nachweisbar war, konnte das Expressionslevel dieser Proteine in den tripeltransgenen Nieren mit und ohne phänotypischer Auffälligkeit mal schwach und mal stark sein.

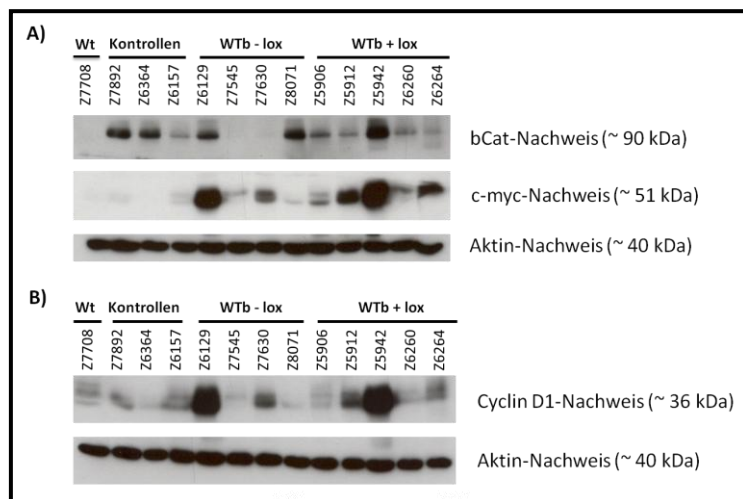


Abbildung 3.34: In polyzystischen Nieren von WE2 TC bCat Δ Ex3-positiven Mäusen kann eine Aktivierung von β -Catenin und dessen Zielgenen kaum nachgewiesen werden

Für *Western blot*-Analysen der Nieren des WE2 TC bCat Δ Ex3-Modells wurden die Proteine phänotypisch auffälliger, tripeltransgener Nieren präpariert, in denen ein *lox-out* des Exons 3 von *Ctnnb1* mittels PCR nachgewiesen worden war (WTb + lox). Zum Vergleich dienten isolierten Proteine aus Nieren von wildtypischen (WT), nicht tripeltransgenen (Kontrollen) und tripeltransgenen Mäusen, bei denen ein *lox-out* nicht festgestellt werden konnte

(WTb - lox). Nachfolgend wurde in diesen Proben die Aktivierung bzw. Expression von β -Catenin (bCat), c-myc (beide in **A**) und Cyclin D1 (**B**) durch *Western blot*-Analysen untersucht. Zur Kontrolle der analysierten Gesamtproteinmenge analysierte man die Expression des Haushaltsgens Aktin. Die Expression von Aktin war in allen Nieren gleich (Angabe des Molekulargewichts der jeweiligen Proteine in Klammern).

Zusammenfassend konnte nach der *Western blot*-Analyse der polyzystischen Nieren festgehalten werden, dass eine Aktivierung von β -Catenin in den zystischen Nieren kaum nachweisbar war. Denn nur die Proben z5942 und z6242 wiesen eine zusätzliche kleinere β -Catenin-Bande auf, die einem *lox-out* des Exons 3 von *Ctnnb1* entsprach. Durch diese aktivierende *Ctnnb1*-Mutation konnte aber nur in der Niere der Maus z5942 eine nachfolgend höhere Expression der β -Catenin-Zielgene c-myc und Cyclin D1 beobachtet werden (siehe Abb. 3.34). Daher war durch diese Analysen in Frage gestellt, ob die aktivierte *Ctnnb1*-Mutation für die Entstehung der zystischen Nieren verantwortlich ist und widersprachen somit den Ergebnissen der immunhistochemischen Analysen.

Eindeutigere Aussagen ließen die Ergebnisse der *Western blot*-Analysen der präparierten Ovarien zu. Zwar war die Expression von β -Catenin in allen Ovarien (nicht tripeltransgenen Ovarien, sowie tripeltransgenen Ovarien mit und ohne *lox out* des Exons 3 von *Ctnnb1*) darstellbar, doch nur die phänotypisch auffälligen Ovarien zeigten eine zusätzliche kleinere β -Catenin-Bande, die der erwarteten Größe des Proteins durch einen *lox-out* des Exons 3 von *Ctnnb1* entsprach (siehe Abb. 3.35).

Zudem war in den zystischen bzw. tumorösen Ovarien die Expression der β -Catenin-Zielgene (*c-myc* und *Cyclin D1*) im Vergleich zu den Kontrollen stark erhöht. Dies konnte bei den Analysen der *Cyclin D1*-Expression deutlicher erkannt werden, als bei den Expressionsanalysen von *c-myc*.

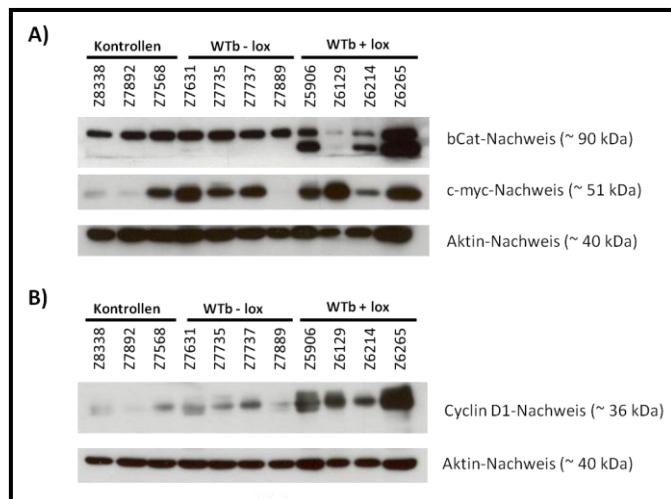


Abbildung 3.35: In veränderten Ovarien von WE2 TC bCat Δ Ex3-positiven Mäusen ist die Aktivierung von β -Catenin und eine Überexpression von *c-myc* und *Cyclin D1* nachweisbar

Von WE2 TC bCat Δ Ex3-positiven Ovarien (WTb + lox), bei denen neben der Veränderung ein *lox-out* des Exons 3 von *Ctnnb1* mittels PCR nachgewiesen worden war, wurden Proteine präpariert. Zum Vergleich dienten isolierte Proteine der Ovarien von nicht tripeltransgenen (Kontrollen) und tripeltransgenen Mäusen, bei denen ein *lox-out* von Exon 3 des *Ctnnb1*-Gens nicht festgestellt werden konnte (WTb - lox). Nach der Präparation wurde von diesen Proben mit Hilfe von *Western blot*-Analysen die Aktivierung bzw. Expression

von β -Catenin (bCat), *c-myc* (beide in **A**) und *Cyclin D1* (**B**) untersucht. Zur Kontrolle der analysierten Gesamtproteinmenge analysierte man die Expression des Haushaltsgens Aktin. Die Expression von Aktin war in allen Nieren gleich (Angabe des Molekulargewichts der jeweiligen Proteine in Klammern).

Durch diese Ergebnisse war davon auszugehen, dass eine durch die Modelle induzierte Akkumulation von β -Catenin und eine damit bedingte Aktivierung der kanonischen Wnt-Signalkaskade für die Zystenbildung und die Tumorgenese der Ovarien verantwortlich sind. Somit unterstützten diese Ergebnisse die Beobachtungen der immunhistochemischen Analysen.

Zusammenfassend konnte nach der Analyse der Modelle WE2 TC bCat Δ Ex3 und WE2 LC bCat Δ Ex3 festgehalten werden, dass eine konstitutive β -Catenin-Aktivierung in der Frühschwangerschaft wohl nicht mit dem embryonalen Überleben vereinbar ist. Dies ist anhand der durchgeführten *timed matings* erkennbar, bei denen die Anzahl an tripeltransgenen Tieren sank und die Häufigkeit der Aborte stieg, umso früher man Doxycyclin während der Schwangerschaft absetzte. Trotzdem wurden unabhängig vom Zeitpunkt des Doxycyclinentzugs tripeltransgene Tiere geboren, wobei ein *lox-out* des Exons 3 von *Ctnnb1* mittels PCR nur bei einzelnen Tieren nachweisbar war, die Doxycyclin mindestens bis Tag 10,5 *d.p.c.* erhalten hatten. Somit schienen sich die meisten tripeltransgenen Tiere, die aus den *timed matings* stammten, dem selektiven Druck einer konstitutiven β -Catenin-Aktivierung durch ein nicht induziertes WE2 TC bCat Δ Ex3- bzw. WE2 LC bCat Δ Ex3-System zu entziehen. Das die Modelle nur bedingt induzierbar sind, konnte auch in den nachfolgenden Analysen von tripeltransgenen Tieren festgestellt werden, denen Doxycyclin erst nach dem Absetzen von den

Eltern entzogen worden war, da ein *lox-out* des Exons 3 von *Ctnnb1* durch eine PCR nicht in allen diesen Tieren festgestellt werden konnte.

War ein PCR-Nachweis der Deletion des Exons 3 von *Ctnnb1* möglich, entwickelten die meisten tripeltransgenen Tiere zystische bzw. tumoröse Veränderungen der Nieren und Ovarien. Dabei handelt es sich wohl im Fall der Nieren um eine polyzystische Nierenerkrankung und bei den veränderten Ovarien um Granulosazelltumore. Durch histologische Analysen konnte eine nukleäre Akkumulation von β -Catenin in den veränderten Nieren und Ovarien nachgewiesen werden, so dass eine aktivierende *Ctnnb1*-Mutation wohl der Grund für die Tumorgenese dieser Organe ist. Molekulare Analysen der veränderten Ovarien unterstützten diese Theorie, da es neben dem Nachweis des aktivierten β -Catenins zur Überexpression von Cyclin D1 und c-myc kam. Im Falle der veränderten Nieren war dies nur bedingt zu beobachten.

Generell scheinen also beide Modelle in einem aktiven Zustand die Entstehung von polyzystischen Nieren und Granulosazelltumoren zu begünstigen, doch die Entstehung eines Wilms-Tumors wird nicht induziert.

3.2.3 Herstellung und Analyse des Wilms-Tumor-Modells WE2 Wnt1

Der dritte experimentelle Ansatz zur Herstellung eines Wilms-Tumors war das WE2 Wnt1-Modell. Ähnlich wie die Modelle WE2 TC bCat Δ Ex3 und WE2 LC bCat Δ Ex3 beruht es auf der Deregulation der kanonischen Wnt-Signalkaskade in Wnt1-exprimierenden Zellen des metanephrischen Mesenchyms, wodurch es zum Verbleib und einer erhöhten Proliferation dieser Vorläuferzellen kommen kann, so dass nachfolgend die Entstehung eines triphasischen Wilms-Tumors begünstigt werden könnte (Li *et. al.*, 2004; Fukuzawa *et. al.*, 2009). Allerdings sollte dies in WE2 Wnt1-positiven Mäusen nicht durch den *lox-out* des Exons 3 von *Ctnnb1* erreicht werden, sondern durch eine Wnt1-tTA vermittelte Überexpression des Wnt-Liganden Wnt1. Eine damit verbundene, verstärkte Expression dieses Gens kann zur erhöhten Aktivität der kanonischen Wnt-Signalkaskade führen (siehe Einleitung 1.4.1).

Um nun dieses Modell zu erhalten und zu analysieren, sollten die Mauslinien WE2 und Wnt1 (siehe Material und Methoden 2.1.11) verpaart werden. In den daraus resultierenden, doppeltransgenen WE2 Wnt1-Mäusen könnte dann ein Wilms-Tumor nach der zuvor beschriebenen Theorie entstehen. Das WE2 Wnt1-Wilms-Tumor-Modell beruht auf dem *Tet off*-System (siehe Ergebnisse 3.1) und ist in Abbildung 3.36 beschrieben.

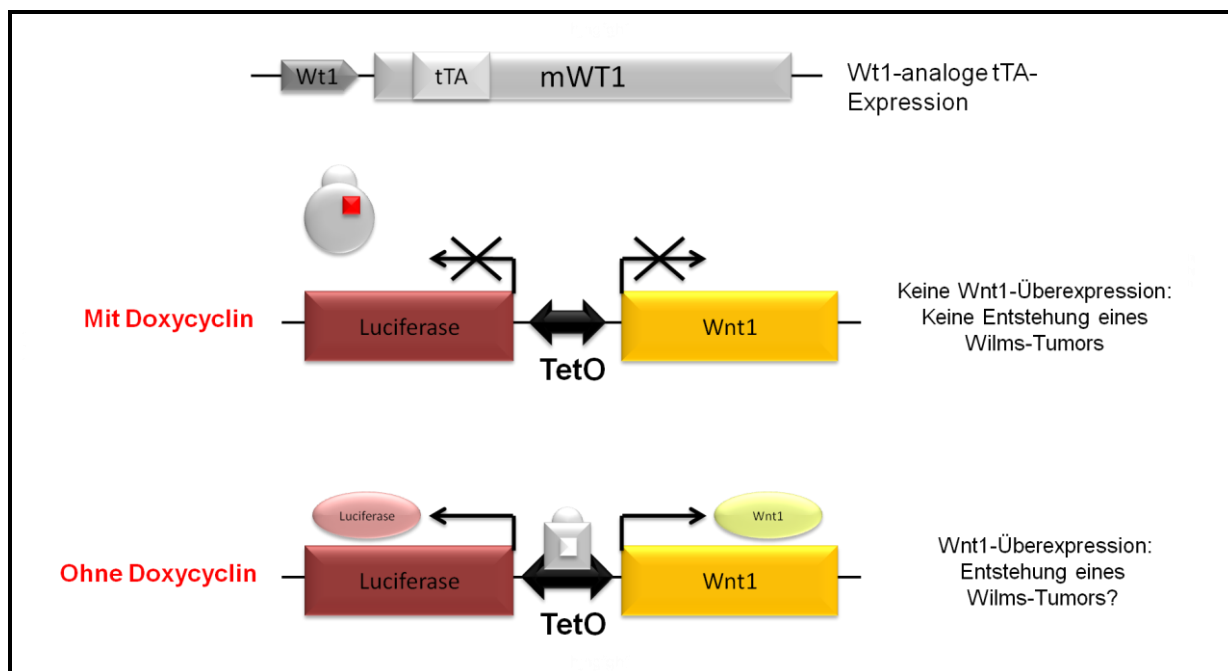


Abbildung 3.36: Schematische Darstellung des Wilms-Tumor-Modells WE2 Wnt1

In doppeltransgenen WE2 Wnt1-Mäusen kommt es durch den *Wt1*-Promotor des WE2-Transgens zur zeitlichen und räumlichen Wt1-analogen Expression eines tetrazyklinabhängigen Transaktivators (tTA). Unter der Gabe von Doxycyclin erfährt der tTA eine Konformationsänderung, so dass dieser nicht an den tTA regulierten Promotor (TetO) des Wnt1-Transgens binden kann. Somit kommt es nicht zur Überexpression von Wnt1 und einer damit verbundenen verstärkten Aktivität der kanonischen Wnt-Signalkaskade. Dies ändert sich durch den Entzug von Doxycyclin. Durch das Fehlen des Tetrazyklins kann der tTA an den Promotor des Reporter-Transgens Wnt1 binden. Nachfolgend wird neben einer Luciferase auch Wnt1 exprimiert und ein Wilms-Tumor kann nach der zuvor beschriebenen Theorie entstehen.

Zur Generierung von doppeltransgenen WE2 Wnt1-Mäusen wurden WE2-positive Weibchen mit Wnt1-positiven Männchen unter der Gabe von Doxycyclin verpaart (siehe Abb. 3.37). Anschließend führte man mit denen aus dieser Verpaarung resultierenden, doppeltransgenen Männchen und Weibchen *timed matings* durch, bei denen zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Schwangerschaft Doxycyclin entzogen wurde (Tag 0,5, 6,5 und 10,5 *d.p.c.*). Wie schon im Falle der Modelle WE2 TC bCat Δ Ex3- und WE2 LC bCat Δ Ex3 beschrieben (siehe Ergebnisse 3.2.3), sollte dadurch die Entstehung eines Wilms-Tumors induziert werden.

Bei allen *timed matings* wurden die Schwangerschaften und die aus ihnen resultierenden Jungtiere beobachtet. Anschließend sollten die WE2 Wnt1-positiven Nachkommen nach dem dritten Lebensmonat präpariert und wie im Falle der Modelle WE2 TC bCat Δ Ex3 und WE2 LC bCat Δ Ex3 histologisch und molekular untersucht werden. Neben den beschriebenen Verpaarungen wurden auch Erhaltungszuchten angesetzt, um eine größere Anzahl von doppeltransgenen Tieren zu erhalten (siehe Abb. 3.37).



Abbildung 3.37: Verpaarungsschema zur Herstellung des WE2 Wnt1-Modells

In dieser Abbildung ist das Verpaarungsschema zur Herstellung des WE2 Wnt1-Modells und der nachfolgend angesetzten Erhaltungszuchten dargestellt. Während in **A)** die Zucht für die Generierung der ersten WE2 Wnt1-positiven Mäuse abgebildet ist, sind in **B)** die Zuchtangaben zum Erhalt von doppeltransgenen Nachkommen angegeben.

3.2.3.1 Auswertung der *timed matings* des WE2 Wnt1-Modells

Bei allen durchgeführten *timed matings* wurde kein Jungtier mit einem Genotyp WE2 Wnt1 geboren (siehe Tabelle 3.4). Es kamen lediglich ein nicht-doppeltransgenes Jungtier bei zwei durchgeführten *timed matings* mit Doxycyclinentzug an Tag 0,5 *d.p.c.* zur Welt, sowie vier bzw. ein nicht-doppeltransgenes Jungtier bei einmalig durchgeführten *timed matings* mit Absetzung des Doxycyclins an Tag 6,5 bzw. 10,5 *d.p.c.*. Ein Abort konnte nur bei einem *timed mating* beobachtet werden (Tag 0,5 *d.p.c.*).

Ob es durch Fehlbildungen zum intrauterinen Tod von WE2 Wnt1-positiven Embryonen kommt, sollte durch zusätzliche *timed matings* geklärt werden, bei denen man Doxycyclin an Tag 0,5 *d.p.c.* entzog und die Embryonen an Tag 10,5, 11,5 und 12,5 der Schwangerschaft entnommen wurden. Bei diesen *timed matings* waren 66,6 % aller entnommenen Embryonen WE2 Wnt1-positiv, wenn sie an Tag 10,5 *d.p.c.* präpariert wurden, sowie 50,0 % an Tag 11,5 *d.p.c.* und 27,3 % an Tag 12,5 *d.p.c.* (siehe Tabelle 3.4). Generell waren die Embryonen phänotypisch unauffällig und selbst nach dem Herstellen von Paraffinschnitten konnten bei allen doppeltransgenen Embryonen, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Schwangerschaft entnommen worden waren, keine histopathologischen Veränderungen entdeckt werden. Sie

entsprachen in ihrer Entwicklung denen von wildtypischen Embryonen, so dass z.B. in allen eine normal verlaufende Nephrogenese ohne Anzeichen einer beginnenden Entstehung eines Wilms-Tumors beobachtet werden konnte (Daten nicht gezeigt).

Tabelle 3.4: Bei den *timed matings* des WE2 Wnt1-Modells werden keine doppeltransgenen Tiere geboren

In der Tabelle 3.4 sind unter **A)** die Ergebnisse aller *timed matings* des WE2 Wnt1-Modells in Tabellenform aufgelistet, bei denen zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Schwangerschaft Doxycyclin entzogen worden ist. In **B)** sind die zusätzlich durchgeführten *timed matings* tabellarisch dargestellt, bei denen die Embryonen an Tag 10,5, 11,5 und 12,5 *d.p.c.* entnommen worden sind und der Doxycyclinentzug an Tag 0,5 *d.p.c.* stattgefunden hat. **Abkürzungen:**; (A): Aborte; (-Dox): Doxycyclinentzug; (*d.p.c.*): *days post coitum* (dtg): doppeltransgen; (E): Embryon; (Jt): Jungtier; (Sw): Schwangerschaft; (TM): *timed mating*; (Vp): Verpaarung.

A)

<i>Timed matings</i> (TM) des Modells WE2 Wnt1	Anzahl doppeltransgener Tiere (dtg) in Bezug auf die Gesamtzahl von abgesetzten Jungtieren (Jt)	Anzahl der Aborte (A) in Bezug auf die durchgeführten Verpaarungen (Vp)
TM –Dox Tag 0,5 <i>dpc</i>	0 dtg von 1 Jt (0,0 %)	1 A von 2 Vp (50,0 %)
TM –Dox Tag 6,5 <i>dpc</i>	0 dtg von 4 Jt (0,0 %)	0 A von 1 Vp (0,0 %)
TM –Dox Tag 10,5 <i>dpc</i>	0 dtg von 1 Jt (0,0 %)	0 A von 1 Vp (0,0 %)

B)

<u>Embryonenpräparation zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Sw (-Dox Tag 0,5 <i>dpc</i>)</u>	Anzahl doppeltransgener Tiere (dtg) in Bezug auf die Gesamtzahl von präparierten Embryonen (E)
Präparation Tag 10,5 <i>dpc</i>	4 dtg von 6 E (66,6 %)
Präparation Tag 11,5 <i>dpc</i>	5 dtg von 10 E (50,0 %)
Präparation Tag 12,5 <i>dpc</i>	3 dtg von 11 E (27,3 %)

Nach der Auswertung der WE2 Wnt1-*timed matings*, bei denen Doxycyclin an Tag 0,5, 6,5 und 10,5 *d.p.c.* abgesetzt worden war, gab es Anzeichen, dass eine Fehlregulation der kanonischen Wnt-Signalkaskade zu einem frühen und späten Zeitpunkt der Embryogenese nicht mit dem embryonalen Überleben vereinbar ist. Somit schien das WE2 Wnt1-Modell nicht zur Herstellung eines Wilms-Tumors geeignet zu sein. Widersprüchlich dazu waren die histologischen Untersuchungen von doppeltransgenen Embryonen der zusätzlich durchgeführten *timed matings*. Diese Ergebnisse stellten somit in Frage, ob die beobachteten Effekte, der zuerst durchgeführten *timed matings*, auf eine Fehlregulation der Wnt-Signalkaskade zurückzuführen waren. Ob es durch das WE2 Wnt1-Modell zur Überexpression von Wnt1 kommen kann und es somit aktiv und induzierbar ist, sollte daher im Nachfolgenden an WE2 Wnt1-positiven Tieren untersucht werden, denen man Doxycyclin nach dem Absetzen von den Eltern entzogen hatte (siehe Abb. 3.37).

3.2.3.2 Auswertung der Präparation doppeltransgener Tiere

Um die Aktivität des WE2 Wnt1-Modells zu überprüfen, wurden WE2 Wnt1-positive Mäuse, die aus der Erhaltungszucht von doppeltransgenen Männchen und Weibchen entstanden waren und denen man Doxycyclin nach dem Absetzen von den Eltern entzogen hatte, nach sechs Monaten ohne Doxycyclingabe präpariert.

Dabei wurden neben anderen auffälligen Organen immer die Wt1-exprimierenden Organe Niere, Hoden, Ovar und Uterus je nach Geschlecht der doppeltransgenen Tiere entnommen. Diese Organe wurden anschließend photographisch dokumentiert und jeweils ein Stück zur Isolation von DNA, RNA und Proteinen für molekulare Analysen abgeschnitten. Des Weiteren untersuchte man jeweils ein Stück der entnommenen Organe histologisch.

Bis zu dem Zeitpunkt der Präparation wurden äußerlich keine phänotypischen Auffälligkeiten beobachtet. Es fiel lediglich auf, dass sechs WE2 Wnt1-positive Männchen und fünf WE2 Wnt1-positive Weibchen vor dem Ablauf der sechs Monate starben. Bei den noch lebenden WE2 Wnt1-positiven Tieren wurden nach der Eröffnung der Bauchhöhle phänotypische Veränderungen von Organen festgestellt (siehe Ergebnisse 3.2.3.3). Insgesamt präparierte man 16 doppeltransgene Männchen, von denen drei eine Veränderungen der Nieren und der Hoden aufwiesen (siehe Tabelle 3.5). Bei den 28 präparierten Weibchen wurden bei 11 veränderte Ovarien beobachtet. Die Nieren und der Uterus waren bei keinem Weibchen phänotypisch auffällig.

Insgesamt wurden keine weiteren Veränderungen in anderen Organen der WE2 Wnt1-positiven Männchen und Weibchen beobachtet.

Tabelle 3.5: Zusammenfassung der Präparation WE2 Wnt1-positiver Männchen und Weibchen nach sechs Monaten ohne Doxycyclingabe

Die Tabelle zeigt die Auswertung der Präparation von doppeltransgenen Männchen (A) und Weibchen (B) des WE2 Wnt1-Modells.

A)

WE2 Wnt1-Männchen	Tieranzahl
Anzahl doppeltransgener (dtg) Männchen	16
Anzahl der gestorbenen dtg-Männchen ohne Präparation	6
Anzahl dtg-Männchen mit einem Phänotyp (Nieren und Hoden betroffen)	3

B)

WE2 Wnt1-Weibchen	Tieranzahl
Anzahl doppeltransgener (dtg) Weibchen	28
Anzahl der gestorbenen dtg-Weibchen ohne Präparation	5
Anzahl dtg-Weibchen mit einem Phänotyp (Ovar betroffen)	11

Ob die organischen Veränderungen durch eine Deregulation der kanonischen Wnt-Signalkaskade entstanden waren und um welche Art von Veränderungen es sich handelte, sollte in nachfolgenden histologischen und molekularen Analysen untersucht werden (siehe Ergebnisse 3.2.3.4).

3.2.3.3 Phänotyp der Mäuse des WE2 Wnt1-Modells

Wie in 3.2.3.2 beschrieben, wiesen die WE2 Wnt1-positiven Männchen und Weibchen sechs Monate nach Doxycyclinentzug äußerlich keine Auffälligkeiten auf. Doch nach Eröffnung der Bauchhöhle waren Veränderungen der Nieren, Hoden und der Ovarien zu erkennen.

Die phänotypisch auffälligen Nieren wiesen viele kleine, mit klarer bzw. rötlicher Flüssigkeit gefüllte Zysten auf. Zudem waren sie weniger stark vaskularisiert als die Nieren wildtypischer Mäuse. Eine Veränderung der Größe konnte im Vergleich zu wildtypischen Nieren nicht beobachtet werden (siehe Abb. 3.38).

Im Gegensatz dazu waren die phänotypisch auffälligen Hoden von WE2 Wnt1-positiven Männchen wesentlich kleiner als wildtypische Hoden von Mäusen gleichen Alters. Während wildtypische Hoden ungefähr bis zu 0,7 cm Zentimeter groß sind, wiesen WE2 Wnt1-positive Hoden eine Größe von nur 0,2 bis 0,4 cm auf. Davon abgesehen waren keine weiteren Veränderungen, wie z.B. Zysten oder tumoröse Gewebe zu beobachten.

Bei doppeltransgenen Weibchen waren nur die Ovarien verändert. Es konnten einzelne, kleine Zysten erkannt werden, die entweder mit klarer oder blutgeronnener Flüssigkeit gefüllt waren. Die Zysten veränderten die Größe der Ovarien im Vergleich zu denen einer wildtypischen Maus kaum.

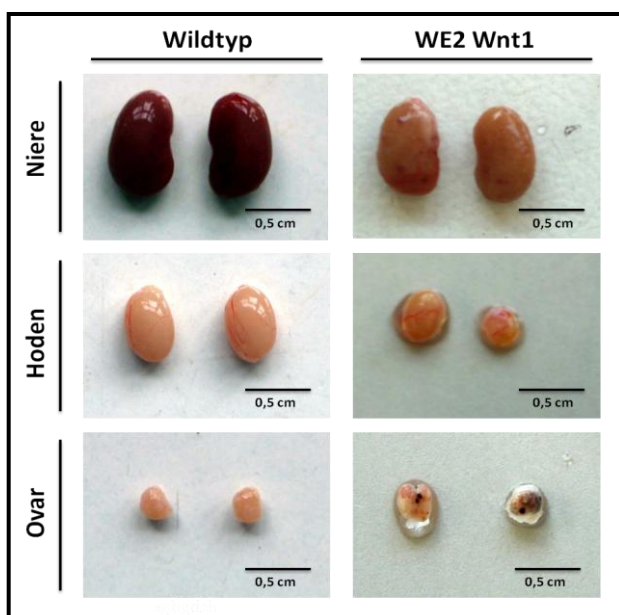


Abbildung 3.38: Bei WE2 Wnt1-positiven Tieren entwickeln sich nach sechsmonatigem Doxycyclinentzug Veränderungen der Nieren, der Ovarien und der Hoden

In dieser Abbildung sind die Nieren, Hoden und Ovarien von wildtypischen Mäusen und phänotypisch auffälligen Tieren des Genotyps WE2 Wnt1 dargestellt. Bei den doppeltransgenen Mäusen kann eine Veränderung der Nieren, Hoden und Ovarien beobachtet werden.

Abgesehen von den oben erwähnten Veränderungen waren keine weiteren Organe phänotypisch auffällig. Wie in 3.2.3.2 beschrieben, wurden die entnommenen Organe im Anschluss histologisch und molekular untersucht.

3.2.3.4 Histologische und molekulare Analyse von veränderten, WE2 Wnt1-positiven Organen

Die histologischen und molekularen Untersuchungen sollten helfen, die Induzierbarkeit und Aktivität des WE2 Wnt1-Modells zu beweisen. Dieser Beweis ist in diesem Modell nicht direkt durch eine einfache PCR möglich, wie dies z.B. im WE2 TC bCat Δ Ex3- bzw. WE2 LC bCat Δ Ex3-Modell der Fall ist. Der Nachweis kann nur indirekt erbracht werden, indem z.B. durch *Western blot*-Analysen die Fehlregulation der kanonischen Wnt-Signalkaskade durch die Überexpression bzw. Stabilisierung von Wnt1, β -Catenin und dessen Zielgenen in WE2 Wnt1-positiven Mäusen nachgewiesen wird. Auch durch histologische Analysen, wie z.B. dem immunhistochemischen Nachweis von nukleär akkumuliertem β -Catenin in den Organen von WE2 Wnt1-positiven Mäusen, ist ein indirekter Nachweis einer Wnt1-Überexpression möglich. Des Weiteren kann durch HE-Färbungen die Veränderung der Organe charakterisiert werden.

3.2.3.4.1 Histologische Analyse von veränderten, WE2 Wnt1-positiven Organen

Mit Hilfe der histologischen Untersuchungen der veränderten Nieren, Hoden und Ovarien von doppeltransgenen Tieren, denen Doxycyclin nach dem Absetzen von den Eltern entzogen worden war, sollte zunächst das Ursprungsgewebe und somit die Art der Veränderung genauer analysiert werden (HE-Färbung). Im Anschluss wurde die Expression und Lokalisation von β -Catenin bestimmt, damit die Aktivität des Systems und dessen Beteiligung an den organischen Veränderungen genauer bestimmt und bewiesen werden konnte (immunhistochemische Färbung).

Auf den HE-gefärbten Paraffinschnitten der veränderten WE2 Wnt1-positiven Nieren war erkennbar, dass einige Glomeruli im Vergleich zum Wildtyp eine veränderte Morphologie mit Flüssigkeitsansammlung aufwiesen. Zudem waren viele, kleine Zysten zu erkennen, die an Anzahl und Größe variierten (siehe Abb. 3.39). Ihr Ursprung ging wohl von den proximalen und distalen Tubuli der Nierenrinde aus. Des Weiteren waren sie mit einer klaren Flüssigkeit gefüllt und verdrängten kaum gesundes Gewebe. Ähnlich wie im Falle der zystischen Nieren der Modelle WE2 TC bCat Δ Ex3 und WE2 LC bCat Δ Ex3 glich das histologische Erscheinungsbild einer polyzystischen Niere (Saadi-Kheddouci *et. al.*, 2001).

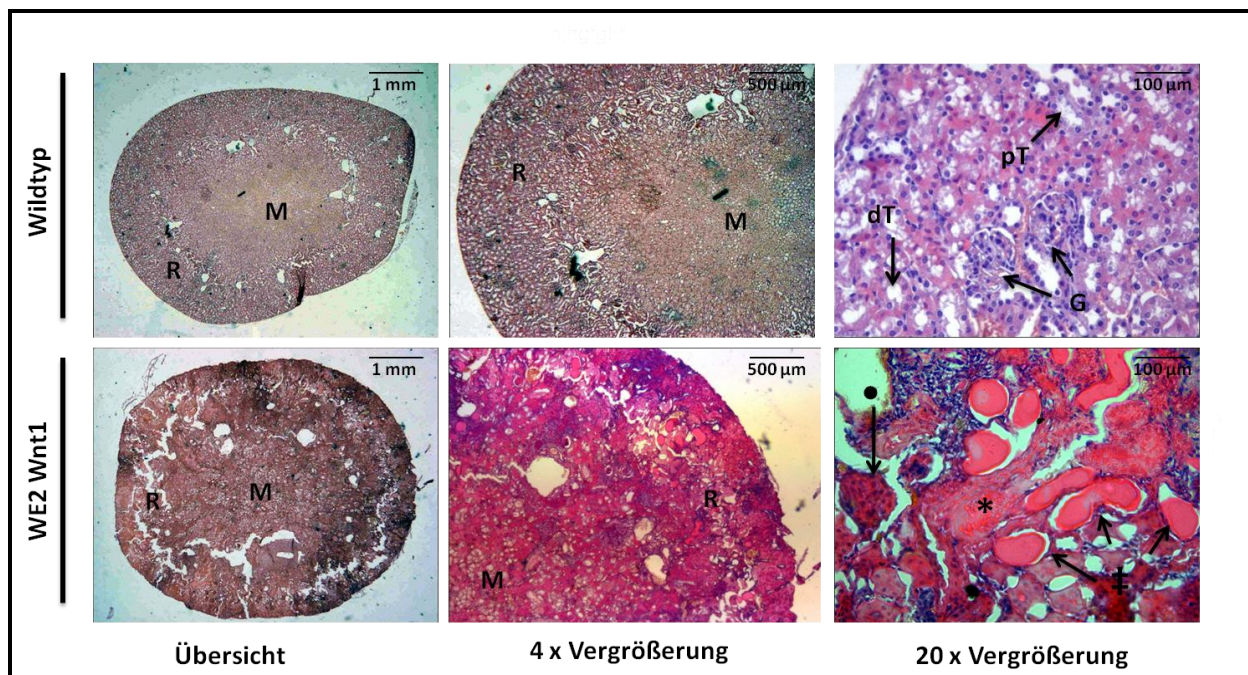


Abbildung 3.39: Polyzystische Nieren WE2 Wnt1-positiver Mäuse

In dieser Abbildung ist ein HE-gefärbter Nieren-Paraffinschnitt einer wildtypischen und einer WE2 Wnt1-positiven Maus dargestellt. Dabei sind in der wildtypischen Niere keine Veränderungen zu beobachten, während die Niere der doppeltransgener Maus Zysten in der Nierenrinde aufweist. Zudem werden bei einigen Glomeruli eine veränderte Morphologie und eine Flüssigkeitsansammlung festgestellt. **Symbole und Abkürzungen:** (dT): distaler Tubulus; (G): Glomerulus; (M): Nierenmark; (pT): proximaler Tubulus; (R): Nierenrinne; (♯): Zyste/Ursprung: distaler Tubulus; (*): Zyste/Ursprung: proximaler Tubulus; (●): Glomerulus mit veränderter Morphologie und Flüssigkeitsansammlung.

Nach den HE-Färbungen der Paraffinschnitte von veränderten WE2 Wnt1-positiven Hoden konnte unter dem Lichtmikroskop erkannt werden, dass die natürliche Struktur dieses Organs stark verändert war (siehe Abb. 3.40). Zwar waren die Hoden der doppeltransgenen Mäuse von einem Deckepithel umgeben und auch die Hodenkanälchen mit dem umschließenden Interstitium angelegt, doch waren sie im Vergleich zu den Hoden von wildtypischen Mäusen strukturell komplett verändert. So konnte z.B. ein stark vergrößertes Interstitium mit den beinhaltenen, testosteronbildenden Leydig-Zellen beobachtet werden. Des Weiteren war der natürliche Aufbau der Hodenkanälchen von Epithel (Sertoli-Zellen mit Spermato gonien), Spermatozyten, Spermato den und dem Lumen (von außen nach innen), der für die Differenzierung und Reifung der Spermien notwendig ist, komplett zerstört. So konnten so gut wie keine Spermatozyten und Spermato den entdeckt werden. Zudem lagen die Sertoli-Zellen mit einigen Spermato gonien nun auch in der Mitte der Hodenkanälchen, wo normalerweise die reifen Spermien durch das Lumen zum Samenleiter abtransportiert werden. Generell war das Epithel der Hodenkanälchen nicht mehr so kompakt und mehrschichtig, wie in den Hoden von wildtypischen Mäusen.

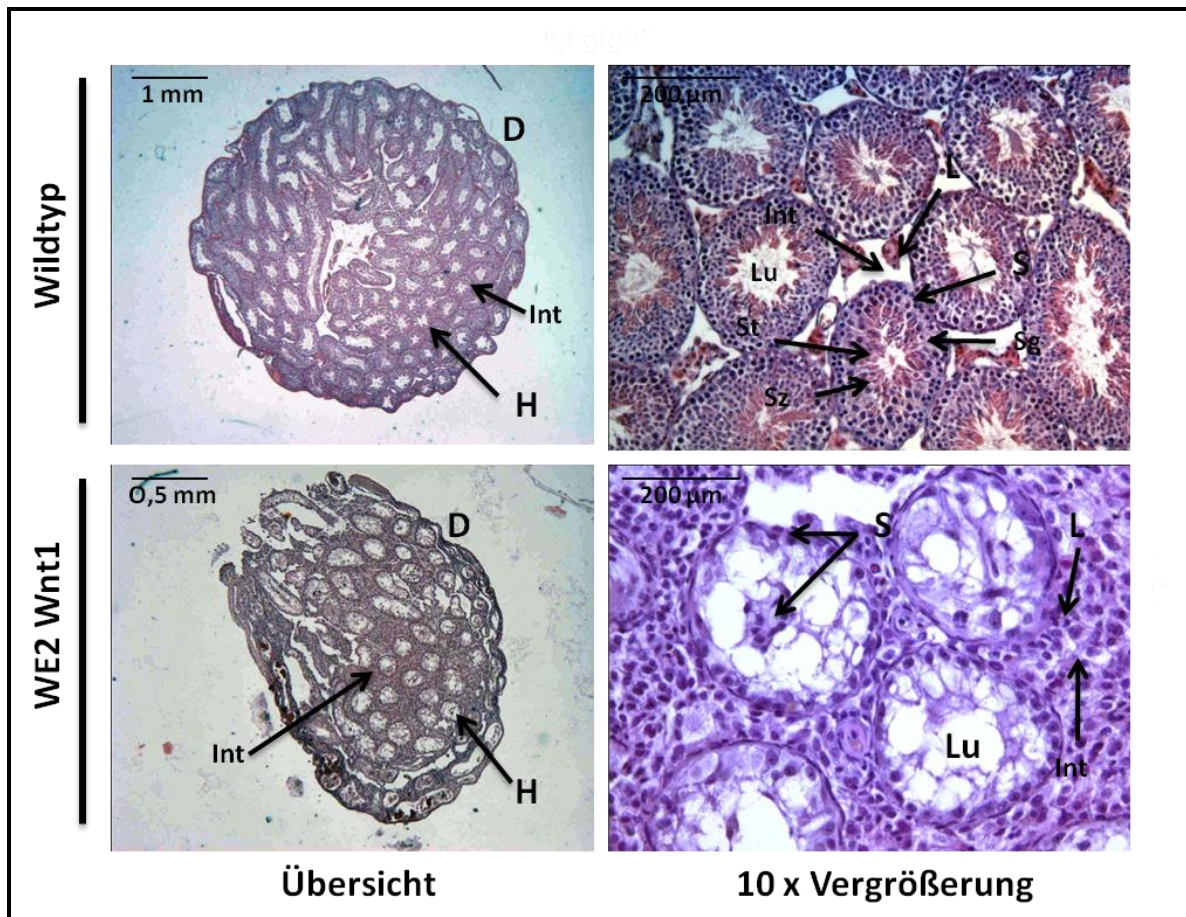


Abbildung 3.40: Hoden WE2 Wnt1-positiver Mäuse weisen eine veränderte Struktur der Hodenkanälchen und ein vergrößertes Interstitium auf

In dieser Abbildung ist ein HE-gefärbter Hoden-Paraffinschnitt einer wildtypischen und einer WE2 Wnt1-positiven Maus dargestellt. Während im wildtypischen Hoden alle charakteristischen Zelltypen und Strukturen dieses Organs unverändert sind, weist der doppeltransgene Hoden einen komplett veränderten Aufbau der Hodenkanälchen und ein vergrößertes Interstitium auf. **Abkürzungen:** (D): Deckepithel; (H): Hodenkanälchen; (Int): Interstitium; (L): Leydig-Zellen; (Lu): Lumen; (S): Sertoli-Zellen; (Sg): Spermatogonien; (St): Spermatiden; (Sz): Spermatozyten.

Im Falle der phänotypisch auffälligen Ovarien des WE2 Wnt1-Modell waren nach dem sechsmonatigen Doxycyclinentzug auf den HE-gefärbten Paraffinschnitten mehrere kleine Zysten zu erkennen. Die Zysten schienen sich dabei aus veränderten Granulosa-Zellen der Oozyten zu bilden. Denn häufig wurden um diese zystischen Strukturen mehrere Schichten von Granulosa-Zellen beobachtet. Neben diesen Zysten waren Ansammlungen von strukturell unorganisierten pleomorphen Granulosa-Zellen zu erkennen, die zudem keine Oozyten umschlossen (siehe Abb. 3.41). Die histologische Struktur der zystischen WE2 Wnt1-positiven Ovarien ähnelte somit den Ovarien von WE2 TC bCat Δ Ex3- bzw. WE2 LC bCat Δ Ex3-positiven Mäusen und stellte den Beginn der Tumorgenese eines Granulosazelltumors dar (Boerboom *et al.*, 2005).

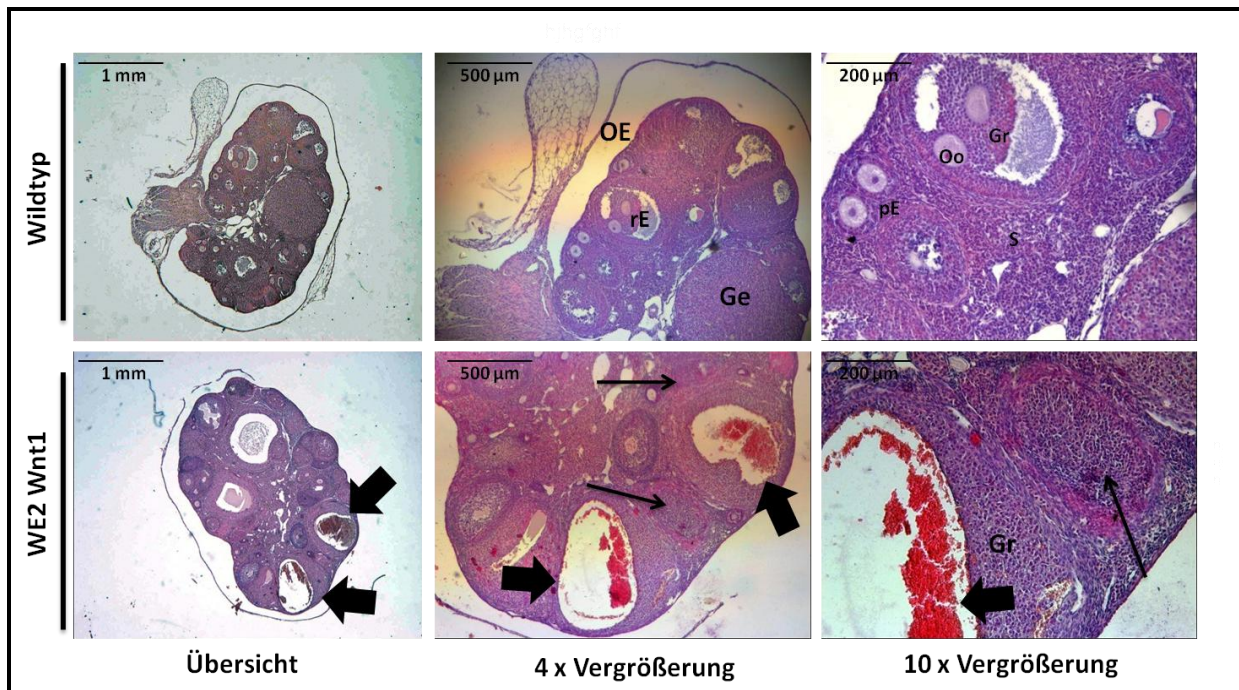


Abbildung 3.41: Veränderte Ovarien des WE2 Wnt1-Modells ähneln der beginnenden Tumorgenese von Granulosazelltumoren

In dieser Abbildung ist ein HE-gefärbter Ovar-Paraffinschnitt einer wildtypischen und einer WE2 Wnt1-positiven Maus dargestellt. Während im wildtypischen Ovar keine Veränderungen festzustellen sind, entspricht das histologische Bild des doppeltransgenen Ovars der beginnenden Tumorgenese eines Granulosazelltumors.

Abkürzungen und Symbole: (Ge): Gelbkörper; (Gr): Granulosazellen; (OE): Ovariales Epithel; (Oo): Oozyte; (pE): primäre Eizelle; (rE): reife Eizelle; (S): stromale Zellen; (dicker, schwarzer Pfeil): Zyste; (dünner, schwarzer Pfeil): Ansammlung von strukturell unorganisierten pleomorphen Granulosa-Zellen.

Nach denen gegen β -Catenin gerichteten immunhistochemischen Färbungen wurde in Nieren von wildtypischen Mäusen (Kontrolle) eine zytoplasmatische Expression von β -Catenin in allen Zelltypen der Niere detektiert, wobei diese zumeist schwach war.

Auch in den WE2 Wnt1-positiven Nieren, die entweder Zysten aufwiesen oder nicht, konnte die zytoplasmatische Expression von β -Catenin in allen Zelltypen dargestellt werden. Der Nachweis des Proteins war aber vor allem in den WE2 Wnt1-positiven Nieren ohne Zystenbildung um ein vielfaches stärker, als im Vergleich zu wildtypischen Tieren (siehe Abb. 3.42). Zudem konnte speziell im Epithel einiger Zysten, die wohl aus den proximalen und distalen Tubuli entstanden waren, eine nukleäre Akkumulation von β -Catenin in den Nuklei beobachtet werden. Im Falle der veränderten Glomeruli war diese nicht nachweisbar.

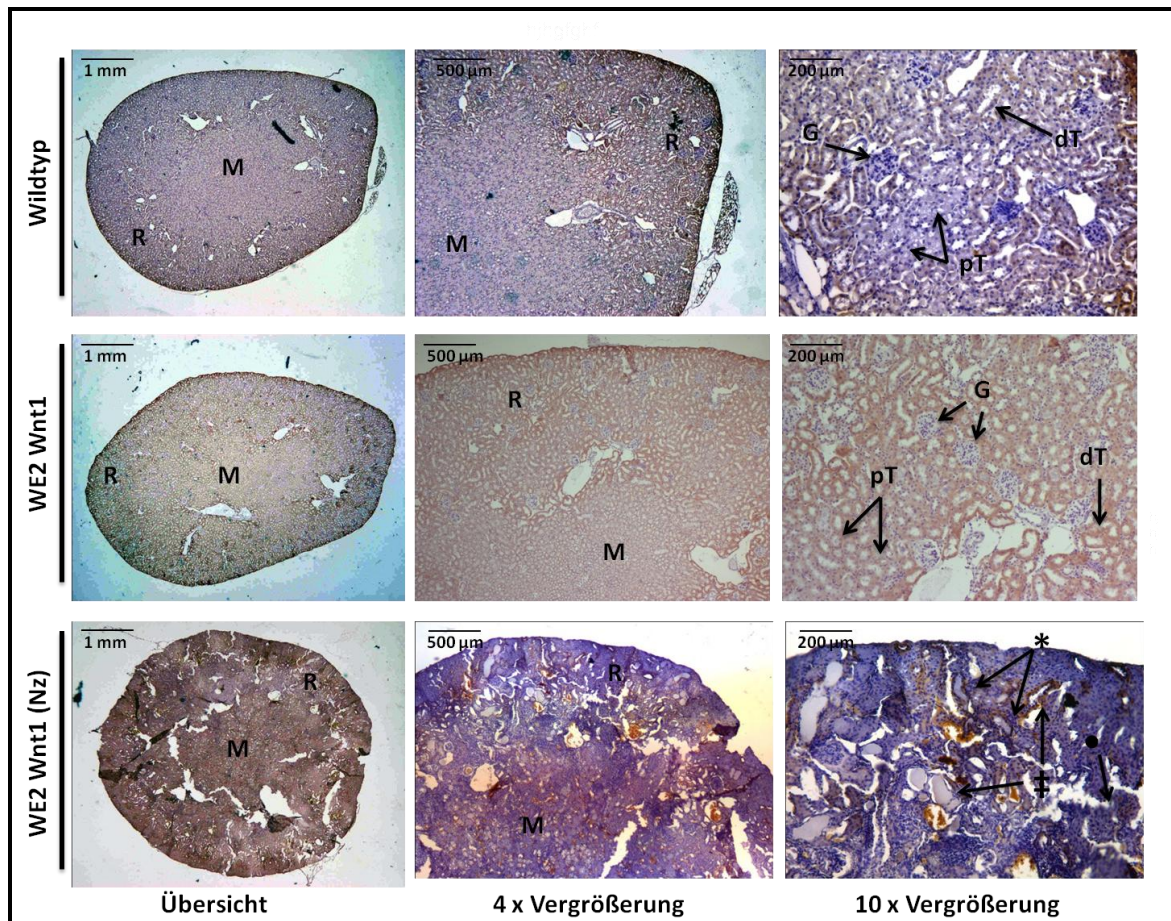


Abbildung 3.42: Nachweis von β -Catenin in polyzystischen Nieren von WE2 Wnt1-positiven Mäusen

In dieser Abbildung ist die Expression und Lokalisation von β -Catenin durch IHC-Färbung auf einem Nieren-Paraffinschnitt einer wildtypischen Maus und zweier WE2 Wnt1-positiven Mäuse mit und ohne Zystenbildung zu sehen. Dabei sind β -Catenin exprimierende Zellen an einer braunen Färbung zu erkennen. Die zytoplasmatische Expression des Proteins ist in der wildtypischen Niere in allen charakteristischen Zelltypen dieses Organs zytoplasmatisch detektierbar. Dies ist auch in den doppeltransgenen Nieren der Fall, wobei der Nachweis von β -Catenin in der WE2 Wnt1-positiven Niere ohne Zystenbildung deutlich stärker ist. Zudem weist die doppeltransgene Niere mit Zystenbildung eine nukleäre Akkumulation von β -Catenin im Epithel einiger Zysten auf. Diese kann in veränderten Glomeruli der zystischen Nieren nicht beobachtet werden. **Symbole und Abkürzungen:** (dT): distaler Tubulus; (G): Glomerulus; (M): Nierenmark; (pT): proximaler Tubulus; (R): Nierenrinde; (‡): Zyste/Urprung: distaler Tubulus; (*): Zyste/Urprung: proximaler Tubulus; (●): Glomerulus mit veränderter Morphologie und Flüssigkeitsansammlung.

In Hoden von wildtypischen Mäusen wurde eine zytoplasmatische Expression von β -Catenin nach immunhistochemischen Färbungen insbesondere im Epithel der Hodenkanälchen (Sertoli-Zellen und Spermatogonien), sowie den Spermatozyten rund um das Lumen der Kanälchen detektiert. Zudem war das Protein auch in einzelnen Sertoli-Zellen nukleär nachweisbar (siehe Abb. 3.43).

Veränderte Hoden von WE2 Wnt1-positiven Mäusen unterschieden sich nicht nur in ihrer Struktur, sondern auch in der β -Catenin-Expression bzw. -Lokalisation erheblich von Hoden wildtypischer Mäuse. So konnte in allen Sertoli-Zellen und Spermatogonien, die nun nicht nur am äußeren Rand der Hodenkanälchen zu finden waren, ein verstärkter zytoplasmatischer β -

Catenin-Nachweis erbracht werden. Zudem war das Protein nun in fast allen Sertoli-Zellen nukleär detektierbar. Des Weiteren konnte in den Leydig-Zellen des vergrößerten Interstitiums eine zytoplasmatische und in einzelnen dieser Zellen sogar eine nukleäre Akkumulation von β -Catenin nachgewiesen werden.

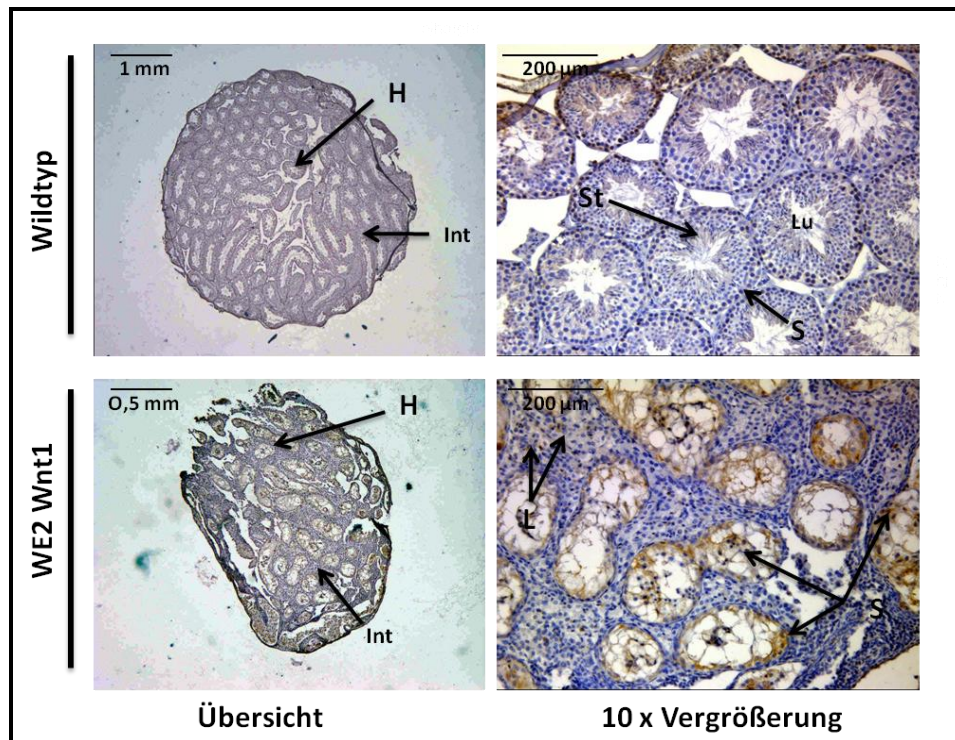


Abbildung 3.43: Nachweis von β -Catenin in veränderten Hoden von WE2 Wnt1-positiven Mäusen

In dieser Abbildung ist die Expression und Lokalisation von β -Catenin durch IHC-Färbung auf Paraffinschnitten eines wildtypischen und eines veränderten WE2 Wnt1-positiven Hodens dargestellt. Dabei sind β -Catenin exprimierende Zellen an einer braunen Färbung zu erkennen. Während das Protein im wildtypischen Hoden nur in einzelnen Sertoli-Zellen nukleär nachweisbar ist, kann dies in veränderten, doppeltransgenen Hoden in fast alle Sertoli-Zellen beobachtet werden. Zudem weisen in diesen Hoden auch einige Leydig-Zellen eine nukleäre Akkumulation von β -Catenin auf. **Abkürzungen:** (H): Hodenkanälchen; (Int): Interstitium; (L): Leydig-Zellen; (Lu): Lumen; (S): Spermatogonien; (St): Spermatiden,.

In den Ovarien von wildtypischen Mäusen (Kontrollen) konnte eine zytoplasmatische Expression von β -Catenin in allen Zelltypen des Organs nachgewiesen werden. Die stärkste Expression des Proteins wurde dabei im ovariellen Epithelium, den stromalen Zellen und in den Granulosa-Zellen der verschiedenen Entwicklungsstufen der Oozyten detektiert. Im Falle der Granulosa-Zellen war die stärkste Expression von β -Catenin in der Nähe des Antrums und in Cumulus-Zellen zu finden.

Auch in den zystischen Ovarien von WE2 Wnt1-positiven Mäusen konnte die zytoplasmatische Expression von β -Catenin in allen ovariellen Zelltypen detektiert werden. Der Nachweis des Proteins war aber wesentlich stärker als in den Ovarien der Wildtypen. Zudem wurde eine starke nukleäre Akkumulation von β -Catenin in den mehrschichtig angelegten Granulosa-Zellen um die

mit klarer, rötlicher Flüssigkeit gefüllten Zysten nachgewiesen (siehe Abb. 3.44). Auch in den Ansammlungen von unstrukturierten pleomorphen Granulosa-Zellen, die als Ausgangspunkt der Tumorgenese von Granulosazelltumoren gelten, war ein starker nukleärer Nachweis von β -Catenin nach den immunhistochemischen Färbungen zu beobachten.

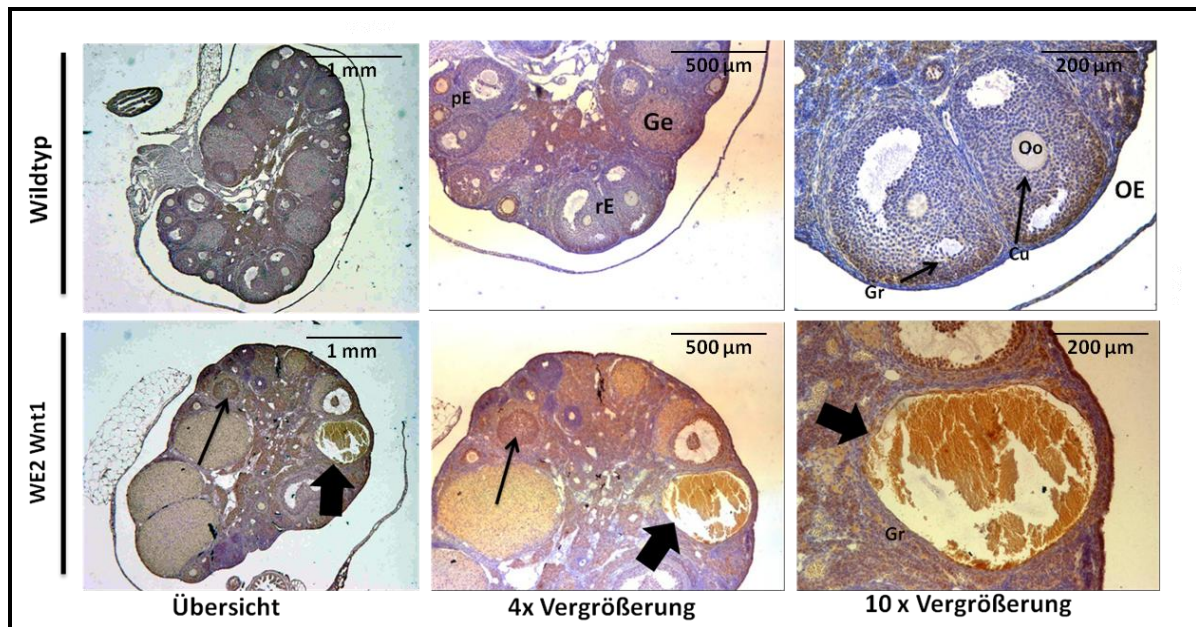


Abbildung 3.44: Nachweis von β -Catenin in veränderten Ovarien von WE2 Wnt1-positiven Mäusen

In dieser Abbildung ist die Expression und Lokalisation von β -Catenin durch IHC-Färbung auf Paraffinschnitten eines wildtypischen und eines veränderten WE2 Wnt1-positiven Maus Ovars dargestellt. Dabei sind β -Catenin exprimierende Zellen anhand einer braunen Färbung zu erkennen. Im Ovar der wildtypischen Maus ist eine zytoplasmatische Expression des Proteins in allen Zelltypen des Organs nachweisbar. Dies ist auch im veränderten Ovar der Fall, wobei in diesem zudem eine nukleäre Akkumulation von β -Catenin in den Ansammlungen von strukturell unorganisierten pleomorphen Granulosa-Zellen und den mehrlagigen Granulosazellschichten einer Zyste zu beobachten ist. **Abkürzungen und Symbole:** (Cu): Cumulus-Zellen; (Ge): Gelbkörper; (Gr): Granulosazellen; (OE): Ovariales Epithel; (Oo): Oozyte; (pE): primäre Eizelle; (rE): reife Eizelle; (dicker, schwarzer Pfeil): Zyste; (dünner, schwarzer Pfeil): Ansammlung von strukturell unorganisierten pleomorphen Granulosa-Zellen.

Durch die Ergebnisse der HE-Färbungen der veränderten Organe von WE2 Wnt1-positiven Mäusen konnte davon ausgegangen werden, dass es sich bei den Veränderungen der Nieren um eine polyzystische Erkrankung dieses Organs handelt (Saadi-Kheddouci *et. al.*, 2001). Im Fall der Ovarien ist der Beginn der Tumorgenese eines Granulosazelltumors zu beobachten (Boerboom *et. al.*, 2005). Die Veränderungen dieser Organe ähnelten somit denen der WE2 TC bCat Δ Ex3- bzw. WE2 LC bCat Δ Ex3-Modelle, wobei sie im Falle der Ovarien im WE2 Wnt1-Modell nach sechs Monaten ohne Doxycyclingabe noch nicht so weit fortgeschritten waren. Dagegen beschränkte sich die Veränderung der Hoden auf das WE2 Wnt1-Modell, wobei die Art der Erkrankung unklar ist.

Zudem bewies der immunhistochemische Nachweis von nukleär akkumuliertem β -Catenin in den veränderten Strukturen der phänotypisch auffälligen Organe, dass die Fehlregulation der

kanonischen Wnt-Signalkaskade an der Entstehung der Veränderungen der Organe beteiligt ist und dass das WE2 Wnt1-Modell induziert werden kann. Ein weiterer Beweis dafür wäre der Nachweis einer Überexpression bzw. Stabilisierung von Wnt1, β -Catenin und dessen Zielgenen in den veränderten WE2 Wnt1-positiven Organen.

3.2.3.4.2 Molekulare Analyse von veränderten, WE2 Wnt1-positiven Organen

Durch die molekularen Untersuchungen der veränderten Organe von WE2 Wnt1-positiven Mäusen sollten die Ergebnisse der immunhistochemischen Analysen bestätigt werden. Dies ist dann der Fall, wenn durch *Western blot*-Analysen eine Überexpression von Wnt1 in den veränderten Organen nachgewiesen werden kann. Zudem sollte eine damit bedingte Aktivierung der kanonischen Wnt-Signalkaskade zur Stabilisierung von β -Catenin und zur Überexpression seiner Zielgenen Cyclin D1 und c-myc führen (Clevers, 2006). Dies wäre eine Erklärung für die Veränderung der Organe (siehe Einleitung 1.4.2).

Für die molekularen Analysen von phänotypisch auffälligen WE2 Wnt1-positiven Mäusen wurden die Wnt1-exprimierenden Nieren, Hoden, Ovarien und der Uterus entnommen und aus ihnen Proteine isoliert. Als Kontrollen dienten Proteine aus denselben Organen von wildtypischen Mäusen. Anschließend sollte in diesen Proben die Expression bzw. Stabilisierung von Wnt1, β -Catenin und dessen Zielgenen Cyclin D1 und c-myc mit Hilfe von *Western blot*-Analyse untersucht werden.

Durch die *Western blot*-Analysen konnte die Expression von Wnt1 in den Organen von wildtypischen und WE2 Wnt1-positiven Mäusen nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Mehrere spezifische Antikörper von verschiedenen Firmen, die gegen Wnt1 gerichtet sind, zeigten keine spezifische Wnt1-Bande, wodurch eine Aussage zur Expression von Wnt1 nicht möglich war. Doch ein Nachweis von β -Catenin, Cyclin D1 und c-myc war möglich.

So konnte β -Catenin in den veränderten Nieren und Hoden von WE2 Wnt1-positiven Männchen stärker nachgewiesen werden, als in den Organen der Kontrollgruppe. Dies ließ auf eine Stabilisierung des Proteins in den doppeltransgenen Tieren schließen, die man auch in den Nieren, Ovarien und den Uteri von WE2 Wnt1-positiven Weibchen beobachtete (siehe Abb. 3.45). Zudem schien dadurch in fast allen untersuchten Organen eine Überexpression der β -Catenin-Zielgene Cyclin D1 und c-myc induziert zu werden. So war in den veränderten Nieren von doppeltransgenen Männchen und den entnommenen Organen von phänotypisch auffälligen WE2 Wnt1-positiven Weibchen die Expression der β -Catenin-Zielgene wesentlich höher, als in den Organen der Kontrollgruppe (siehe Abb. 3.45). Lediglich in den veränderten Hoden von

WE2 Wnt1-positiven führte die Stabilisierung von β -Catenin nicht zur verstärkten Expression von Cyclin D1 und c-myc.

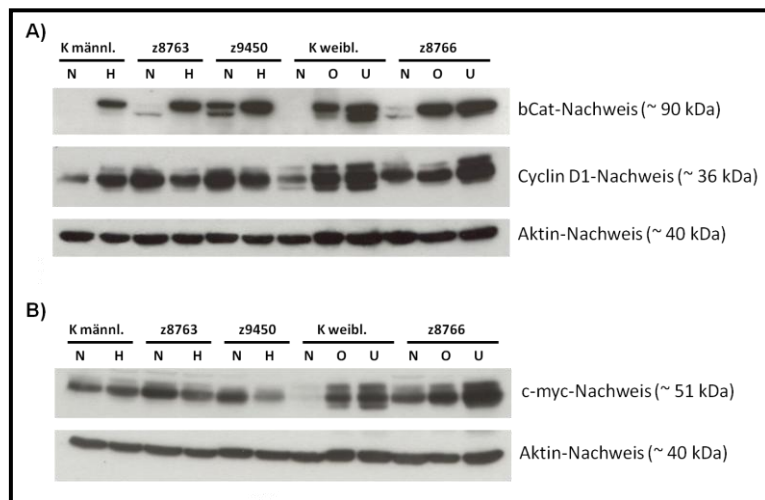


Abbildung 3.45: Stabilisierung von β -Catenin und Überexpression seiner Zielgenen in Organen von WE2 Wnt1-positiven Mäusen

Proteine aus Nieren (N) und Hoden (H) von wildtypischen und phänotypisch auffälligen WE2 Wnt1-positiven Männchen wurden isoliert. Dies führte man auch mit den Nieren (N), Ovarien (O) und den Uteri (U) von wildtypischen und WE2 Wnt1-positiven Weibchen durch. Nachfolgend wurde in diesen Proben die Stabilisierung bzw. Expression von β -Catenin (bCat), Cyclin D1 (beide in **A**) und c-myc (**B**) durch *Western blot*-Analysen untersucht. Zur Kontrolle der

analysierten Gesamtproteinmenge analysierte man die Expression des Haushaltsgens Aktin. Die Expression von Aktin war in allen Nieren gleich (Angabe des Molekulargewichts der jeweiligen Proteine in Klammern).

Durch die Ergebnisse der molekularen Analysen von WE2 Wnt1-positiven Mäusen wurden die immunhistochemischen Analysen bestätigt und es war davon auszugehen, dass es zu einer Aktivierung der kanonischen Wnt-Signalkaskade kommt. Somit ist die Induzierbarkeit des WE2 Wnt1-Modells bewiesen. Dies kann wiederum für die Veränderungen der Nieren, Hoden und Ovarien in WE2 Wnt1-positiven Mäusen verantwortlich sein (siehe Einleitung 1.4.2).

Zusammenfassend konnte nach den Analysen des WE2 Wnt1-Modells festgehalten werden, dass eine Fehlregulation der kanonischen Wnt-Signalkaskade zu einem frühen Zeitpunkt der Schwangerschaft wohl nicht mit dem embryonalen Überleben vereinbar ist. Dies ist anhand der zuerst durchgeführten *timed matings* erkennbar, bei denen keine Nachkommen mit dem Genotyp WE2 Wnt1 geboren wurden. Widersprüchlich dazu waren die Ergebnisse der zusätzlich durchgeführten *timed matings*. Ob das WE2 Wnt1-Modell wirklich induzierbar ist und der beobachtete Effekt bei den zuerst durchgeführten *timed matings* auf eine Überexpression von Wnt1 zurückzuführen war, sollte daher mit Hilfe von WE2 Wnt1-positiven Tieren untersucht werden, denen man Doxycyclin erst nach dem Absetzen von den Eltern entzogen hatte.

Bei diesen Analysen traten in WE2 Wnt1-positiven Mäusen Veränderungen der Nieren, Ovarien und Hoden auf. Dabei handelt es sich wohl im Falle der Nieren um eine polyzystische Nierenerkrankung. Bei den veränderten Ovarien kann der Beginn der Tumorgenese eines Granulosazelltumors beobachtet werden. Somit ähnelten diese Veränderungen der Organe, denen die in WE2 TC bCat Δ Ex3- und WE2 LC bCat Δ Ex3-positiven Tieren festgestellt wurden. Nur die Veränderung der Hoden schien spezifisch in WE2 Wnt1-positiven Männchen aufzutreten.

Wie im WE2 TC bCat Δ Ex3- und WE2 LC bCat Δ Ex3-Modell konnte auch in phänotypisch auffälligen WE2 Wnt1-positiven Mäusen durch immunhistochemische und *Western blot*-Analysen bewiesen werden, dass eine Aktivierung der kanonischen Wnt-Signalkaskade an der Veränderung der Organe beteiligt ist. Zudem belegte dies, dass das WE2 Wnt1-Modell induzierbar ist.

Somit scheint ein aktives WE2 Wnt1-Modell die Entstehung von polyzystischen Nieren, Granulosazelltumoren und veränderten Hoden zu begünstigen, doch die Entstehung eines Wilms-Tumors kann nicht induziert werden.

3.3 Analyse Wt1-tTA exprimierender Zellen der Aorta-Gonaden-Mesonephros (AGM)-Region

Bei der Charakterisierung der WE2-Effektor-Mauslinie war aufgefallen, dass in der AGM-Region eine Wt1 bzw. Wt1-tTA Expression (Tag 11,5 und 12,5 *d.p.c.*) im Endothel und dem darunterliegenden Mesenchym des mittleren und ventralen Teils der dorsalen Aorta nachgewiesen werden kann (siehe Abb. 3.7 bzw. 3.9).

In den letzten Jahren haben mehrere Forschergruppen gezeigt, dass gerade das Endothel des mittleren und ventralen Teils der dorsalen Aorta zwischen Tag 9,5 und 14,5 *d.p.c.* als Entstehungsort für hämatopoetische Stammzellen gilt und diese von dort in das Lumen der dorsalen Aorta freigesetzt werden (Boisset *et. al.*, 2010; Yokomizo und Dzierzak, 2010; Rybtsov *et. al.*, 2011). Zwar ist bekannt, dass Wt1 in hämatopoetischen Vorläuferzellen exprimiert wird (siehe Einleitung 1.3.3), doch ist bisher unklar, ob dieses Gen auch an der Entstehung von hämatopoetischen Stammzellen beteiligt ist.

Daher sollte durch Transplantationsversuche, hämatopoetische Stammzellassays, Immunfluoreszenz-Färbungen und Durchflusszytometrie-Versuche geklärt werden, ob Wt1 bei der Entstehung von hämatopoetischen Stammzellen eine Rolle spielt. Anhand der Immunfluoreszenz- und Durchflusszytometrie-Versuche sollten die Wt1-exprimierenden Zellen der AGM-Region genauer charakterisiert werden, um deren Rolle bei der Entstehung von hämatopoetischen Stammzellen zu klären. Zudem wurden durch die Transplantationsversuche und die Stammzellassays die hämatopoetischen Stammzell-Eigenschaften von embryonalen Wt1-exprimierenden Zellen analysiert und untersucht, ob diese Zellen helfen, das zerstörte Blutsystem von radioaktiv bestrahlten Mäusen wieder aufzubauen.

3.3.1 Immunfluoreszenz-Analysen Wt1-exprimierender Zellen der AGM-Region in WE2 EZ-positiven und-negativen Embryonen

Um die Wt1-positiven Zellen der dorsalen Aorta näher zu charakterisieren, wurden Immunfluoreszenz-Färbungen durchgeführt, bei denen man die Koexpression von Wt1 mit verschiedenen Markern analysierte, die für die Entstehung von hämatopoetischen Stammzellen aus der AGM-Region von Bedeutung sind.

Bei diesen Markern handelte es sich zum einen um CD31 (*platelet-endothelial cell adhesion molecule 1*), CD144 (*VE-Cadherin*) und CD309 (*tyrosine kinase growth factor receptor*), die alle von embryonalen, endothelialen Zellen exprimiert werden (Drake und Fleming, 2002) und bei der Entstehung und Freisetzung von hämatopoetischen Stammzellen aus dem Endothel ins Lumen der dorsalen Aorta eine Rolle spielen (Shalaby *et. al.*, 1997; Garcia-Porrero *et. al.*, 1998; Medvinsky *et. al.*, 2011). Des Weiteren wurde die Koexpression von Wt1 mit *c-kit* (*kit oncogene*), Runx1 (*runt-related transcription factor 1*) und CD49d (*integrin alpha-4*) untersucht. Während *c-kit* auf allen hämatopoetischen Stammzellen exprimiert wird (Sanchez *et. al.*, 1996) und Runx1 ausschlaggebend für die Entwicklung der hämatopoetischen Stammzellen aus dem Endothel der dorsalen Aorta ist (North *et. al.*, 2002), hat CD49d eine Bedeutung beim Erhalt und der Differenzierung dieser Zellen (Papayannpoulou *et. al.*, 1995; Arroyo *et. al.*, 1999). Abschließend sollte die gemeinsame Expression von Wt1, CD41 (*integrin alpha-2B*) und CD45 (*Leukocyte-common antigen*) analysiert werden. CD41 und CD45 sind für die Entstehung von prä-hämatopoetischen Stammzellen des Typs I und II wichtig, die sich aus dem Endothel der dorsalen Aorta bilden (Übersicht: Rybtsov *et. al.*, 2011). Für alle Immunfluoreszenz-Versuche wurden Embryonen (Tag 11,5 *d.p.c.*) des WE2 EZ-Modell verwendet (siehe Abb 3.3), in denen alle aktuell Wt1-positiven Zellen EGFP exprimieren.

Bei den Koexpressions-Analysen der Endothelzellmarker CD31, CD144 und CD309 (rot/TRITC) mit EGFP (grün/FITC) war bei allen drei Analysen ein ähnliches Expressionsmuster in WE2 EZ-positiven Embryonen zu beobachten (siehe Abb. 3.46). Eine Koexpression des jeweiligen Endothelzellmarkers und EGFP fand vor allem in den Endothelzellen des mittleren und ventralen Teils der dorsalen Aorta statt. Die alleinige Expression von CD31, CD144 und CD309 konnte in den Endothelzellen des dorsalen Teils der dorsalen Aorta nachgewiesen werden, während Zellen der entstehenden Niere und des Mesenchyms unterhalb der dorsalen Aorta nur EGFP-positiv waren. Generell war der deutlichste Nachweis dieses Expressionsmusters bei der Kofärbung von EGFP und CD144 zu erkennen.

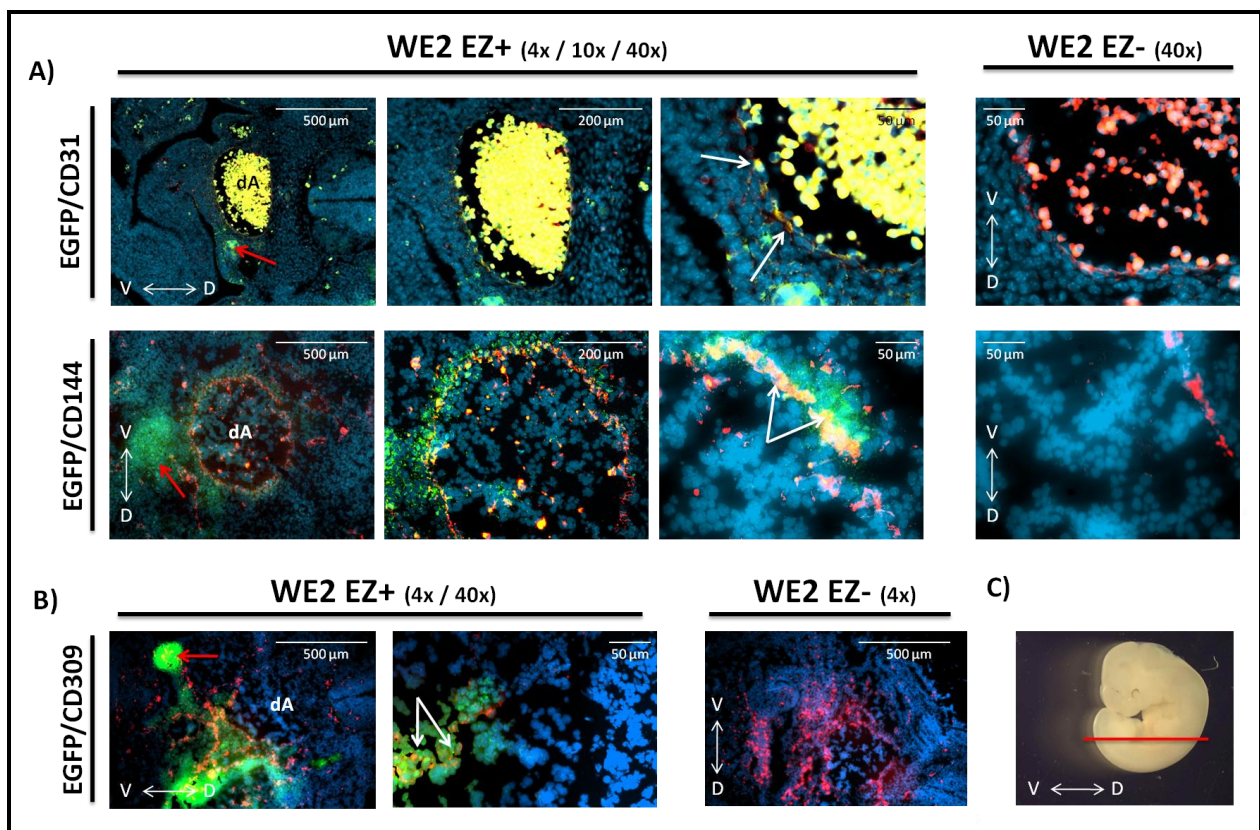


Abbildung 3.46: Koexpression von EGFP, CD31, CD144 und CD309 im hämatopoetischen Endothel von WE2 EZ-positiven Embryonen (Tag 11,5 d.p.c.)

In dieser Abbildung sind die Immunfluoreszenz-Nachweise von EGFP/CD31, EGFP/CD144 (beide in A) und EGFP/CD309 (B) auf Paraffin- bzw. Kryoschnitten von WE2 EZ-positiven und -negativen Embryonen (Tag 11,5 d.p.c.) dargestellt. Dabei wird eine EGFP-Expression durch den Fluoreszenzfarbstoff FITC (grün) und eine CD31-, CD144- und CD309-Expression durch TRITC (rot) nachgewiesen. Eine Koexpression erscheint durch die Überlagerung der beiden Farbstoffe gelb bis orange. Zudem ist in den Teilabbildungen eine bessere Orientierung durch Angaben zum ventralen und dorsalen Bereich des Embryos und die DAPI-Blaufärbung der Zellkerne möglich. Abschnitt C) zeigt einen wildtypischen Embryo (Tag 11,5 d.p.c.). Durch einen roten Balken ist der Bereich gekennzeichnet, von dem die Schnitte für die Immunfluoreszenz-Versuche hergestellt worden sind. **Abkürzungen und Symbole:** (D): Dorsal; (dA): dorsale Aorta; (V): Ventral; (roter Pfeil): EGFP-Expression in der entstehenden Niere; (weißer Pfeil): Koexpression von EGFP/CD31, EGFP/CD144 und EGFP/CD309 im Endothel des mittleren und ventralen Bereichs der dorsalen Aorta.

Auch die Expressionsmuster von c-kit/EGFP und Runx1/EGFP in WE2 EZ-positiven Embryonen ähnelten sich, wobei c-kit und Runx1 durch den Fluoreszenzfarbstoff TRITC (rot) und EGFP durch FITC (grün) nachgewiesen wurden. Bei beiden Immunfluoreszenz-Färbungen konnte eine gemeinsame Expression in den Endothelzellen der dorsalen Aorta beobachtet werden (siehe Abb. 3.47). Während diese bei dem Nachweis von Runx1 und EGFP im Endothel der gesamten dorsalen Aorta zu beobachten war, beschränkte sie sich beim Nachweis von c-kit und EGFP auf den mittleren und ventralen Teil des Gefäßes. Zudem konnte eine Koexpression von c-kit/EGFP und Runx1/EGFP im Mesenchym beobachtet werden, welches unterhalb des Endothels der dorsalen Aorta liegt. Des Weiteren waren einzelne Zellen dieses Gewebes nur Runx1- bzw. EGFP-positiv und eine alleinige EGFP-Expression in den Zellen der entstehenden Niere nachweisbar.

Bei dem gemeinsamen Immunfluoreszenz-Nachweis von CD49d (grün/FITC) und EGFP (rot/Alexa594) war ebenfalls eine Koexpression der beiden Proteine im Endothel und dem darunterliegenden Mesenchym der dorsalen Aorta nachweisbar (siehe Abb. 3.47). Diese beschränkte sie sich auf den ventralen Teil des Gefäßes, während CD49d-positive Zellen um die gesamte dorsale Aorta zu beobachten waren.

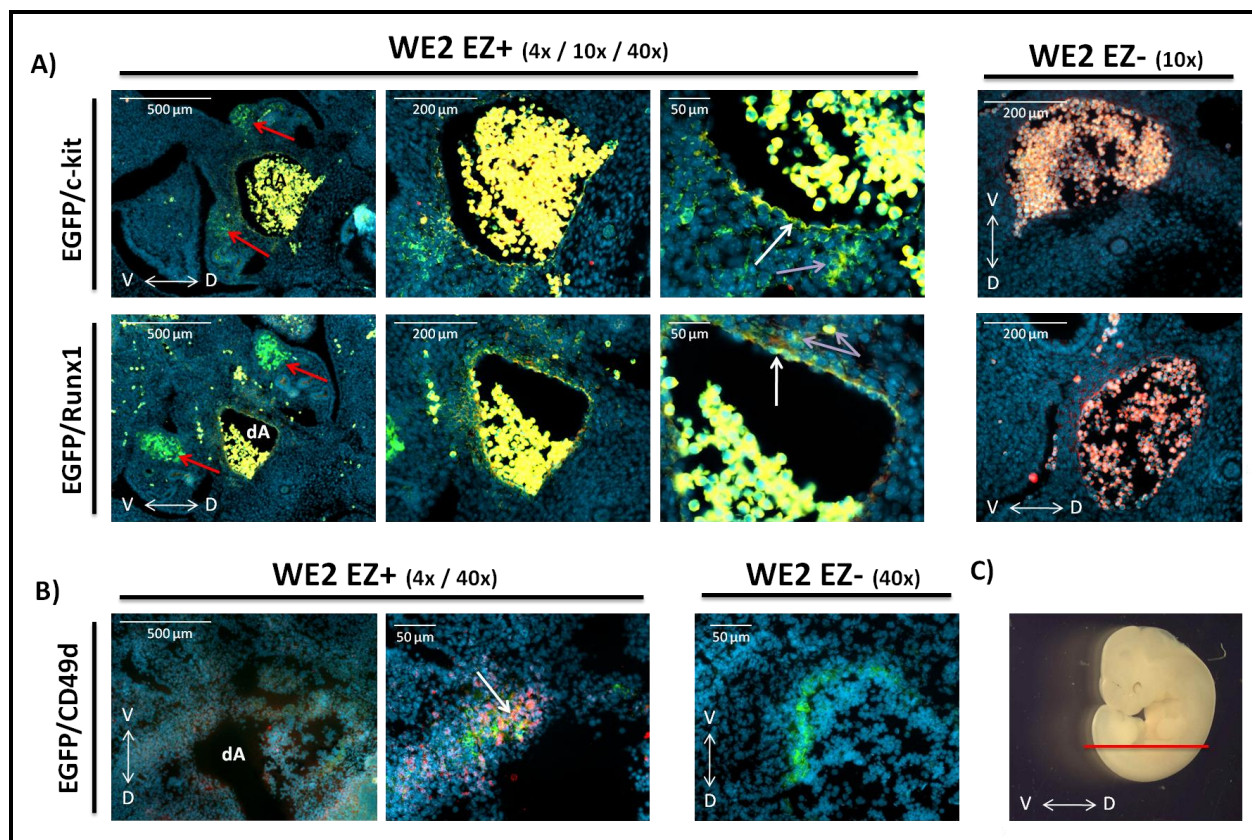


Abbildung 3.47: Koexpression von EGFP, c-kit, Runx1 und CD49d im hämatopoetischen Endothel von WE2 EZ-positiven Embryonen (Tag 11,5 d.p.c.)

In dieser Abbildung sind die Immunfluoreszenz-Nachweise von EGFP/c-kit, EGFP/Runx1 (beide in A) und EGFP/CD49d (B) auf Paraffin- bzw. Kryoschnitten von WE2 EZ-positiven und -negativen Embryonen (Tag 11,5 d.p.c.) dargestellt. Dabei wird eine EGFP-Expression durch den Fluoreszenzfarbstoff FITC (grün) und eine CD31-, CD144- und CD309-Expression durch TRITC (rot) nachgewiesen. Eine Koexpression erscheint durch die Überlagerung der beiden Farbstoffe gelb bis orange. Zudem ist in den Teilabbildung eine bessere Orientierung durch Angaben zum ventralen und dorsalen Bereich des Embryos und die DAPI-Blaufärbung der Zellkerne möglich. Abschnitt C) zeigt einen wildtypischen Embryo (Tag 11,5 d.p.c.). Durch einen roten Balken ist der Bereich gekennzeichnet, von dem die Schnitte für die Immunfluoreszenz-Versuche hergestellt worden sind. **Abkürzungen und Symbole:** (D): Dorsal; (dA): dorsale Aorta; (V): Ventral; (roter Pfeil): EGFP-Expression in der entstehenden Niere; (violetter Pfeil): Koexpression von EGFP/c-kit und EGFP/Runx1 im Mesenchym unterhalb des Endothels der dorsalen Aorta; (weißer Pfeil): Koexpression von EGFP/c-kit, EGFP/Runx1 und EGFP/CD49d im Endothel des mittleren und ventralen Bereichs der dorsalen Aorta.

Bei den Koexpressionsanalysen von Wt1 (grün/FITC), CD41 (rot/TRITC) und CD45 (violett/Cy5) konnte in WE2 EZ-positiven Embryonen eine Koexpression der drei Proteine in Zellen der Leber und in Blutzellen innerhalb der dorsalen Aorta nachgewiesen werden. Zudem wurden sie alle während der Freisetzung einer hämatopoetischen Stammzelle vom Endothel der

dorsalen Aorta ins Lumen des Gefäßes exprimiert (siehe Abb. 3.48). Die Expression von Wt1 und CD45 war dabei hauptsächlich auf das Endothel der dorsalen Aorta beschränkt und die CD41-Expression zu einem großen Anteil in der entstehenden hämatopoetischen Stammzelle zu finden. Dagegen konnte im Endothel und dem darunterliegenden Mesenchym der dorsalen Aorta nur die Expression von Wt1 und CD45 nachgewiesen werden. Dabei wurden beide vor allem im mittleren Teil des Endothels der dorsalen Aorta exprimiert. Zudem war die Wt1-Expression in diesem Bereich wesentlich stärker, als die von CD45. Des Weiteren war eine verstärkte CD41-Expression in Blutzellen im Lumen der dorsalen Aorta und in den Zellen der Leber nachweisbar, sowie eine alleinige Wt1-Expression in der entstehenden Niere zu beobachten.

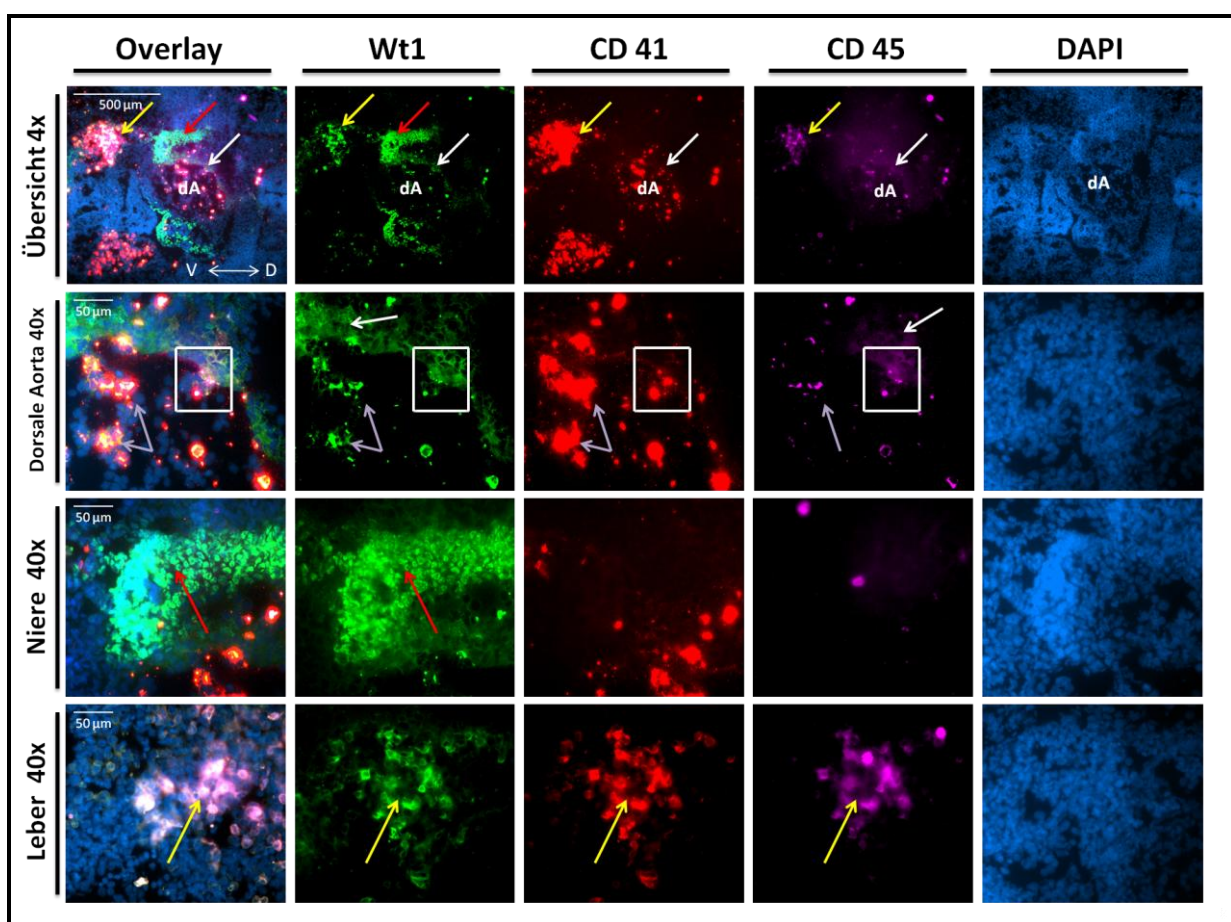


Abbildung 3.48: Wt1 ist direkt an der Entstehung von hämatopoetischen Stammzellen beteiligt

In dieser Abbildung ist der Immunfluoreszenz-Nachweis von Wt1 (FITC/grün), CD41 (TRITC/rot) und CD45 (Cy5/violett) auf einem Kryoschnitt eines WE2 EZ-positiven Embryos (Tag 11,5 *d.p.c.*) dargestellt. Neben der Überlagerung aller Expressionsnachweise (overlay) sind auch die einzelnen Expressionsdomänen von Wt1, CD41 und CD45 in einer 4-fachen und 40-fachen Vergrößerung abgebildet. Die Bilder der 40-fachen Vergrößerung stellen dabei Bereiche von besonderem Interesse dar. Zudem ist eine bessere Orientierung durch die Angabe des ventralen und dorsalen Bereichs des Embryos möglich (4-fache Vergrößerung; overlay). **Abkürzungen und Symbole:** (D): Dorsal; (dA): dorsale Aorta; (V): Ventral; (gelber Pfeil): Koexpression von Wt1, CD41 und CD45 in der embryonalen Leber; (roter Pfeil): Wt1-Expression in der entstehenden Niere; (violetter Pfeil): Koexpression von Wt1, CD41 und CD45 in Blutzellen innerhalb des Lumens der dorsalen Aorta; (weißer Pfeil): Koexpression von Wt1 und CD45 im Endothel des mittleren Bereichs der dorsalen Aorta und dem darunterliegenden Mesenchym; (weißes Kästchen): Expression von Wt1, CD41 und CD45 während der Entstehung einer hämatopoetischen Stammzelle.

Zusammenfassend konnte nach den Immunfluoreszenz-Analysen festgehalten werden, dass im Endothel des mittleren und ventralen Bereichs der dorsalen Aorta eine Koexpression von Wt1 mit allen untersuchten Markern stattfindet, die für die Entstehung von hämatopoetischen Stammzellen von Bedeutung sind. Wt1 scheint dabei direkt an der Freisetzung von prä-hämatopoetischen Stammzellen des Typs I (CD144⁺ CD41⁺ CD45⁻) und II (CD144⁺ CD41⁺ CD45⁺) beteiligt zu sein. Des Weiteren spricht der Nachweis von Wt1/CD41/CD45-positiven Zellen im Lumen der dorsalen Aorta und in der Leber dafür, dass diese Zellen, ausgehend von der AGM-Region, dieses blutbildende Organ besiedeln und Wt1 somit eine Rolle in der frühen Hämatopoese spielt. Durch anschließende Durchflusszytometrie-Analysen sollten die Ergebnisse der Immunfluoreszenz-Versuche bestätigt werden. Zudem sollte analysiert werden, in welcher Population von prä-hämatopoetischen Stammzellen Wt1 exprimiert wird.

3.3.2 Charakterisierung der Wt1-tTA positiven Zellen mittels Durchflusszytometrie-Analysen

Auch bei den Durchflusszytometrie-Versuchen wurde in Embryonen (Tag 11,5 *d.p.c.*) die Koexpression von Wt1 mit verschiedenen Markern analysiert, die bei der Entstehung von hämatopoetischen Stammzellen aus der AGM-Region eine Rolle spielen. Bei diesen Markergenen handelte es sich um CD41, CD45, CD49d, CD144 und CD309, deren Rolle bei der hämatopoetischen Stammzellbildung schon in Kapitel 3.3.1 kurz beschrieben worden ist und mit deren Nachweisen die Population von embryonalen Zellen analysiert werden kann, die Wt1 an Tag 11,5 *d.p.c.* exprimieren. Für alle Durchflusszytometrie-Versuche wurde das WE2 EZ-Modell verwendet (siehe Abb. 3.3), in dem alle aktuell Wt1-positiven Zellen EGFP exprimieren.

Bei allen durchgeführten Durchflusszytometrie-Versuchen konnte eine größere Anzahl von EGFP-exprimierenden Zellen in WE2 EZ-positiven Embryonen, als in WE2 EZ-negativen Embryonen festgestellt werden (siehe Abb. 3.49). Während in Embryonen mit dem Genotyp WE2 EZ zwischen 0,4 und 1,2 % aller analysierten Zellen (30000 Zellen) EGFP-positiv waren, waren es bei WE2 EZ-negativen Embryonen lediglich zwischen 0,05 und 0,4 %. Dies sprach dafür, dass das WE2 EZ-Modell induziert werden kann und eine bei den Versuchen zu beobachtende Expressionen von EGFP in Wt1-exprimierenden Zellen von WE2 EZ-positiven Embryonen (Tag 11,5 *d.p.c.*) wirklich stattfand und nicht als unspezifische Färbung zu deuten war. Im Folgenden werden daher nur die Ergebnisse der Koexpressions-Analysen von WE2 EZ-positiven Embryonen dargestellt.

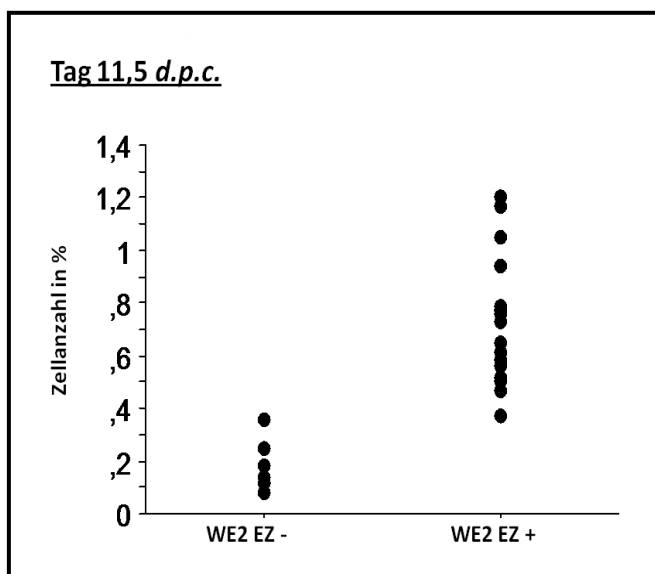


Abbildung 3.49: WE2 EZ-positive Embryonen besitzen eine größere Anzahl an EGFP-positiven Zellen als WE2 EZ-negative Embryonen (Tag 11,5 *d.p.c.*)

In dieser Abbildung ist die Anzahl an EGFP-exprimierenden Zellen in WE2 EZ-positiven und -negativen Embryonen (Tag 11,5 *d.p.c.*) graphisch dargestellt. Während auf der X-Achse die jeweilige Population von Mäusen zu erkennen ist, ist auf der Y-Achse die Anzahl der ausgewerteten Zellen (30000) in Prozent angegeben. Zudem repräsentiert jeder Punkt einen analysierten Embryo, in dem die EGFP-Expression mittels Durchflusszytometrie ermittelt worden ist (WE2 EZ+ = 20 Embryonen; WE2 EZ- = 6 Embryonen). In WE2 EZ-positiven Mäusen sind wesentlich mehr Zellen EGFP-positiv (zwischen 0,4 % und 1,2 %) als in WE2 EZ-negativen Embryonen (zwischen 0,05 % und 0,4 %).

Bei der Analyse der Koexpression von EGFP und CD309 konnte festgestellt werden, dass 28,1 % aller EGFP-exprimierenden Zellen auch CD309-positiv waren. Generell wiesen diese Zellen aber eine schwache Fluoreszenzintensität der beiden Proteine auf (siehe Abb. 3.50).

Im Falle der Analyse der EGFP/CD49d-Koexpression waren 20,8 % aller EGFP-exprimierenden Zellen CD49d-positiv. Die Expression von beiden Proteinen konnte dabei in vielen dieser Zellen durch eine starke Fluoreszenzintensität nachgewiesen werden, die in einzelnen Zellen sogar sehr hoch war.

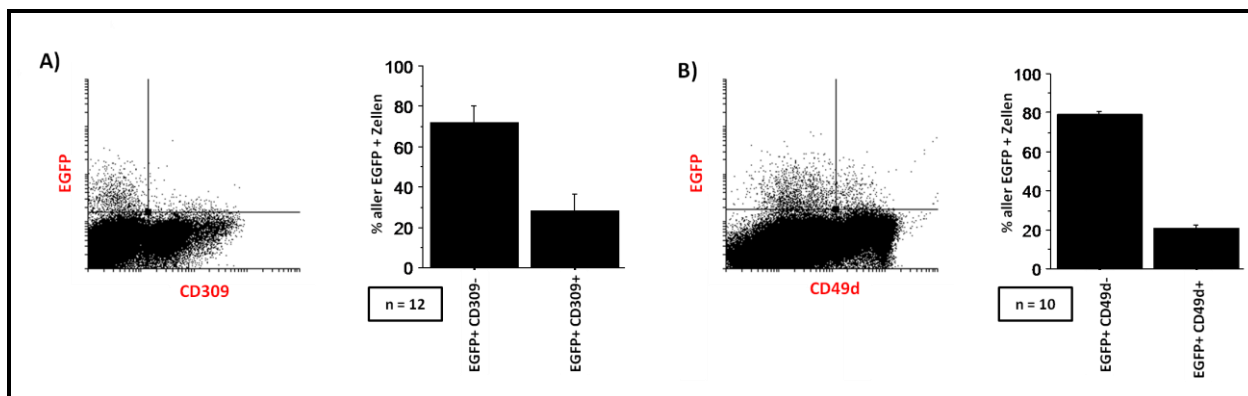


Abbildung 3.50: EGFP-exprimierende Zellen von WE2 EZ-positiven Embryonen (Tag 11,5 *d.p.c.*) weisen eine Koexpression mit CD49d und CD309 auf

Die Abbildung zeigt die Ergebnisse der Durchflusszytometrie-Versuche zur Untersuchung der Koexpression von EGFP/CD309 (A) und EGFP/CD49d (B) in WE2 EZ-positiven Embryonen (Tag 11,5 *d.p.c.*). Zu jeder Koexpressions-Analyse sind ein FACS-Blot und ein Balkendiagramm abgebildet. Während jeder FACS-Blot exemplarisch das Ergebnis eines analysierten Embryos zeigt, sind in den Balkendiagrammen die Ergebnisse aller analysierten Embryonen zusammengefasst. **Abkürzungen:** (n): Anzahl der analysierten Embryonen

Die gemeinsame Expression von EGFP/CD45 und EGFP/CD144 konnte bei 20,0 % bzw. 5,2 % aller EGFP-positiven Zellen nachgewiesen werden (siehe Abb 3.51). Während die Fluoreszenzintensität von CD45 und CD144 in diesen Zellen generell sehr schwach war, war die von EGFP in den CD144-positiven Zellen wesentlich stärker, als bei den CD45-positiven Zellen. Bei den Koexpressionsanalysen von EGFP und CD41 konnten drei Zellpopulationen identifiziert werden (siehe Abb. 3.51). So gab es EGFP-positive Zellen, bei denen ein CD41-Nachweis gar nicht, schwach ($CD41^{low}$) oder eindeutig möglich war ($CD41^{high}$). Wurden die schwach CD41-fluoreszierenden Zellen als CD41-negativ angesehen, so waren lediglich 1,93 % aller EGFP-exprimierenden Zellen auch CD41-positiv.

Bei den Durchflusszytometrie-Versuchen zum Nachweis der Koexpression von EGFP, CD41, CD45 und CD144 fiel auf, dass lediglich 0,13 % aller EGFP-positiven Zellen die Eigenschaften von prä-hämatopoetischen Stammzellen des Tys I besaßen ($CD144^+ CD41^+ CD45^-$) (siehe Abb. 3.51). Zudem exprimierten nur 0,6 % aller EGFP-positiven Zellen die Markergene von prä-hämatopoetische Stammzellen des Tys II ($CD144^+ CD41^+ CD45^+$). Eine etwas höhere Anzahl der EGFP-positiven Zellen war CD144-positiv, CD41-negativ und CD45-positiv (1,37 %), sowie CD144-negativ, CD41-positiv und CD45-negativ (3,1 %).

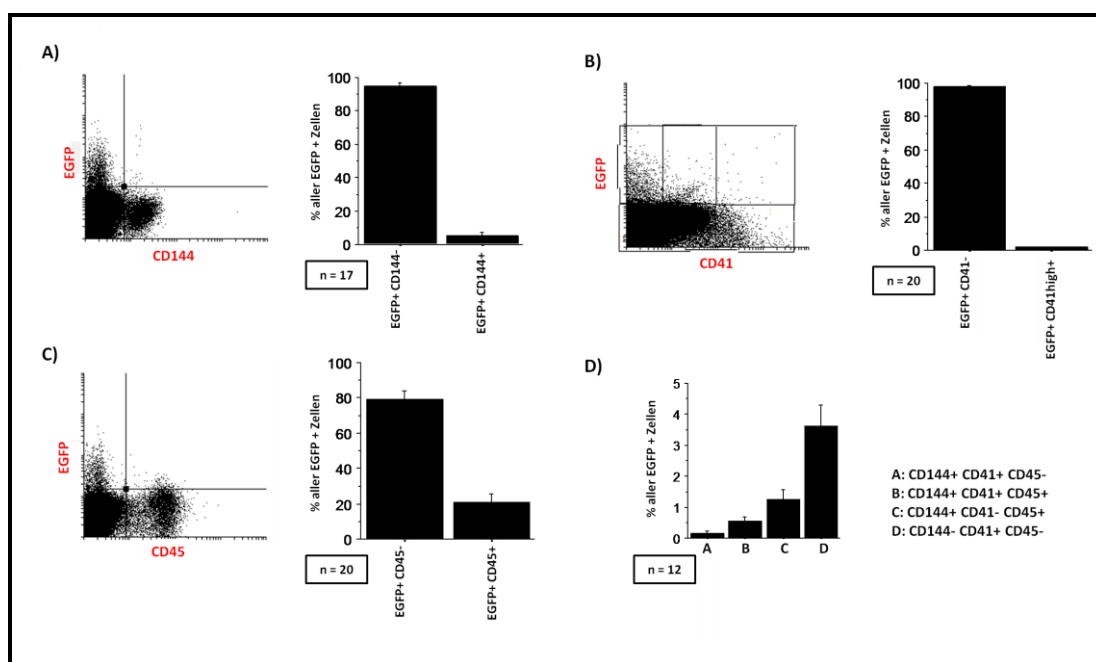


Abbildung 3.51: EGFP-exprimierende Zellen von WE2 EZ-positiven Embryonen (Tag 11,5 d.p.c.) weisen eine Koexpression mit CD41, CD45 und CD144 auf

Abbildung 3.51 zeigt neben den Koexpressions-Analysen von EGFP/CD144 (A), EGFP/CD41 (B) und EGFP/CD45 (C) auch die Ergebnisse der Untersuchung der gemeinsamen Expression von EGFP, CD41, CD45 und CD144 (D). Alle Analysen sind mit WE2 EZ-positiven Embryonen (Tag 11,5 d.p.c.) mittels Durchflusszytometrie-Versuche durchgeführt worden. Während in A), B) und C) jeweils ein FACS-Blot und ein Balkendiagramm dargestellt sind, ist in D) nur ein Balkendiagramm abgebildet. Dabei zeigt jeder FACS-Blot exemplarisch das Ergebnis eines Embryos, wohingegen in den Balkendiagrammen die Ergebnisse aller analysierten Embryonen zusammengefasst sind. **Abkürzungen:** (n): Anzahl der analysierten Embryonen

Die Durchflusszytometrie-Analysen von WE2 EZ-positiven Embryonen (Tag 11,5 *d.p.c.*) zeigten, dass generell wenige Zellen in diesem embryonalen Stadium Wt1 exprimieren. Die durchschnittlich 0,8 % an EGFP-positiven Zellen entsprachen dabei lediglich 240 Zellen der 30000 analysierten Zellen pro Versuch. In diesen EGFP-positiven Zellen konnte zwar mit allen hämatopoetischen Stammzellmarkern eine Koexpression festgestellt werden, doch sind aufgrund der Fluoreszenzintensitäten nur die EGFP⁺/CD49d⁻ sowie die EGFP⁺/CD41^{low}- und EGFP⁺/CD41^{high}-Zellen als echte Zellpopulation identifizierbar. Zudem konnte nicht nachgewiesen werden, dass Wt1 bzw. EGFP speziell in prä-hämatopoetischen Stammzellen des Typs I (CD144⁺ CD41⁺ CD45⁻) und II (CD144⁺ CD41⁺ CD45⁺) exprimiert wird, da nur 0,13 % bzw. 0,6 % der EGFP-positiven Zellen die Eigenschaften der prä-hämatopoetischen Stammzellen des Typs I und II besaßen. Somit unterstützten diese Ergebnisse nur bedingt die Beobachtungen der Immunfluoreszenz-Versuche.

3.3.3 Transplantation Wt1-tTA positiver Zellen in radioaktiv bestrahlte Mäuse

Um die hämatopoetischen Stammzell-Eigenschaften von embryonalen Wt1-exprimierenden Zellen in Transplantationsversuchen zu untersuchen, wurde das Mausmodell WE2 TC RG verwendet. Es ähnelt dem WE2 TC RR-Modell (siehe Abb. 3.4), so dass auch in diesem System durch die Integration des WE2-Transgens eine Wt1-analoge tTA-Expression gewährleistet wird. Ohne Doxycyclin kommt es zur Bindung des tTA an den tTA-regulierbaren Promotor des TC-Transgens, wodurch eine Cre-Rekombinase transkribiert wird (siehe Abb. 3.52). Nach anschließender Translation kann die Cre-Rekombinase die integrierten *loxP*-Sequenzen im RG-Transgen (siehe Material und Methoden 2.1.11) erkennen, so dass neben der Neomycin-Resistenz-Kassette auch die Exons 2 bis 7 des Gens irreversibel entfernt werden. Nachfolgend gelangt das *EGFP*-Gen unter die Kontrolle des konstitutiv exprimierten Tk-Promotors. Somit kommt es zur ständigen Expression von EGFP in Zellen, die Wt1 einmal exprimiert haben, wodurch sie in Transplantationsversuchen auch nach mehreren Wochen im Blut und Organen nachweisbar sind, wenn sie hämatopoetische Stammzell-Eigenschaften besitzen.

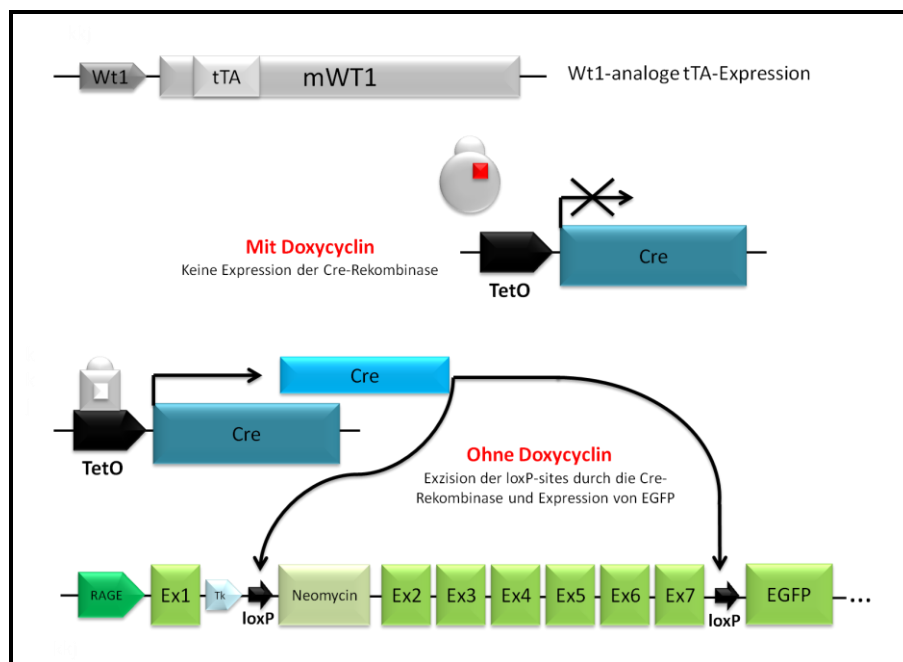


Abbildung 3.52: Schematische Darstellung des WE2 TC RG-Modells

Durch den im WE2-Transgen integrierten tetrazyklinabhängigen Transaktivator (tTA) kann durch Doxycyclin die Regulation nachgeschalteter Transgene des WE2 TC RG-Modells beeinflusst werden. So kommt es z.B. mit Doxycyclin zu einer Konformationsänderung des tTA, wodurch dieser nicht an den tTA-regulierbaren Promotor (TetO) des TC-Transgens (Cre) binden kann. Nachfolgend bleibt die Transkription des TC-Transgens aus und eine Cre-Rekombinase wird nicht exprimiert. Ohne Doxycyclin kann der tTA an den tTA-regulierbaren Promotor binden, so dass es zur Transkription und Translation des TC-Transgens bzw. der Cre-Rekombinase kommt. Dieses Enzym erkennt nun die in das RG-Responder-Transgen integrierten *loxP*-Sequenzen (*loxP*). Durch ihre Exzision kommt es zum Entfernen einer Neomycin-Kassette, sowie des Exons 2 bis 7 des Gens. Nachfolgend gelangt das *EGFP*-Gen unter die transkriptionelle Kontrolle des konstitutiv exprimierten *Tk*-Promotors. Es kommt zur Transkription und Translation dieses Gens, wodurch alle Zellen markiert werden, die einmal *Wt1*-tTA exprimiert haben.

Zur Untersuchung dieser Eigenschaft von *Wt1*- bzw. *EGFP*-exprimierenden Zellen wurde daher ein *timed mating* von WE2 TC RG-positiven Männchen und Weibchen ohne Doxycyclin durchgeführt. Nach anschließender Präparation (Tag 11,5 *d.p.c.*) und Zellsuspensionsherstellung der Embryonen bestand die Möglichkeit, dass durch eine Durchflusszytometrie eine *EGFP*-positive Zellpopulation gewonnen wird. Nach der Injektion einer jeweils unterschiedlichen Menge an *EGFP*-positiven Zellen (siehe unten), in den retrobulbären Venenplexus von radioaktiv bestrahlten Mäusen, sollte nach 16 Wochen Blut entnommen werden. Zudem sollten nach einem halben Jahr die blutbildenden Organe Leber und Milz, sowie der Thymus und die Lymphknoten präpariert werden, die bei der Differenzierung von Blutzellen eine wichtige Rolle spielen (siehe Material und Methoden 2.7.12). Nach der Isolierung der DNA aus den jeweiligen Geweben konnte durch eine *Wt1*-tTA-PCR der Nachweis erbracht werden, ob die injizierten *Wt1*-exprimierende Zellen (Tag 11,5 *d.p.c.*) hämatopoetischen Stammzellcharakter besitzen und helfen das zerstörte Blutsystem in den bestrahlten Tieren wieder aufzubauen.

Nach dem *timed mating*, der Präparation der Embryonen (Tag 11,5 *d.p.c.*) und der Herstellung der Zellsuspension konnte durch eine Durchflusszytometrie eine EGFP-positive Zellpopulation von 2,4 Millionen Zellen gewonnen werden (Daten nicht gezeigt). Von diesen Zellen wurden je 2500, 5000, 20000 und 40000 Zellen zusammen mit zwei Millionen adulten murinen Knochenmarkzellen in radioaktiv bestrahlte Mäuse injiziert. Die Tiere überlebten die ersten 16 Wochen nach der Transplantation, so dass ihnen Blut entnommen und daraus DNA isoliert wurde. Bei einer anschließenden PCR, in der man pro Probe 30 ng DNA eingesetzt, konnte im Blut von allen vier Mäusen, unabhängig von der Menge an injizierten EGFP-positiven Zellen, ein unterschiedlich starker Nachweis von Wt1-tTA erbracht werden (siehe Abb. 3.53). Bei dieser PCR ist durch das Einsetzen von drei Primern, von denen zwei im wildtypischen Locus von *Wt1* (WE2F und WE2R1) und einer im tTA binden (WE2R2), der Wt1-tTA-Nachweis durch zwei DNA-Banden nach einer Agarose-Gelelektrophorese möglich. Von diesen entspricht die größere Bande (500 bp) der Bindung der Primer im wildtypischen *Wt1*-Locus (WE2F und WE2R1) und die kleinere Bande (200 bp) der Bindung der Primer im wildtypischen Locus und dem tTA (WE2F und WE2R2).

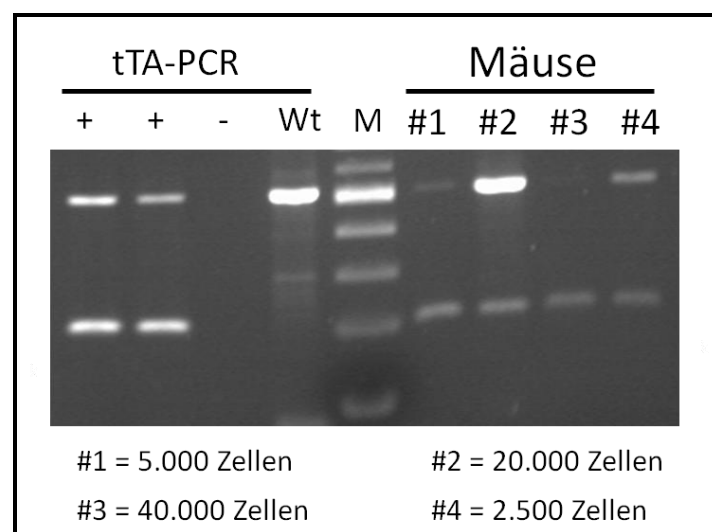


Abbildung 3.53: PCR-Nachweis von Wt1-tTA im Blut von injizierten Mäusen

Diese Abbildung zeigt den PCR-Nachweis von Wt1-tTA (tTA-PCR) im Blut von Mäusen, die mit embryonalen Wt1-exprimierenden Zellen des WE2 TC RG-Modells injiziert worden sind. Für die PCR sind 30 ng DNA pro Probe eingesetzt worden. Links vom 100 bp-Marker (M) sind die PCR-Proben von zwei Positivkontrollen (+), einer Negativ- und Wildtypprobe erkennbar (- bzw. Wt). Rechts vom Marker sind die PCR-Proben der Mäuse zu sehen, die jeweils mit einer unterschiedlichen Anzahl an Zellen injiziert worden sind. In allen Blutproben der injizierten Mäuse ist der Nachweis von Wt1-tTA möglich. Dies ist an den zwei DNA-Banden der Größe 250 und 500 bp erkennbar. Die beiden Banden kommen durch drei eingesetzte Primer zustande (WE2F, WE2R1 und WE2R2), die zum einen nur im wildtypischen *Wt1*-Locus (WE2F und WE2R1; 500 bp) und zum anderen im tTA und wildtypischen *Wt1*-Locus binden (WE2F und WE2R2; 200 bp).

Nach einem halben Jahr wurden die injizierten Mäuse getötet und die Milz, die Leber, der Thymus und die Lymphknoten entnommen und analysiert. Anschließend führte man nach der Isolierung der DNA aus den jeweiligen Organen wiederum eine Wt1-tTA-PCR durch. Diesmal wurden dafür pro Probe 50 ng DNA eingesetzt und nur zwei Primer verwendet, die beide ausschließlich im tTA binden (tTA for1 und tTA rev6). In allen entnommenen Organen der injizierten Tiere konnte der Nachweis von Wt1-tTA detektiert werden, was an der ca. 300 bp großen Bande nach einer Agarose-Gelelektrophorese erkennbar war (siehe Abb. 3.54). Dabei korrelierte die Stärke der Wt1-tTA Bande mit der Anzahl an injizierten EGFP-positiven Zellen.

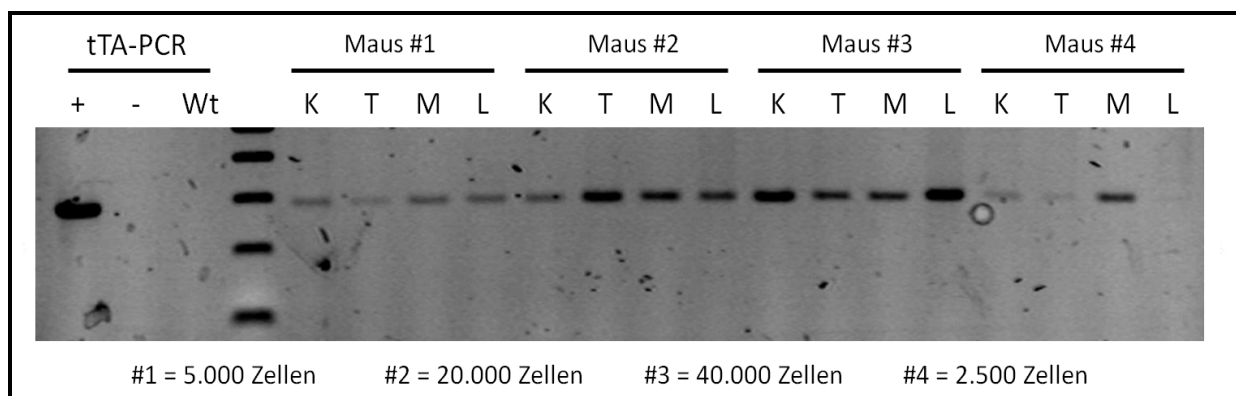


Abbildung 3.54: PCR-Nachweis von Wt1-tTA in verschiedenen blutbildenden bzw. blutdifferenzierten Organen von injizierten Mäusen

Abbildung 3.54 zeigt den PCR-Nachweis von Wt1-tTA (tTA-PCR) in Organen von Mäusen, die mit embryonalen Wt1-exprimierenden Zellen des WE2 TC RG-Modells injiziert worden sind. Für die PCRs sind 50 ng DNA pro Probe eingesetzt worden. Links vom 100 bp-Marker (M) sind die PCR-Proben einer Positivkontrolle (+), einer Negativ- und einer Wildtypprobe erkennbar (- bzw. Wt). Rechts vom Marker sind die PCR-Proben der jeweiligen entnommenen Organe der Mäuse zu sehen, die mit einer unterschiedlichen Anzahl an Zellen injiziert worden sind. Bei den entnommenen Organen handelt es sich um das Knochenmark (K), den Thymus (T), die Milz (M) und die Leber (L). In allen PCR-Proben der Organe ist der Nachweis von Wt1-tTA möglich. Dies ist an der DNA-Bande der Größe von ca. 300 bp erkennbar. Die Bande kommt durch die eingesetzten Primer zustande (tTA for1 und tTA rev6), die ausschließlich im tTA binden.

Die Transplantationsversuche zeigten, dass in den radioaktiv bestrahlten Mäusen, embryonale Wt1-tTA positive Zellen (Tag 11,5 *d.p.c.*) des Modells WE2 TC RG helfen, das Blutsystem wieder aufzubauen. Dies konnte durch den PCR-Nachweis von Wt1-tTA im Blut und blutbildenden bzw. blutdifferenzierenden Organen von injizierten Mäusen nachgewiesen werden. Demnach besitzen diese embryonalen Wt1-exprimierenden Zellen hämatopoetische Stammzell-Eigenschaften. Durch die nachfolgenden Stammzellassays sollte diese Beobachtung bestätigt werden.

3.3.4 Hämatopoetische Stammzellassays Wt1-tTA positiver Zellen

Ob Zellen hämatopoetische Stammzell-Eigenschaften haben, kann mit Hilfe des *Mouse Colony-Forming Cell (CFC) Assays Using Methocults*® (STEMCELL technologies, Grenoble) analysiert werden (siehe Material und Methoden 2.6.7).

Um dies auch für die Wt1-tTA exprimierenden Zellen der AGM-Region zu untersuchen, wurde ein *timed mating* von WE2 EZ-positiven Männchen und Weibchen ohne Doxycyclin angesetzt. An Tag 11,5 *d.p.c.* präparierte man die Embryonen und stellte eine Zellsuspension von ihnen her. Da durch das WE2 EZ-Modell alle Zellen EGFP-positiv sind, die zu diesem Zeitpunkt Wt1 exprimieren (siehe Abb. 3.3), konnte durch eine anschließende Durchflusszytometrie eine EGFP-positive und EGFP-negative Zellpopulation isoliert werden. Anschließend wurden die EGFP-positiven und negativen Zellen nach den Angaben des *Mouse Colony-Forming Cell (CFC) Assays Using Methocults*® ausplattiert und kultiviert, um nachfolgend deren Fähigkeit der Entwicklung von hämatopoetischen Vorläuferzellen zwischen Tag 5 und 20 nach Ausplattierung der Zellen unter dem Lichtmikroskop zu beurteilen. Sollte es zur Entstehung von hämatopoetischen Vorläuferzellen aus EGFP-positiven Zellen kommen, soll durch den Nachweis einer Wt1-tTA-PCR der Beweis erbracht werden, dass allein diese Zellen hämatopoetische Stammzell-Eigenschaften besitzen und die Kolonien nicht durch andere Zellen entstanden sind.

Nach dem *timed mating*, der Präparation der Embryonen (Tag 11,5 *d.p.c.*) und der Herstellung der Zellsuspension konnten mittels einer Durchflusszytometrie 18552 EGFP-positive und 1,4 Millionen EGFP-negative Zellen isoliert werden (Daten nicht gezeigt). Von beiden Zellpopulationen wurden je 1000 Zellen für das *Mouse Colony-Forming Cell (CFC) Assay Using Methocults*® auf mehreren Platten ausgesät und kultiviert. Bis zum 17. Tag der Ausplattierung wuchsen nur einzelne kleine Zellkolonien auf den Platten mit EGFP-positiven Zellen. Nachfolgend nahm die Anzahl dieser kleinen Kolonien täglich zu. An Tag 18 wurden diese größer und es bildeten sich traubenartige Strukturen, die sich anschließend zu erythroiden Vorläuferzellen differenzierten (Tag 19). Einen Tag später waren am Rande der hämatopoetischen Vorläufer Nervenzellen nachweisbar (siehe Abb. 3.55). Zudem konnten große runde Zellen beobachtet werden, die Megakaryozyten ähnelten. Auf den Platten der EGFP-negativen Zellen waren keine hämatopoetischen Vorläuferzellen nachweisbar.

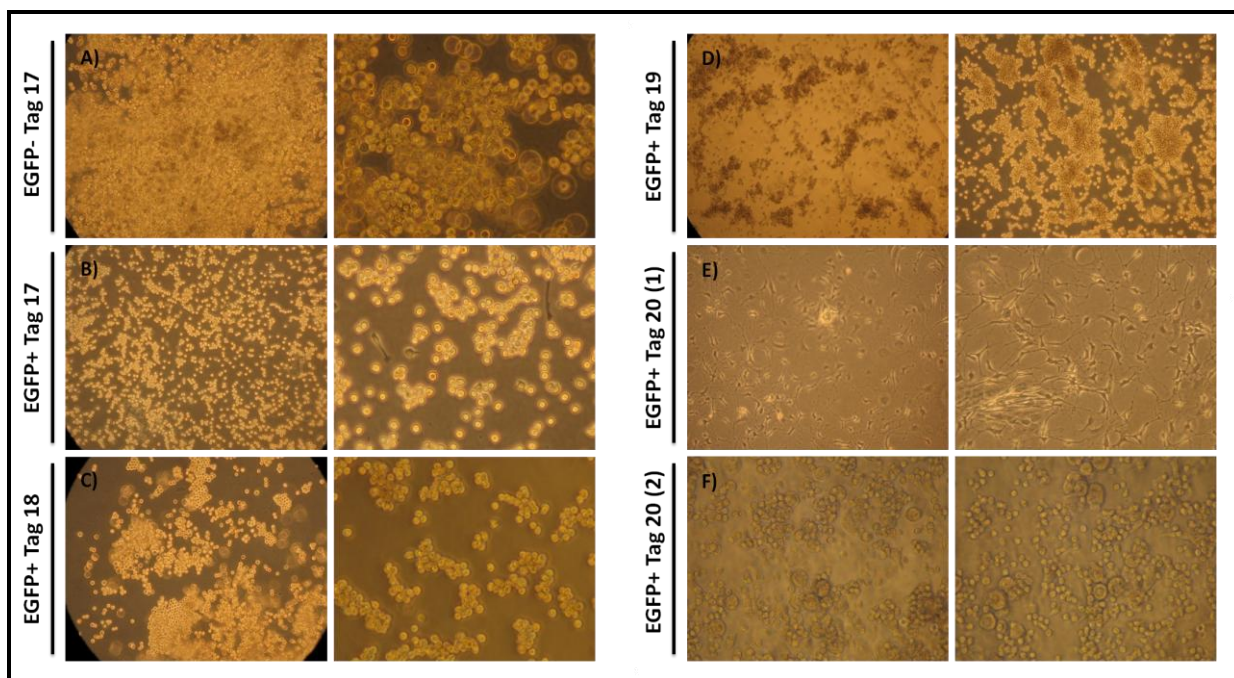


Abbildung 3.55: Wt1-tTA positive Zellen von WE2 EZ-positiven Embryonen (Tag 11,5 *d.p.c.*) scheinen hämatopoetische Stammzell-Eigenschaften zu besitzen

In dieser Abbildung sind die Ergebnisse des *Mouse Colony-Forming Cell (CFC) Assays Using Methocults*® von EGFP-positiven und EGFP-negativen Zellen des WE2 EZ-Modells dargestellt. In Abschnitt **A**) sind die EGFP-negativen Zellen am 17. Tag nach deren Ausplattierung zu erkennen und in Abschnitt **B**) bis **F**) die EGFP-positiven Zellen zwischen Tag 17 und 20. Jeweils zwei Lichtmikroskop-Aufnahmen unterschiedlicher Vergrößerung sind in den jeweiligen Abschnitten abgebildet. **A**) Die EGFP negativen Zellen bilden während der gesamten Zeit keine hämatopoetischen Kolonien. **B**) Erste kleine Kolonien sind bei den EGFP-positiven Zellen an Tag 17 zu beobachten. **C**) Die Anzahl der Kolonien nimmt an Tag 18 zu. Zudem werden sie größer und nehmen eine traubenförmige Struktur an. **D**) An Tag 19 weisen die Kolonien den Charakter von erythroiden Vorläuferzellen auf. **E**), **F**) Am Rande dieser hämatopoetischen Vorläuferzellen bilden sich an Tag 20 Nervenzellen. Zudem sind große runde Zellen zu erkennen, die Megakaryozyten ähneln.

Um den Beweis zu erbringen, dass die hämatopoetischen Vorläuferzellen aus Wt1-tTA exprimierenden Zellen des WE2 EZ-Modells entstanden waren, wurde von zwei Platten mit EGFP-positiven Zellen DNA isoliert und eine Wt1-tTA-PCR durchgeführt. Dabei verwendete man zwei Primer, die beide ausschließlich im tTA binden (tTA for1 und tTA rev6), so dass nach einer Agarose-Gelelektrophorese ein positiver Wt1-tTA-Nachweis durch eine ca. 300 bp große Bande erkennbar ist. In den hämatopoetischen Vorläuferzellen beider Platten konnte Wt1-tTA nachgewiesen werden, was dafür sprach, dass diese von den isolierten, embryonalen und EGFP-positiven Zellen des WE2 EZ-Modells abstammten (siehe Abb. 3.56).

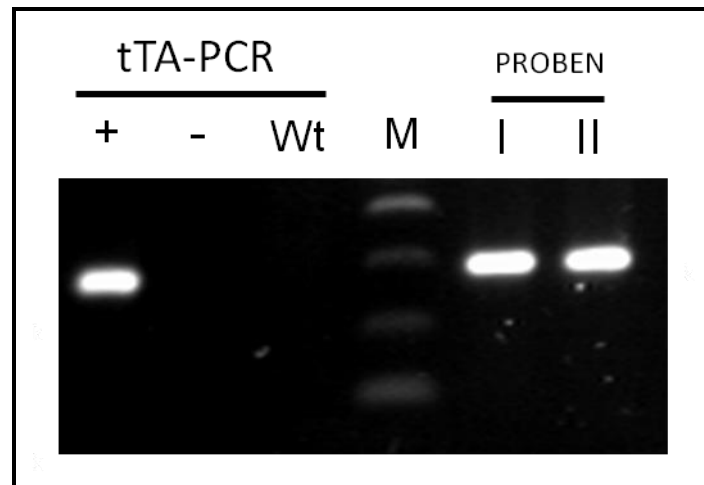


Abbildung 3.56: PCR-Nachweis von Wt1-tTA in differenzierten, hämatopoetischen Zellen des Stammzellassays

Abbildung 3.56 zeigt den PCR-Nachweis von Wt1-tTA (tTA-PCR) in hämatopoetischen Zellen, die während des *Mouse Colony-Forming Cell (CFC) Assays Using Methocults*® entstanden sind. Für die PCRs sind 50 ng DNA pro Probe eingesetzt worden. Links vom 100 bp-Marker (M) sind die PCR-Proben einer Positivkontrolle (+), einer Negativ- und einer Wildtypprobe erkennbar (- bzw. Wt). Rechts vom Marker sind zwei PCR-Proben von hämatopoetischen Vorläuferzellen zu sehen. In den PCR-Proben der Zellen ist der Nachweis von Wt1-tTA möglich. Dies ist an der DNA-Bande der Größe von ca. 300 bp erkennbar. Die Bande kommt durch die eingesetzten Primer zustande (tTA for1 und tTA rev6), die ausschließlich im tTA binden.

Wie auch schon im Transplantationsversuch konnte durch dieses Stammzellassay bestätigt werden, dass embryonale Wt1-exprimierende Zellen (Tag 11,5 *d.p.c.*) hämatopoetische Stammzell-Eigenschaften besitzen und aus ihnen hämatopoetische Vorläuferzellen entstehen.

Zusammenfassend konnte nach den Analysen der embryonalen Wt1-tTA exprimierenden Zellen (Tag 11,5 *d.p.c.*) der AGM-Region festgehalten werden, dass Wt1 direkt an der Entstehung von hämatopoetischen Stammzellen beteiligt ist (Immunfluoreszenz-Versuche). Zudem spricht der Nachweis von Wt1/CD41/CD45-positiven Zellen in der Leber dafür, dass diese Zellen, ausgehend von der AGM-Region, dieses blutbildende Organ besiedeln und Wt1 somit in der frühen Hämatopoese eine Rolle spielt. Diese Annahme wurde durch die Transplantationsversuche unterstützt, da die embryonalen Wt1-exprimierenden Zellen (Tag 11,5 *d.p.c.*) in der Lage waren, das durch Radioaktivität zerstörte Blutsystem bestrahlter Mäuse wieder aufzubauen. Somit besitzen diese Zellen hämatopoetische Stammzell-Eigenschaften, was durch die hämatopoetischen Stammzellassays bestätigt werden konnte. Die Beobachtungen der Immunfluoreszenz-Versuche wurden nur mit Einschränkungen durch die Ergebnisse der Durchflusszytometrie-Analysen bestätigt.

4. Diskussion

Der Wilms-Tumor ist eine embryonale Tumorerkrankung der Niere und einer der am häufigsten auftretenden soliden Tumore bei Kindern. Als Ausgangspunkt dieser Erkrankung gelten pluripotente, embryonale Nierenvorläuferzellen (nephrogene Reste). Diese scheinen durch fehlgesteuerte Prozesse der Nephrogenese zu entstehen und die Entwicklung eines triphasischen Wilms-Tumors zu begünstigen (Benington und Beckwith, 1975; Beckwith *et. al.*, 1990). Zwar gibt es viele Syndrome, Genmutationen und Chromosomenaberrationen, die mit dieser Tumorerkrankung assoziiert sind, doch ist der genaue Mechanismus der Entstehung des Wilms-Tumors weitgehend unklar.

Zwei Gene, die bei der Entstehung des Wilms-Tumors eine bedeutende Rolle zu spielen scheinen, sind *WT1* und *CTNNB1*. Während wohl eine alleinige heterozygote Keimbahnmutation von *WT1* einen dominant-negativen Effekt auf funktionsfähiges WT1 ausübt und somit die Entstehung von Wilms-Tumoren in Patienten mit DDS fördert (Pelletier *et. al.*, 1991 a), so sind in etwa 15 % aller sporadischen Wilms-Tumore *WT1* und *CTNNB1* mutiert (Maiti *et. al.*, 2000). Somit liegt bei diesen Tumoren der Verdacht nahe, dass sie zusammen die Tumorgenese dieser Erkrankung steuern. Die Forschungsergebnisse der letzten 20 Jahre bestärken diese Theorie. So wird angenommen, dass es in der frühen Nephrogenese durch inaktivierende *WT1*-Mutationen im metanephrischen Mesenchym zur Entstehung von nephrogenen Resten kommt (Beckwith *et. al.*, 1990). Mutationen von *CTNNB1*, die zur Akkumulation seines Proteins β -Catenin und zur Deregulation des in der Entwicklung wichtigen kanonischen Wnt-Signalwegs führen, scheinen zu einem späteren Zeitpunkt in den nephrogenen Resten aufzutreten und nachfolgend die Entstehung eines triphasischen Wilms-Tumors mit stromaler Dominanz und zusätzlichen, mesenchymalen Elementen zu begünstigen (Fukuzawa *et. al.*, 2004; Fukuzawa *et. al.*, 2007; Fukuzawa *et. al.*, 2009).

Bisher gibt es keine murinen *in vivo*-Modelle, die eine Entstehung eines Wilms-Tumors nach den oben beschriebenen Theorien bestätigen. Dies liegt daran, dass homozygote *Wt1*-Mutationen während der murinen Embryogenese an Tag 13,5 *d.p.c.* letal sind und Mäuse mit heterozygoter *Wt1*-Mutation keine phänotypischen Auffälligkeiten zeigen (Kreidberg *et. al.*, 1993). Um trotzdem murine *Wt1*-assoziierte Wilms-Tumore zu generieren und somit den Mechanismus der Entstehung dieser Erkrankung zu entschlüsseln, sollten in der vorliegenden Doktorarbeit mit Hilfe von einer in unserer Arbeitsgruppe generierten *Wt1* *k.o.*-Effektormaus (WE2, siehe Material und Methoden 2.1.11) vier murine konditional reversible Wilms-Tumor-Modelle hergestellt und charakterisiert werden. Dadurch lag in den zu generierenden Tieren *Wt1* durch

die Integration des WE2-Transgens zwar nur heterozygot mutiert vor, doch durch den endogenen *Wt1*-Promotor des Transgens sollte es zur zeitlichen und räumlichen *Wt1*-analogen Expression eines tetrazyklinabhängigen Transaktivators (tTA) kommen, der ohne die Gabe von Doxycyclin Tet-regulierbare Transgene in *Wt1*-exprimierenden Zellen aktivieren kann, die einen positiven Einfluss auf die Wilms-Tumorgenese haben könnten. So sollte mit Hilfe des WE2 DDS-Modell ein DDS simuliert werden und es im Falle der Modelle WE2 TC bCat Δ Ex3 bzw. WE2 LC bCat Δ Ex3 und WE2 *Wnt1* zur Akkumulation von β -Catenin in *Wt1*-exprimierenden Zellen des metanephrischen Mesenchyms kommen. Dadurch würde nachfolgend in diesen Zellen die kanonische Wnt-Signalkaskade aktiviert werden. Die Deregulation, dieses in der Entwicklung zentralen Signalwegs, könnte in den sich differenzierten Zellen des metanephrischen Mesenchyms zum Verbleib und einer erhöhten Proliferation führen und des Weiteren die Entstehung eines triphasischen Wilms-Tumors begünstigen.

4.1 Charakterisierung der WE2-Effektor-Mauslinie

Um die WE2-Effektor-Mauslinie zur Herstellung der konditionalen reversiblen Wilms-Tumor-Modelle nutzen zu können, muss eine *Wt1*-spezifische Expression des tTA gewährleistet sein. Um dies zu untersuchen, wurden Analysen mit Hilfe der Modelle WE2 EZ und WE2 TC RR in embryonalen und adulten Geweben durchgeführt (siehe Kap. 3.1.1 und 3.1.2). Durch das WE2 EZ-Modell besteht die Möglichkeit, alle Zellen nachzuweisen, die *Wt1* aktuell exprimieren (siehe Abb. 3.3). Mit Hilfe des WE2 TC RR-Modell können dagegen Zellen detektiert werden, die *Wt1* einmal exprimiert haben (siehe Abb. 3.4).

Generell konnte bei der Charakterisierung der WE2-Effektor-Mauslinie ein den Modellen entsprechendes *Wt1*-analogen tTA-Expressionsmuster nachgewiesen werden. Einige widersprüchliche Daten sind wohl durch methodische Problematiken zu erklären oder zeigen Ergebnisse, die noch nicht in der Literatur beschrieben sind.

4.1.1 Embryonale und adulte *Wt1*-tTA Expression im WE2 EZ-Modell

Die ersten Untersuchungen im WE2 EZ-Modell zur Charakterisierung der WE2-Effektor-Mauslinie erfolgten durch X-Gal-Färbungen WE2 EZ-positiver und -negativer Embryonen (Tag 11,5 *d.p.c.*) und deren histologischen Schnittpräparaten (siehe Kap. 3.1.1.1). Dabei konnte in WE2 EZ-positiven Embryonen eine *Wt1*-tTA Expression im entstehenden Urogenitalsystem, sowie dem Urnierengang mit dessen Kanälchen nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.6). Diese

Orte der Wt1-tTA Expression entsprechen dem von endogenen Wt1 an Tag 11,5 der murinen Embryogenese (Armstrong *et. al.*, 1993; Rackley *et. al.*, 1993) und weisen somit auf die Induzierbarkeit der WE2-Effektor-Mauslinie hin. Auch der Nachweis einer X-Gal-Färbung in den Somiten entspricht der endogenen Expression von Wt1 an Tag 11,5 *d.p.c.* (Rackley *et. al.*, 1993; Moore *et. al.*, 1998), da sich aus diesen Segmenten unter anderem die Rumpf- und Gliedmaßenmuskulatur entwickelt (Sadler, 2008), in denen Wt1 exprimiert wird. Dagegen ist die zu beobachtende Wt1-tTA Expression im Endothel der linken und rechten Kardinalvene in der Literatur noch nicht als endogener Wt1-Expressionsort beschrieben, wobei es sich bei den gefärbten Zellen wohl eher um Wt1 exprimierende Zellen des entstehenden Urogenitalsystems handelt (siehe Abb. 3.6 und 3.7).

Kein Nachweis der Wt1-tTA-Expression war in den mesothelialen Überzügen der Organe des Thorax und des Abdomens möglich (siehe Abb. 3.6), obwohl in der Literatur von mehreren Arbeitsgruppen der Nachweis von endogenen Wt1 z.B. in mesothelialen Zellen des entstehenden Darms, der Lunge oder des Herzens beschrieben wird (Wilm *et. al.*, 2005; Que *et. al.*, 2008; Zhou *et. al.*, 2008). Vielleicht ist die Wt1-Expression in den wenigen Zellen des mesothelialen Überzugs dieser Organe zu schwach, um durch das WE2 EZ-Modell nachgewiesen zu werden.

Um die Wt1-analoge tTA-Expression der WE2-Effektor-Mauslinie durch zusätzliche Versuche zu bestätigen, wurden Immunfluoreszenz-Färbungen auf Paraffinschnitten von WE2 EZ-positiven und negativen Embryonen (Tag 11,5 *d.p.c.*) durchgeführt. Durch den Nachweis von Wt1 und EGFP ist eine direkte Aussage zum Expressionsmuster von endogenen Wt1 und Wt1-tTA möglich. Die Ergebnisse glichen denen der Expressionsanalysen der X-Gal-Färbungen. So war ein Nachweis von endogenen Wt1 und Wt1-tTA (EGFP) in den Strukturen des sich entwickelten Urogenitalsystems detektierbar, aber nicht in den mesothelialen Überzügen der Organe des Thorax und Abdomens (siehe Abb. 3.7).

Abweichend von den Analysen der X-Gal-Färbung konnte in der AGM-Region eine Expression von endogenen Wt1 und Wt1-tTA (EGFP) im Endothel des mittleren und ventralen Teils der dorsalen Aorta detektiert werden (siehe Abb. 3.7). Auch das darunterliegende Mesenchym wies Wt1 und EGFP exprimierende Zellen auf. Gerade das Endothel des mittleren und ventralen Teils der dorsalen Aorta ist für die Entstehung von hämatopoetischen Stammzellen wichtig (Boisset *et. al.*, 2010; Yokomizo und Dzerniak, 2010; Rybtsov *et. al.*, 2011). Zusammen mit der Tatsache, dass Wt1 in hämatopoetischen Vorläuferzellen exprimiert wird (Frazier *et. al.*, 1995; Ellison *et. al.*, 2001; Alberta *et. al.*, 2003), lässt Vermutungen zu, dass Wt1 an der Entstehung von hämatopoetischen Stammzellen beteiligt ist und in der frühen Hämatopoese eine Rolle spielt.

Die Bedeutung von Wt1 für die Entstehung von hämatopoetischen Stammzellen ist noch nicht erforscht und soll anhand der Ergebnisse des Kapitels 3.3 später genauer diskutiert werden (siehe Diskussion 4.3).

Um die Expressionsdomäne der WE2-Effektor-Mauslinie auch in adulten Geweben des WE2 EZ-Modells zu analysieren, wurden histologische Schnitte von X-Gal gefärbten Nieren, Hoden und Ovarien von WE2 EZ-positiven und -negativen Mäusen angefertigt (siehe Kap. 3.1.2.1).

In X-Gal gefärbten Nieren von WE2 EZ-positiven Mäusen war lediglich eine Wt1-tTA-Expression in den Glomeruli sichtbar (siehe Abb. 3.10). Durch höhere mikroskopische Auflösung konnte die Wt1-tTA Expression den Podozyten und der Bowman-Kapsel zugeordnet werden. Die endogene Wt1-Expression der adulten Niere ist normalerweise auf die Podozyten beschränkt (Pritchard-Jones *et. al.*, 1990). Ob neben den Podozyten auch Zellen der Bowman-Kapseln durch X-Gal gefärbt worden sind, kann nur durch Co-Immunfärbungen mit Podozytenspezifischen Proteinen, wie z.B. Nephritin und Podocalyxin, bestimmt werden. Davon abgesehen, stimmt das Expressionsprofil von Wt1-tTA mit dem von endogenen Wt1 in der adulten Niere überein, da sonst keine weiteren Zelltypen der Niere Wt1-tTA exprimierten.

Im Falle der X-Gal gefärbten Hoden von WE2 EZ-positiven Männchen waren die Sertoli-Zellen Wt1-tTA positiv (siehe Abb. 3.11). Diese Zellen sind als Expressionsorte von endogenen Wt1 bekannt (Pelletier *et. al.*, 1991 c). Zudem konnte eine Expression von Wt1-tTA in den Testosteron-produzierenden Leydig-Zellen im Interstitium und dem Deckepithel der Hoden nachgewiesen werden, für die bisher keine Wt1-Expression beschrieben worden sind. Während die Expression von Wt1-tTA im Deckepithel auf einzelne Bereiche beschränkt war und wohl unspezifisch ist, ist eine Wt1-Expression in den Leydig-Zellen durchaus vorstellbar, da Wt1 während der Gonadenentwicklung Gene reguliert, die für die Differenzierung und den Erhalt von Leydig-Zellen wichtig sind (Meeks *et. al.*, 2003; Park *et. al.*, 2005). Bei diesen Wt1-regulierten Genen handelt es sich um *Dax1* (*Dosage-sensitive sex reversal, adrenal hypoplasia congenital critical region on the X chromosome, gene 1*) und *Sf1* (*Steroidogenic factor 1*). Es wäre somit denkbar, dass Wt1 diese Gene auch in reifen Leydig-Zellen reguliert. Immunfluoreszenz-Analysen in denen die Coexpression von Wt1 und Dax1 bzw. Sf1 untersucht wird, könnten darüber Aufschluss geben, ob diese Gene gemeinsam in differenzierten Leydig-Zellen exprimiert werden und somit eine Regulation durch Wt1 möglich ist.

Wie auch in den Hoden von WE2 EZ-positiven Männchen konnten auch in den Ovarien von WE2 EZ-positiven Weibchen Expressionsorte von Wt1 nachgewiesen werden, die in der Literatur beschrieben sind oder als noch unbekannt gelten. So konnte z.B. die Expression von Wt1-tTA in Granulosa-Zellen nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.12), die auch schon von

Pelletier und Kollegen beschrieben worden ist (Pelletier *et. al.*, 1991 c). Diese Arbeitsgruppe wies auch eine Expression von endogenen Wt1 im ovariellen Epithel nach, die in WE2 EZ-positiven Ovarien nicht detektiert werden konnte und somit Beobachtungen von Mundlos und Kollegen stützt, in deren Untersuchungen ebenfalls keine Expression von Wt1 im ovariellen Epithel nachweisbar war (Mundlos *et. al.*, 1993). Zudem beschrieben sie eine Expression von Wt1 in primären Follikeln, die auch in WE2 EZ-positiven Ovarien beobachtet werden konnte (Mundlos *et. al.*, 1993). Als noch nicht bekannten Expressionsort von endogenen Wt1 gelten die stromalen Zellen des Ovars, die in WE2 EZ-positiven Ovarien Wt1-tTA exprimierten. Diese Wt1-tTA positiven, stromalen Zellen lagen zumeist direkt an der Zellschicht von Granulosa-Zellen der Follikel. Somit könnte es sich bei diesen Wt1-tTA-exprimierenden Zellen des Stromas um hormonproduzierende Theca-Zellen handeln, in deren Abhängigkeit Granulosa-Zellen Östrogen produzieren. Theca-Zellen sind das ovarielle Äquivalent zu den Leydig-Zellen in den Hoden (Welsch und Sobotta, 2006). Da beide als Expressionsort von Wt1-tTA im WE2 EZ-Modell beschrieben worden sind (s.o.), ist durchaus vorstellbar, dass Wt1 in diesen hormonproduzierenden Zelltypen eine entscheidende Rolle spielt, die in zusätzlichen Analysen genauer untersucht werden muss. Als ebenfalls unbekannter Expressionsort von endogenen Wt1 gelten die Oozyten. Einige dieser Zellen waren in WE2 EZ-positiven Ovarien Wt1-tTA exprimierend. Bis zum Beginn der Reifung einer Eizelle befinden sich Oozyten in einem ruhenden Zustand. Da Wt1 z. B. mit *Bcl2* und *Sfl* Gene reguliert, die einen anti-apoptotischen Effekt auf Zellen haben (Hewitt *et. al.*, 1995; Mayo *et. al.*, 1999; Wilhelm und Englert, 2002), kann es durchaus sein, dass endogenes Wt1 auch in Oozyten diese Funktion ausführt und exprimiert wird. Auch bezüglich dieses Aspektes bedarf es genauerer Untersuchungen.

4.1.2 Embryonale und adulte Wt1-tTA Expression im WE2 TC RR-Modell

Zur Untersuchung der embryonalen Wt1-tTA-Expression des WE2 TC RR-Modell wurden WE2 TC RR-positive und -negative Embryonen (Tag 12,5 *d.p.c.*) X-Gal gefärbt und histologische Schnittpräparate angefertigt (siehe Kap. 3.1.1.2). Wie in Embryonen des WE2 EZ-Modells war eine Wt1-tTA-Expression in dem entstehenden Urogenitalsystem nachweisbar. Vor allem die sich gerade bildenden Komma- und S-förmigen Vesikel der entstehenden Niere wiesen eine starke Expression von Wt1-tTA auf, deren endogene Wt1-Expression an Tag 12,5 *d.p.c.* auch in der Literatur beschrieben ist (Armstrong *et. al.*, 1993; Rackley *et. al.*, 1993). Zudem konnte auch mit diesem Modell die Wt1-tTA-Expression im Endothel und dem darunterliegenden Mesenchym der dorsalen Aorta bestätigt werden (siehe Abb. 3.9). Vor allem im mittleren und ventralen Teil des Endothels der dorsalen Aorta waren Wt1-tTA positive Zellen nachweisbar.

Dies bestätigt somit die Beobachtungen des WE2 EZ-Modells und bestärkt die Vermutung, dass Wt1 eine Rolle bei der Entstehung von hämatopoetischen Stammzellen spielen könnte (s.o.).

Im Gegensatz zum WE2 EZ-Modell war es mit dem WE2 TC RR-Modell möglich, die Expression von Wt1-tTA in den Organen des Abdomens und Thorax nachzuweisen (siehe Abb. 3.9). Die Expression von Wt1-tTA war dabei nicht nur auf die mesothelialen Überzüge des Darms, der Leber, der Lunge und des Herzens beschränkt, sondern auch in Zellen innerhalb der entstehenden Organe nachweisbar. Dies ist damit zu erklären, dass endogenes Wt1 im Falle der Leber die Bildung von Ito-Zellen ausgehend vom Wt1-positiven Mesothel reguliert (Ijpenberg *et. al.*, 2007). Zudem steuert es in der Lunge, dem Darm und dem Herzen die EMT der mesothelialen Zellen, wodurch es nachfolgend zur Migration dieser Zellen in das entstehende Organ kommt. Im Anschluss bilden diese nun Wt1-negativen Zellen, Vorläuferzellen von glatten Muskelzellen und endothelialen Zellen, die zur Gefäßbildung des jeweiligen Organs beitragen (Wilm *et. al.*, 2005; Que *et. al.*, 2008; Zhou *et. al.*, 2008). Da nun durch das WE2 TC RR-Modell alle Zellen markiert werden, die einmal Wt1-tTA exprimiert haben, ist der Nachweis dieser Zellen in den Organen des Thorax und Abdomens von WE2 TC RR-positiven Embryonen (Tag 12,5 *d.p.c.*) erklärbar. Im WE2 EZ-Modell war ein Nachweis dieser Zellen nicht möglich, da in diesem Modell nur aktuell Wt1-tTA exprimierende Zellen blau gefärbt werden.

Zudem waren Wt1-tTA-exprimierende Zellen auch in der *Chorda dorsalis*, Bereichen des Knochenmarks, sowie den Ganglien des Gehirns, der Augen und des Rückenmarks von WE2 TC RR-positiven Embryonen nachweisbar (siehe Abb. 3.8). Auch diese Beobachtungen lassen sich durch die Tatsache klären, dass im WE2 TC RR-Modell durch X-Gal-Färbung alle Zellen detektierbar sind, die einmal Wt1-tTA exprimiert haben. Endogenes Wt1 wird nämlich ab Tag 9,5 *d.p.c.* im intermediären und lateralen Mesoderm exprimiert und ist nachfolgend an der Entwicklung von Organen aus Derivaten des Mesoderms und Ektoderm beteiligt (Armstrong *et. al.*, 1993; Rackley *et. al.*, 1993; Wilm *et. al.*, 2005; Que *et. al.*, 2008; Zhou *et. al.*, 2008). Da die *Chorda dorsalis* ein Derivat des Mesoderms ist und das Rückenmark, die Ganglien der Sinnesorgane und des Gehirns Derivate des Ektoderms darstellen, ist die Expression von Wt1-tTA in WE2 TC RR-positiven Embryonen erklärbar und stellt somit einen weiteren Beweis dar, dass die Expression von Wt1-tTA durch die WE2-Effektor-Mauslinie mit dem Expressionsmuster von endogenem Wt1 übereinstimmt.

Um die Expressionsdomäne der WE2-Effektor-Mauslinie auch in adulten Geweben des WE2 TC RR-Modells zu analysieren, wurden histologische Schnitte von X-Gal gefärbten Nieren, Hoden und Ovarien angefertigt, die WE2 TC RR-positiv und -negativ waren (siehe Kap. 3.1.2.2).

In Nieren von WE2 TC RR-positiven Mäusen konnte eine fast komplette Blaufärbung des Organs beobachtet werden (siehe Abb. 3.13). Beinahe fast alle Glomeruli, proximalen und distalen Tubuli, sowie die Tubuli der Henle-Schleife exprimierten Wt1-tTA. Lediglich die Sammelrohre wiesen keine Expression von Wt1-tTA auf. Die Beobachtungen entsprechen den Erwartungen des WE2 TC RR-Modells, da endogenes Wt1 während der Nephrogenese an Tag 11,5 *d.p.c.* im metanephrischen Mesenchym exprimiert wird, aus dem fast alle Elemente der Nephrone entstehen (Armstrong *et. al.*, 1993; Rackley *et. al.*, 1993). Nur die Sammelrohre stellen Abkömmlinge der Ureterknospe dar und exprimieren während der gesamten Nephrogenese kein Wt1 (Burrow, 2000; Schedl und Hastie, 2000; Dressler, 2002). Einzelne Glomeruli, proximalen und distalen Tubuli, sowie Tubuli der Henle-Schleife wiesen keine Wt1-tTA Expression auf. Dies könnte dadurch bedingt sein, dass die Färbung zu kurz durchgeführt worden war.

Die Expressionsorte von Wt1-tTA in X-Gal gefärbten Hoden und Ovarien von WE2 TC RR-positiven Mäusen entsprachen denen des WE2 EZ-Modells. Der einzige Unterschied der beiden Modelle bestand darin, dass in den WE2 TC RR-positiven Hoden und Ovarien wesentlich mehr Zellen blau gefärbt waren (siehe Abb. 3.14 und 3.15). Dies konnte vor allem in den tripeltransgenen Ovarien beobachtet werden. Der stärkere Nachweis einer Wt1-tTA-Expression im WE2 TC RR-Modell könnte darauf zurückzuführen sein, dass es im Lauf der Entwicklung dieser Organe zur Akkumulation des X-Gal Farbstoffes kommt und somit auch solche Zellen deutliche Signale aufweisen, die im WE EZ-Modell nicht oder nur schwach positiv waren. Generell bestätigen diese Ergebnisse die Beobachtungen des WE2 EZ-Modells und bestärken die in Kapitel 4.1.1 diskutierten Aspekte.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die embryonale und adulte Expressionsdomäne von Wt1-tTA zum größten Teil mit der von endogenem Wt1 übereinstimmt (siehe Abb. 4.1). Somit sind mit Hilfe dieser Mauslinie Analysen zu Vorgängen der Differenzierung, Homöostase und Pathogenese in Wt1-positiven Organen und Geweben möglich und die Voraussetzung für die Herstellung eines konditionalen reversiblen Wilms-Tumor-Modells gegeben. Zudem stellen die Modelle WE2 EZ und WE2 TC RR geeignete Systeme dar, um Wt1-exprimierende Zellen zu analysieren und deren Schicksal während Entwicklungsprozessen zu untersuchen, so dass zukünftig z.B. die Rolle von Wt1 in den hier beobachteten, aber in der Literatur noch nicht beschriebenen Wt1-Expressionsorten entschlüsselt werden kann.

Embryonale Wt1-tTA Expression (Tag 11,5 + D12,5 d.p.c.)		Adulte Wt1-tTA Expression (3 Monate)	
Bekannte Expressionsdomäne	Unbekannte Expressionsdomäne	Bekannte Expressionsdomäne	Unbekannte Expressionsdomäne
<ul style="list-style-type: none"> • Somiten <ul style="list-style-type: none"> - Rumpf-, Gliedmaßenmuskel • Urogenitalsystem <ul style="list-style-type: none"> - Gonadenanlage - entstehende Niere • Mesothelien innerer Organe <ul style="list-style-type: none"> - Herz, Leber, Darm, Lunge • Ganglien der Sinnesorgane • Rückenmark 	<ul style="list-style-type: none"> • AGM-Region <ul style="list-style-type: none"> - Endothel der dorsalen Aorta: mittlerer und dorsaler Bereich - Mesenchym der dorsalen Aorta (Entstehung hämatopoetischer Stammzellen ?) 	<ul style="list-style-type: none"> • Niere <ul style="list-style-type: none"> - Podozyten • Hoden <ul style="list-style-type: none"> - Sertoli-Zellen • Ovar <ul style="list-style-type: none"> - Granulosa-Zellen 	<ul style="list-style-type: none"> • Niere <ul style="list-style-type: none"> - Keine • Hoden <ul style="list-style-type: none"> - Leydig-Zellen • Ovar <ul style="list-style-type: none"> - stromale Zellen (Theca-Zellen) - Oozyten

Abbildung 4.1: Expressionsdomäne der WE2-Effektor-Mauslinie

In dieser Abbildung sind die Ergebnisse der Charakterisierung der WE2-Effektor-Mauslinie durch die Mausmodelle WE2 EZ und WE2 TC RR zusammengefasst. Dabei sind auf der linken Seite die Orte der embryonalen Wt1-tTA Expression (Tag 11,5 und 12,5 d.p.c.) und auf der rechten Seite die Orte der adulten Wt1-tTA Expression (3 Monate) aufgelistet. Die Angaben, ob es sich dabei um eine bekannte bzw. unbekannte Expressionsdomäne handelt, sind auf die in der Literatur beschriebene endogene Wt1-Expression bezogen. Zudem sind im unteren Teil der Abbildung beispielhaft Ergebnisse der Analysen zur Charakterisierung der Effektorlinie dargestellt.

4.2 Herstellung und Charakterisierung von konditional reversiblen Wilms-Tumor-Modellen

Der Nachweis der Wt1-analogen tTA-Expression der WE2-Effektor-Mauslinie und der damit bedingten Expression von Wt1-tTA im metanephrischen Mesenchym der entwickelten Niere ermöglichten die Entstehung von Wilms-Tumoren durch die Modelle WE2 DDS (siehe Abb. 3.16), WE2 TC bCat Δ Ex3 / WE2 LC bCat Δ Ex3 (siehe Abb. 3.21) und WE2 Wnt1 (siehe Abb. 3.36). Doch durch kein Modell konnte diese embryonale Tumorerkrankung induziert werden. Während Tiere des WE2 DDS-Modells gar keinen Phänotyp aufwiesen (siehe Kap. 3.2.1), entwickelten sich bei Tieren mit dem Genotyp WE2 TC bCat Δ Ex3, WE2 LC bCat Δ Ex3 und WE2 Wnt1 häufig Granulosazelltumore und gelegentlich polyzystische Nieren (siehe Kap. 3.2.2 und 3.2.3). Auch fehlgebildete Hoden konnten in einigen WE2 Wnt1-positiven Männchen beobachtet werden.

Neben der Tatsache, dass durch kein Modell ein Wilms-Tumor generiert werden konnte, wiesen einige Ergebnisse auch auf Probleme der Induzierbarkeit der Modelle hin. Diese Aspekte sollen im Folgenden genauso diskutiert werden, wie der Grund für die Entstehung der Veränderungen der Niere, der Ovarien und der Hoden.

4.2.1 Versuch der Simulation eines Denys-Drash Syndroms (DDS) zur Generierung eines Wilms-Tumors: Das WE2 DDS-Modell

Die ersten Analysen zur Simulation eines DDS fanden mit doppeltransgenen Tieren statt, die aus Zuchten von WE2-positiven Weibchen mit DDS2- bzw. DDS4-positiven Männchen generiert worden waren (siehe Kap. 3.2.1). Während die Zucht von WE2-positiven Weibchen und DDS2-positiven Männchen mit Doxycyclin durchgeführt wurde, erhielt die Zucht von WE2-positiven Weibchen und DDS4-positiven Männchen kein Doxycyclin. Unabhängig von der Gabe des Tetrazyklins wurden mehr doppeltransgene Männchen als Weibchen geboren, die auch nach acht Wochen phänotypisch unauffällig waren und in deren Nieren durch histologische Untersuchungen keine nephrogenen Reste, triphasischen Wilms-Tumore oder Glomerulopathien beobachtet werden konnten (siehe Abb. 3.18).

Diese Ergebnisse stellen somit die Aktivität des Modells in Frage, da es in doppeltransgenen Tieren, die ohne Doxycyclin aufgewachsen waren, unter der Kontrolle des tTA des WE2-Transgens zur Expression der *Wt1*-Punktmutation R394Q hätte kommen sollen. Diese Punktmutation, wie auch viele andere DDS-assoziierte *WT1*-Punktmutationen, betrifft das achte Exon von *WT1*, das den dritten Zinkfinger von *WT1* kodiert (Übersicht: Little *et. al.*, 1997). Dadurch kommt es zur Veränderung der Struktur dieses Zinkfingers und zu einem Verlust der DNA-Bindungsaktivität der *WT1*-Punktmutante an die Promotoren von *WT1*-Zielgenen (Borel *et. al.*, 1996; Little *et. al.*, 1997). Zudem wird angenommen, dass dieses mutierte *WT1*-Protein einen dominant-negativen Effekt auf das wildtypische *WT1* hat, da die Mutante mit diesem dimerisiert und somit die Funktion von *WT1* unterbindet (Hastie *et. al.*, 1992; Little *et. al.*, 1993; Bardeesy *et. al.*, 1994 a; Moffet *et. al.*, 1995). Als Folge des Funktionsverlustes von *WT1* kommt es zum Auftreten von DDS-Symptomen, wie z.B. Wilms-Tumoren, XY-Hermaphroditismus und Glomerulopathien (Pelletier *et. al.*, 1991 a).

Somit hätten durch ein induzierbares WE2 DDS-Modell bei der Zucht von WE2-positiven Weibchen und DDS4-positiven Männchen phänotypisch auffällige Männchen geboren werden müssen, da *Sry* (*Sex determining region of y*) ein direktes Zielgen von *Wt1* ist (Hossain und Saunders, 2001) und die Entwicklung der männlichen Geschlechtsorgane reguliert (McElreavey und Fellous, 1999). Auch das fehlende Auftreten von nephrogenen Resten, triphasischen Wilms-Tumor-Gewebe und Glomerulopathien in den Nieren der WE2 DDS4-positiven Mäuse spricht gegen die Expression des DDS-Transgens. Normalerweise kommt es nämlich während der Nephrogenese durch funktionsunfähiges *WT1* im metanephrischen Mesenchym zur Entwicklung von nephrogenen Resten, die als Ausgangspunkt der Entwicklung von Wilms-Tumoren gelten (Pelletier *et. al.* 1991 b). Zudem wird in DDS-Patienten mit *WT1*-Punktmutationen eine verstärkte Expression von *PAX2* beobachtet (Yang *et. al.*, 1999). Dieses Gen wird im Normalfall

durch *Wt1* inhibiert (Ryan *et. al.*, 1995) und scheint für die Entstehung von Glomerulopathien in DDS-Patienten verantwortlich zu sein (Dressler *et. al.*, 1993).

Um beurteilen zu können, ob das Ausbleiben von Symptomen eines DDS auf die fehlende Expression der Transgene zurückzuführen ist, wurde deren Aktivität auf RNA- und Protein-Ebene in Nieren von WE2 DDS2- bzw. WE2 DDS4-positiven Mäusen analysiert, die mit unterschiedlicher Gabe von Doxycyclin aufgezogen worden waren. Dabei konnte auf RNA-Ebene mittels semiquantitativer PCR festgestellt werden, dass entsprechend des Genotyps und je nach Gabe und Entzug von Doxycyclin die Transgene WE2, DDS2 und DDS4 exprimiert wurden (siehe Abb. 3.19). Somit waren die Voraussetzungen gegeben, dass die *Wt1*-Punktmutation einen dominant-negativen Effekt auf *Wt1*-Zielgene haben kann. Doch auf Proteinebene war dieser Effekt mittels *Western blot*-Analysen nicht nachweisbar. Die Expression der *Wt1*-Zielgene TGF- β und p21 wurde nicht beeinflusst (siehe Abb. 3.20).

Somit konnte durch diese Untersuchungen gezeigt werden, dass die DDS-Transgene zwar induzierbar sind, doch ein dadurch bedingter dominant-negativer Effekt ausbleibt, so dass kein DDS mit der Entstehung eines Wilms-Tumors simuliert werden kann. Ein Grund dafür könnte eine zu geringe Expression der *Wt1*-Punktmutation sein, worauf die Ergebnisse der Untersuchung der Gesamtexpression von *Wt1* auf RNA- und Protein-Ebene hinweisen, bei denen keine erhöhte *Wt1*-Expression nachweisbar war (siehe Abb. 3.19 und 3.20). Diese wäre allerdings zu erwarten gewesen, da in WE2 DDS-positiven Tieren *Wt1* von drei (wildtypisches *Wt1*, WE2 und DDS2 bzw. DDS4) anstatt zwei (wildtypisches *Wt1*) Allelen exprimiert wird. Somit könnten durch eine zu geringe Aktivität der DDS-Transgene ein kompletter Funktionsverlust von *Wt1* und die Entstehung eines Wilms-Tumors verhindert worden sein. Generell ist diese Vermutung rein spekulativ, da sie nicht durch quantitative PCR-Analysen bestätigt werden kann, sondern nur auf semiquantitativen PCR- und *Western blot*-Analysen beruht.

Ein weiterer Grund, dass es trotz der Expression der DDS-Transgene nicht zur Simulation eines DDS kommen kann, ist der genetische Hintergrund der Mäuse. So konnten zwei Arbeitsgruppen zeigen, dass in Mäusen mit heterozygoter *Wt1*-Punktmutation (R394W), die einen gemischten genetischen Hintergrund besaßen (C57BL/6J x 129Sv/Pas), keine Symptome eines DDS simuliert werden konnten. Währenddessen wiesen Mäuse ohne gemischten genetischen Hintergrund Glomerulopathien auf. Nur in diesen Tieren konnte ein dominant-negativer Effekt der *Wt1*-Punktmutation R394W auf die Expression von *Wt1*-Zielgenen festgestellt werden, der eine Veränderung der Nieren bedingte (Gao *et. al.*, 2004; Ratelade *et. al.*, 2009). Die Ursachen und der Mechanismus für den Unterschied zwischen den Tieren mit verschiedenen genetischen Hintergrund ist unklar (Gao *et. al.*, 2004), da aber auch die doppeltransgenen Mäuse des WE2

DDS-Modells einen gemischten genetischen Hintergrund besaßen (C57BL/6J x FVB), scheint dies ein möglicher Grund dafür zu sein, dass in diesen Tieren kein DDS simuliert werden kann. Generell muss die Frage gestellt werden, ob die Maus überhaupt ein geeignetes Tiermodell zur Simulation eines DDS mit der damit bedingten Entwicklung eines Wilms-Tumors ist, da selbst in murinen DDS-Modellen mit nachgewiesenen dominant-negativen Effekt nur Glomerulopathien auftreten und DDS-Symptome wie der Wilms-Tumor, XY-Hermaphroditismus und schwerwiegende Urogenitaldefekte nicht festgestellt werden können (Gao *et. al.*, 2004; Ratelade *et. al.*, 2009). Generell soll dieser Aspekt genauer in Kap. 4.2.2.2 diskutiert werden.

4.2.2 Versuch der Generierung eines Wilms-Tumors durch Wt1-analoge Aktivierung von β -Catenin: Die Modelle WE2 TC bCat Δ Ex3, WE2 LC bCat Δ Ex3 und WE2 Wnt1

In tripeltransgenen bzw. doppeltransgenen Tieren der Modelle WE2 TC bCat Δ Ex3, WE2 LC bCat Δ Ex3 und WE2 Wnt1 sollte es in Wt1-exprimierenden Zellen des metanephrischen Mesenchyms durch eine Akkumulation von β -Catenin zur Aktivierung der kanonischen Wnt-Signalkaskade kommen (siehe Abb. 3.22 und 3.36). Die Deregulation dieses in der Entwicklung zentralen Signalwegs könnte zum Verbleib und der erhöhten Proliferation von pluripotenten Vorläuferzellen des metanephrischen Mesenchyms führen und nachfolgend die Entstehung eines triphasischen Wilms-Tumors begünstigen (Li *et. al.*, 2004; Fukuzawa *et. al.*, 2009).

4.2.2.1 Induktion der Wilms-Tumorgnese durch Aktivierung von β -Catenin während der Nierenentwicklung

Um die Entwicklung eines Wilms-Tumors zu induzieren, wurden mit tripeltransgenen bzw. doppeltransgenen Nachkommen der Modelle *timed matings* durchgeführt bei denen an jeweils unterschiedlichen Tagen der Schwangerschaft Doxycyclin entzogen wurde. So waren die Systeme zu verschiedenen Zeitpunkten der Nephrogenese aktiv. Dabei fiel auf, dass alle Modelle einen selektiven Druck ausüben. Während bei den *timed matings* des WE2 Wnt1-Modells gar keine doppeltransgenen Nachkommen geboren wurden (siehe Tabelle 3.4), war bei den *timed matings* der Modelle WE2 TC bCat Δ Ex3 und WE2 LC bCat Δ Ex3 zu beobachten, dass es zu einer Abnahme von tripeltransgenen Nachkommen und zu einer Zunahme von Aborten kommt, umso früher Doxycyclin während der Schwangerschaft abgesetzt wird (siehe Abb. 3.24 und 3.25).

Die zu beobachtenden Effekte könnten dadurch erklärt werden, dass es in tripeltransgenen bzw. doppeltransgenen Nachkommen bei einem frühen Entzug von Doxycyclin durch das WE2-Transgen nicht nur im metanephrischen Mesenchym zur Aktivierung von β -Catenin kommt,

sondern eine Deregulation der kanonischen Wnt-Signalkaskade ab Tag 9,5 *d.p.c.* in allen Wt1-exprimierenden Geweben mit mesodermalen und ektodermalen Ursprung stattfindet (Armstrong *et. al.*, 1993; Rackley *et. al.*, 1993). Dadurch könnten nachfolgend nicht nur die Nephrogenese, sondern alle Wt1 gesteuerten Prozesse der Organogenese während der embryonalen Entwicklung gestört und verhindert werden, da durch eine Fehlregulation der kanonischen Wnt-Signalkaskade zelluläre Prozesse wie z.B. die Proliferation, Differenzierung, Migration und Apoptose beeinflusst werden (Übersicht: Logan und Nusse, 2004; Grigoryan *et. al.*, 2008). Somit wäre es durchaus vorstellbar, dass tripeltransgene bzw. doppeltransgene Embryonen der Modelle, in denen eine Aktivierung von β -Catenin in Wt1-exprimierenden Zellen zu einem frühen Zeitpunkt der murinen Embryogenese stattfindet, phänotypisch *Wt1 knock-out* Embryonen ähneln. Diese sterben intrauterin zwischen Tag 13,0 und 15,0 *d.p.c.* durch massive Fehlbildungen des Herzens (Kreidberg *et. al.*, 1993), wobei auch aberrante Entwicklungen des Mesotheliums, der Lungen, der Gonaden, der Leber, der Retina und ein Fehlen der Nieren, der Nebennieren sowie der Milz zu beobachten sind (Kreidberg *et. al.*, 1993; Moore *et. al.*, 1999; Herzer *et. al.*, 1999; Ijpenberg *et. al.*, 2007).

Im Folgenden soll am Beispiel der Entwicklung des Herzens erläutert werden, welche Prozesse eine β -Catenin-Aktivierung in Wt1-exprimierenden Zellen beeinflussen und verhindern kann, so dass es zum intrauterinen Tod von doppel- bzw. tripeltransgenen Embryonen kommt und der zu beobachtende Effekt der durchgeführten *timed matings* erklärt werden kann. Wt1 wird ab Tag 9,5 *d.p.c.* im Proepikard exprimiert. Diese Wt1-positiven Zellen migrieren im Anschluss über die gesamte Oberfläche des Herzens und bilden das Epikard (Zhou *et. al.*, 2008). Nachfolgend steuert Wt1 eine EMT dieser Zellen, so dass aus ihnen Wt1-negative Vorläuferzellen von glatten Muskelzellen und endothelialen Zellen werden, die sich im weiteren Verlauf zu koronaren glatten Muskelzellen, Endothelzellen, Fibroblasten und Kardiomyozyten differenzieren (Zhou *et. al.*, 2008; Martinez-Estrada *et. al.*, 2010). Eine frühe Unterbindung dieses Prozesses, z.B. durch eine Aktivierung von β -Catenin in Wt1-exprimierenden Zellen des Proepikards, könnte ab Tag 9,5 *d.p.c.* die Apoptose dieser Zellen induzieren oder deren Migration mit anschließender Bildung des Epikards inhibieren. Somit würde eine epikardiale EMT ausbleiben und eine normale Herzentwicklung nicht stattfinden, die zum intrauterinen Tod führen könnte.

Generell ist diese Annahme spekulativ, da es außer den hier beschriebenen Modellen bisher keine Mausmodelle gibt, in denen im embryonalen Herzen β -Catenin Wt1-analog aktiviert wird und Embryonen mit Herzfehlbildungen während der Dissertation nicht beobachtet werden konnten. Zudem stellt dies nur eine Möglichkeit dar, wie eine Aktivierung von β -Catenin embryonale Wt1 gesteuerte Prozesse beeinflussen kann. Trotzdem könnte sie erklären, warum es bei den *timed matings* der Modelle WE2 TC bCat Δ Ex3 und WE2 LC bCat Δ Ex3 bei einem

frühen Zeitpunkt des Doxycyclinentzugs zu einer Abnahme von tripeltransgenen Nachkommen, sowie einer Zunahme von Aborten kommt und bei den *timed matings* des Modells WE2 Wnt1 keine doppeltransgenen Tiere geboren werden. Wird hingegen Doxycyclin zu einem späteren Zeitpunkt der Embryogenese entzogen, so sind die Modelle zu den kritischen Zeitpunkten von Wt1-gesteuerten Prozessen der Organogenese, wie z.B. der Entwicklung des Herzens, wohl noch nicht aktiv, so dass diese nicht beeinflusst werden und daher die Anzahl von geborenen tripeltransgenen Tieren der Modelle WE2 TC bCat Δ Ex3 bzw. WE2 LC bCat Δ Ex3 steigt und Aborte ausbleiben. Dieser Effekt kann bei den *timed matings* des WE2 Wnt1-Modells nicht beobachtet werden, da auch bei einem Doxycyclinentzug zu einem späteren Zeitpunkt der Schwangerschaft keine doppeltransgenen Nachkommen geboren werden. Dies könnte daran liegen, dass die Anzahl an durchgeführten *timed matings* mit diesem Modell sehr viel geringer war (siehe Tabelle 3.4), als im Vergleich zu den anderen Modellen (siehe Abb. 3.24 und 3.25). Zusätzlich durchgeführte *timed matings* müssten klären, ob dieser Effekt zufällig auftrat.

Zusammenfassend kann nach den Analysen der *timed matings* aller drei Modelle festgehalten werden, dass wohl eine konstitutive β -Catenin-Aktivierung in der Frühschwangerschaft nicht mit dem embryonalen Überleben vereinbar zu sein scheint. Um dies zu beweisen und den Grund für den intrauterinen Tod der Embryonen und der Aborte zu bestimmen, müssten durch weitere *timed matings* fehlgebildete Embryonen präpariert und histopathologisch untersucht werden. Doch leider war dies bisher nicht möglich. Zudem lassen die Ergebnisse vermuten, dass die Modelle nicht zur Herstellung eines Wilms-Tumors geeignet sind, da wohl alle tripeltransgenen bzw. doppeltransgenen Embryonen, in denen durch einen frühen Doxycyclinentzug der Verbleib von nephrogenen Resten und somit die Entstehung von Wilms-Tumoren möglich gewesen wäre, intrauterin sterben.

Nichts desto trotz wurden bei den *timed matings* der Modelle WE2 TC bCat Δ Ex3 und WE2 LC bCat Δ Ex3 unabhängig vom Zeitpunkt des Entzugs von Doxycyclin tripeltransgene Nachkommen geboren (siehe Abb. 3.24 und 3.25). Diese waren auch nach dem dritten Lebensmonat phänotypisch und histopathologisch unauffällig (siehe Abb. 3.26). Somit stellte sich die Frage, wie sich diese Tiere bei einem frühen Doxycyclinentzug dem selektiven Druck der Systeme entziehen. War in diesen Mäusen eine Wt1 vermittelte Aktivierung von β -Catenin nicht induzierbar oder könnte es doch zu einem späteren Zeitpunkt zur Entstehung eines Wilms-Tumors kommen? Um die Frage der Induzierbarkeit der Systeme und der Eignung zur Generierung eines Wilms-Tumors zu beantworten, wurden die tripeltransgenen Nachkommen aller Verpaarungen (siehe Abb. 3.22 und 3.23) nach sechs Monaten ohne Doxycyclingabe präpariert und histopathologisch und molekular untersucht. Dabei konnte nach der Isolation der

DNA aus den präparierten Organen und einer nachfolgend durchgeführten bCat Δ Ex3-lox out-PCR festgestellt werden, dass die Deletion des Exons 3 von *Ctnnb1* fast ausschließlich in tripeltransgenen Tieren nachweisbar war, denen Doxycyclin erst im Alter von drei Wochen entzogen wurde. Lediglich in zwei tripeltransgenen Tieren, die aus den *timed matings* hervorgingen und Doxycyclin bis Tag 10,5 *d.p.c.* erhalten hatten, war ein *lox out* von Exon 3 von *Ctnnb1* nachweisbar. Somit scheinen sich alle geborenen tripeltransgenen Mäuse, denen Doxycyclin vor Tag 10,5 *d.p.c.* entzogen wurde, dem selektiven Druck einer Wt1-analogen konstitutiven β -Catenin-Aktivierung durch ein nicht induzierbares Modell zu entziehen. Ein Grund dafür könnte das Problem einer stabilen Expression des tTA sein, die häufiger in transgenen Mäusen festzustellen ist (Berger *et. al.*, 1999). Auch eine Instabilität der mRNA des Transaktivators oder dessen inkorrekte Translation könnte dazu führen, dass ein *lox out* des dritten Exons von *Ctnnb1* ausbleibt (Bockamp *et. al.*, 2002). Des Weiteren könnten Mutationen des tTA-regulierbaren Promotors, der Cre-Rekombinase und der *loxP*-Sequenzen dazu führen, dass eine Deregulation der kanonischen Wnt-Signalkaskade zu einem frühen Zeitpunkt der Schwangerschaft nicht stattfindet, so dass tripeltransgene Tiere, denen Doxycyclin vor der 10,5 *d.p.c.* entzogen wurde, intrauterin nicht resorbiert werden und auch nach sechs Monaten phänotypisch unauffällig sind.

War ein *lox out* des dritten Exons von *Ctnnb1* in tripeltransgenen Tieren möglich, so entwickelten diese Tiere nach sechs Monaten ohne Doxycyclinentzug häufig Granulosazelltumore (siehe Abb. 3.31) und selten polyzystische Nieren (siehe Abb. 3.30). Die gleichen organischen Veränderungen konnten bei doppeltransgenen Tieren des WE2 Wnt1-Modells nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.39 und 3.41), die aus Erhaltungszuchten stammten (siehe Abb. 3.37) und ebenfalls sechs Monate kein Doxycyclin erhalten hatten. Zudem wiesen einige WE2 Wnt1-positive Tiere Veränderungen der Hoden auf (siehe Abb. 3.40). Im Folgenden soll die Entstehung der Veränderungen der Organe durch die Modelle diskutiert werden.

4.2.2.2 Entstehung von polyzystischen Nieren durch eine Wt1 tTA-vermittelte Deregulation der kanonischen Wnt-Signalkaskade

Auf HE-gefärbten Paraffinschnitten war erkennbar, dass sich die Zysten der Nieren von tripel- und doppeltransgenen Tieren wohl aus tubulären Strukturen bilden (siehe Abb. 3.30 und 3.39). Ihre Entstehung schien dabei durch eine Deregulation der kanonischen Wnt-Signalkaskade induziert zu werden, worauf die nukleäre Akkumulation von β -Catenin in den veränderten Strukturen nach IHC-Färbungen hinwies (siehe Abb. 3.32 und 3.42). *Western blot*-Analysen bestätigten dies nur zum Teil (siehe Abb. 3.34 und 3.45), wobei den Ergebnissen der IHC-Färbungen eine stärkere Aussagekraft eingeräumt wird, da durch sie eine Aktivierung des

kanonischen Wnt-Signalwegs direkt in den Zellen veränderter Strukturen nachgewiesen werden kann.

Dass es durch eine Aktivierung von β -Catenin zur Entstehung von murinen polyzystischen Nieren kommen kann, ist bekannt (Saadi-Kheddoui *et al.*, 2001; Qian *et al.*, 2005), wobei der genaue Mechanismus unklar ist. Generell scheint aber die Zystenbildung auf eine fehlregulierte Balance zwischen dem kanonischen- und dem Wnt/PCP (*Planar Cell Polarity*)-Signalweg während der Nephrogenese zurückzuführen zu sein. So steuert der kanonische Wnt-Signalweg normalerweise die Bildung des kondensierten Mesenchyms und induziert die MET dieses Gewebes (Carroll *et al.*, 2005; Schedl, 2007). Nachfolgend wird die kanonische Wnt-Signalkaskade durch Inversin inhibiert und aktiviert den Wnt/PCP-Signalweg (Simons *et al.*, 2005). Dieser steuert die weitere MET und die Reifung des epithelialen Gewebes. Zudem kontrolliert er die Polarität und Bewegung von Zellen (Katoh, 2005), so dass es durch eine Einwanderung von benachbarten tubulären Zellen und einer Teilung entlang einer longitudinalen Achse zum gerichteten Längenwachstum der Tubuli kommt (Lancaster und Gleeson, 2010). Eine Aktivierung von β -Catenin scheint nun die Funktionen des Wnt/PCP-Signalwegs zu beeinflussen. So induziert eine dauerhafte Aktivität der kanonischen Wnt-Signalkaskade in sich differenzierenden epithelialen Zellen eine verstärkte Proliferation und Apoptose (Saadi-Kheddoui *et al.*, 2001). Dies gilt als erster Schritt in der Pathogenese von polyzystischen Nierenerkrankungen (Gabow, 1993; Grantham, 1996). Zudem kommt es zum unkontrollierten Längenwachstum der Tubuli, so dass Zysten entstehen (Gerdes *et al.*, 2007).

Da auch Wt1 während der Nephrogenese u.a. in den sich differenzierten epithelialen Strukturen der renalen Vesikel exprimiert wird (Übersicht: Rivera und Haber, 2005), kann es durch eine Wt1-tTA vermittelte konstitutive β -Catenin-Aktivierung in tripeltransgenen Tieren zur Entstehung von Zysten nach der oben beschriebenen Theorie kommen. Zudem wies die nukleäre Akkumulation von β -Catenin in den tubulären Strukturen der polyzystischen Nieren von WE2 Wnt1-positiven Tieren darauf hin, dass wohl eine Aktivierung von β -Catenin die Differenzierung von renalen epithelialen Zellen zu einem frühen Zeitpunkt hemmt, so dass die Wt1-tTA Expression erhalten bleibt und die Bildung von Zysten begünstigt wird. Generell ist die Annahme der Inhibition der Differenzierung damit zu begründen, dass es durch das WE2 Wnt1-System eigentlich nur in aktuell Wt1-exprimierenden Zellen zur Wt1-tTA vermittelten Aktivierung von β -Catenin kommt. Somit hätte dies in sechs Monate alten WE2 Wnt1-positiven Mäusen nur in den Podozyten der Glomeruli stattfinden sollen, da eine Wt1-Expression ab Tag 19,5 *d.p.c.* auf diese Zellen beschränkt ist (Armstrong *et al.*, 1993).

Dass die Systeme einen Effekt auf die Glomeruli haben, konnte anhand der veränderten Morphologie und einer Flüssigkeitsansammlung in diesen Strukturen von doppel- und

tripeltransgenen Mäusen beobachtet werden (siehe Abb. 3.30 und 3.39). Diese Veränderungen könnten auf β -Catenin zurückzuführen sein, da eine Aktivierung dieses Proteins die Funktion der Podozyten stark beeinträchtigt (Dai *et. al.*, 2009, Wang *et. al.*, 2011). So stimuliert aktiviertes β -Catenin u.a. die Expression von MMP-7 (*Matrix Metalloproteinase-7*) und MMP-9 (Wang *et. al.*, 2011), die eine wichtige Rolle in der Degradation extrazellulärer Matrix spielen und somit die Umstrukturierung von Geweben steuern (Brabletz *et. al.*, 1999). Zudem kommt es durch eine Aktivierung von β -Catenin zur Inhibition von Nephtrin (Dai *et. al.*, 2009), das in Podozyten für den Erhalt der molekulare Barriere von Bedeutung ist (Wagner *et. al.*, 2004). Doch eine nukleäre Akkumulation des Proteins konnte in den veränderten Glomeruli durch immunhistochemische Färbungen nicht nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.32 und 3.42), so dass fraglich ist, ob die beobachteten Effekte auf die Aktivierung von β -Catenin zurückzuführen sind. Vielleicht induziert das Protein aber auch die Apoptose von Podozyten, so dass sie nicht mehr nachweisbar sind, jedoch vor ihrem Untergang die beschriebenen Effekte in den Glomeruli bewirken.

Generell hätte es in doppel- und tripeltransgenen Tieren eigentlich nur zu den beschriebenen Veränderungen in den Glomeruli und nicht zur Entwicklung von zystischen Nieren tubulären Ursprungs kommen sollen. Dies ist damit zu begründen, dass die meisten Tiere Doxycyclin bis zur dritten Lebenswoche erhalten hatten, so dass eine Wt1-tTA vermittelte Stabilisierung von β -Catenin nur in den Podozyten möglich gewesen wäre. Somit weisen die Ergebnisse darauf hin, dass die Menge an gegebenem Doxycyclin nicht ausreichte, um die Entstehung der Zysten durch eine Wt1-tTA vermittelte Aktivierung von β -Catenin zu verhindern. Demzufolge kann spekuliert werden, dass die Durchlässigkeit der Systeme es eigentlich auch ermöglicht hätte, dass es zu einer Wt1-vermittelten Akkumulation von β -Catenin im metanephrischen Mesenchym kommt, die zum Verbleib und der erhöhten Proliferation von pluripotenter Vorläuferzellen des metanephrischen Mesenchyms führt und nachfolgend die Entstehung eines triphasischen Wilms-Tumors begünstigt. Da dies nicht der Fall ist, lassen die Ergebnisse die Schlussfolgerung zu, dass eine β -Catenin-Aktivierung wahrscheinlich nicht der physiologisch entscheidende Schritt bei der Entstehung eines Wilms-Tumors ist und sie erst zu einem späteren Zeitpunkt während der Tumorgenese dieser Erkrankung eine Rolle zu spielen scheint.

Generell bestätigen diese Ergebnisse die Erkenntnisse, die durch Untersuchungen an humanem Wilms-Tumorgewebe gewonnen wurden. So konnten Fukuzawa und Kollegen zeigen, dass keine *CTNNB1*-Mutationen in nephrogenen Resten zu identifizieren sind, so dass eine Aktivierung der kanonischen Wnt-Signalkaskade wohl nicht zur Induktion der Wilms-Tumorgenese führt (Fukuzawa *et. al.*, 2007; Fukuzawa *et. al.*, 2008). Zudem ist anhand der nukleären Akkumulation von β -Catenin in den blastemalen und mesenchymalen Kompartimenten des Tumors erkennbar, dass eine aktivierende Mutation von *CTNNB1* erst zu einem späteren Zeitpunkt auftritt (Koesters

et. al., 2003; Li *et. al.*, 2004; Zirn *et. al.*, 2006; Fukuzawa *et. al.*, 2008). Diese Annahme wird auch durch den nukleären Nachweis von β -Catenin in Rhabdomyoblasten unterstützt (Fukuzawa *et. al.*, 2007).

Widersprüchlich zur Theorie, dass eine aktivierende *CTNNB1*-Mutation nicht der physiologisch entscheidende Schritt bei der Entstehung eines Wilms-Tumors ist, existieren humane Tumore mit alleiniger *WTX*-Mutation (Rivera *et. al.*, 2007; Perotti *et. al.*, 2008; Ruteshouser *et. al.*, 2008; Wegert *et. al.*, 2009). *WTX* ist ein Tumorsuppressor, der auf Chromosom Xq11.1 liegt und den Abbau von β -Catenin durch eine direkte Interaktion mit diesem Protein oder durch Bindung an den β -Catenin-Degradationskomplex induziert (Major *et. al.*, 2007; Rivera *et. al.*, 2007). Demzufolge könnten *WTX*-Mutationen zur Aktivierung von β -Catenin führen und die Wilms-Tumorgenese induzieren. Ob dies der Fall ist, wird in der Literatur kontrovers diskutiert. So konnten Wegert und Kollegen anhand von DNA- und RNA-Analysen von Wilms-Tumoren zeigen, dass ein Verlust von *WTX* wohl nicht essentiell für die Induktion dieser Tumorerkrankung ist (Wegert *et. al.*, 2009). Dagegen wiesen Fukuzawa und Kollegen Mutationen dieses Gens zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Wilms-Tumorgenese nach, wobei die Untersuchungen nur an vier Wilms-Tumorproben durchgeführt wurden und lediglich in einer Probe eine *WTX*-Mutation in nephrogenen Resten detektiert werden konnte (Fukuzawa *et. al.*, 2010). Die Entstehung von nephrogenen Resten durch *WTX*-Mutationen könnte dadurch erklärt werden, dass *WTX* im Nukleus mit *WT1* interagiert und die transkriptionelle Aktivität dieses Proteins positiv beeinflusst (Rivera *et. al.*, 2009). Zusammen mit der Tatsache, dass *WT1* und *WTX* während der Nephrogenese zur gleichen Zeit in denselben Gewebestrukturen exprimiert wird (Rivera *et. al.*, 2007), lässt die Vermutung zu, dass eine *WTX*-Mutation die Entstehung von nephrogenen Resten durch eine eingeschränkte transkriptionelle Funktion von *WT1* fördert und es nachfolgend zur Deregulation der kanonischen Wnt-Signalkaskade kommt, so dass ein triphasischer Wilms-Tumor entsteht. Treten *WTX*-Mutationen erst zu einem späteren Zeitpunkt der Wilms-Tumorgenese auf, könnten sie einen ähnlichen Effekt wie aktivierende Mutationen von *CTNNB1* haben und die Entwicklung von triphasischen Wilms-Tumoren aus nephrogenen Resten induzieren.

Generell ist fraglich, ob in Mäusen überhaupt ein Wilms-Tumor generiert werden kann und die aus den Untersuchungen der humanen Wilms-Tumorgewebe gewonnenen Erkenntnisse auf diese Tiere übertragbar sind, da bisher keine nephrogenen Reste in murinen Nieren beobachtet werden konnten. Dies ist dabei wohl nicht auf einen unterschiedlichen Ablauf der Nephrogenese zwischen Maus und Mensch zurückzuführen, da dieser identisch ist (Drews, 1993; Kaufman, 1994). Vielmehr ist in der Maus die Anzahl an metanephrischen Zellen viel kleiner als im Menschen und somit die Wahrscheinlichkeit der Entwicklung nephrogener Resten statistisch

sehr gering (Hu *et. al.*, 2011). Zudem könnte auch die im Vergleich zum Menschen sehr kurze Dauer der murinen Nephrogenese eine Rolle spielen, so dass das zeitliche Fenster z.B. für das Auftreten einer homozygoten Mutation von *Wt1* sehr klein ist, die zur Entstehung von nephrogenen Resten führt. Das aber trotzdem die Generierung eines Wilms-Tumorsmodell möglich ist, konnten Hu und Kollegen zeigen. In diesem Modell wurde schwangeren Mäusen an Tag 11,5 *d.p.c.* 1 mg Tamoxifen pro 40 g Körpergewicht injiziert, so dass die embryonale Expression einer Cre-Rekombinase induziert wurde, die nachfolgend in einzelnen Zellen des metanephrischen Mesenchyms zum homozygoten *Wt1*-Verlust führte. Zusätzlich war in das Genom dieser Embryonen ein *H19*⁻ Allel integriert, so dass es in den *Wt1*-defizienten Zellen zur Expression des normalerweise inaktiven, maternalen *Igf2* (*Insulin growth factor 2*)-Allels kommt (Hu *et. al.*, 2011). Das System simulierte somit genetische Veränderungen, die in einer Gruppe von humanen Wilms-Tumoren auftreten (Haruta *et. al.*, 2008). Nachfolgend entwickelten diese Mäuse triphasische Wilms-Tumore, die histologisch denen von Menschen entsprachen. Generell scheint dabei der Verlust von *Wt1* die Differenzierung des metanephrischen Mesenchyms zu blocken und eine Überexpression von *Igf2* die Tumorgenese eines Wilms-Tumors durch die Aktivierung von *ERK1/2* (*Extracellular signal-regulated Kinase 1/2*) zu induzieren, die auch in vielen humanen Wilms-Tumoren beobachtet werden kann (Hu *et. al.*, 2011). Somit zeigt dieses Modell, dass die Induktion eines triphasischen Wilms-Tumors in der Maus auch ohne Nachweis von nephrogenen Resten möglich ist.

Auch durch das Tiermodell von Ehrlich und Kollegen kann dies bestätigt werden. So entwickeln Ratten nach der Gabe von N-Ethylnitrosourea (ENU) triphasische Wilms-Tumore, deren Entstehung wohl auf die nukleäre Akkumulation von β -Catenin in den blastemalen und mesenchymalen Kompartimenten zurückzuführen ist (Ehrlich *et. al.*, 2010). Somit widersprechen die Ergebnisse dieses Modells der Annahme, dass es durch eine alleinige β -Catenin-Aktivierung nicht zur Entstehung dieser Erkrankung kommt. Doch es ist bei diesem Modell kritisch zu betrachten, dass die verwendete *Noble*-Rattenlinie prädisponiert für die spontane Entstehung von Wilms-Tumoren ist und die Tumorgenese erst an Tag 17 *d.p.c.* induziert wurde. Zusammen mit der Tatsache, dass die Schwangerschaft einer Ratte, genauso wie die der Maus, ungefähr 21 Tage dauert und die Differenzierung des Metanephrons ab Tag 16,5 *d.p.c.* weitestgehend abgeschlossen ist, lässt vermuten, dass in diesen Ratten Zellen existieren, die dem Differenzierungsstatus von nephrogenen Resten ähneln und somit suszeptibel für die β -Catenin gesteuerte Tumorgenese des Wilms-Tumors sind.

Wie Ehrlich und Hu zeigen konnten, kann durch Tiermodelle die Entstehung eines triphasischen Wilms-Tumor simuliert werden. Somit hätte dies auch durch die Modelle WE2 Wnt1, WE2 LC bCat Δ Ex3 und WE2 TC bCat Δ Ex3 möglich sein können, da zum einen wohl die gegebenen

Doxycyclinmenge nicht ausreichte, um die Aktivität der Systeme zum Zeitpunkt der Differenzierung des metanephrischen Mesenchyms zu hemmen und zum anderen die Modelle induzierbar waren, wie am nukleären Nachweis von β -Catenin in den Epithelien der Zysten zu erkennen war. Voraussetzung dafür scheinen allerdings Zellen zu sein, die dem Differenzierungsstatus von nephrogenen Resten besitzen. Eine alleinige β -Catenin-Aktivierung in Wt1-exprimierenden Zellen des metanephrischen Mesenchyms kann dies wohl nicht induzieren, wie anhand der vorliegenden Ergebnisse erkennbar ist.

4.2.2.3 Die Wt1 tTA-vermittelte Deregulation der kanonischen Wnt-Signalkaskade induziert die Tumorgenese eines Granulosazelltumors

Dass es sich bei den veränderten Ovarien der drei Modelle um Granulosazelltumore handelt, war auf den HE-gefärbten Paraffinschnitten dieser Organe anhand der zystischen Strukturen, Ansammlungen von strukturell unorganisierten pleomorphen Granulosa-Zellen und dem Vorhandensein von Osteoblasten bei fortschreitender Tumorgenese erkennbar (siehe Abb. 3.31 und 3.41), die auch in einem murinen Tumormodell dieser Erkrankung von Boerboom und Kollegen nachweisbar waren (Boerboom *et. al.*, 2005). Wie in diesem Modell scheint die Tumorgenese dieser Erkrankung in den tripeltransgenen bzw. doppeltransgenen Tieren auf eine Deregulation der kanonischen Wnt-Signalkaskade zurückzuführen zu sein (Boerboom *et. al.*, 2005). Dies kann anhand der IHC-Färbungen und *Western blot*-Analysen der veränderten tripeltransgenen bzw. doppeltransgenen Ovarien bewiesen werden, in denen eine nukleäre Akkumulation von β -Catenin in den veränderten Strukturen (siehe Abb. 3.33 und 3.44) und eine Überexpression von β -Catenin-Zielgenen nachweisbar waren (siehe Abb. 3.35 und 3.45). Die Entstehung eines Granulosazelltumors durch eine Wt1 tTA-vermittelte Aktivierung von β -Catenin ist bisher in der Literatur noch nicht beschrieben. Daher soll im Folgenden erläutert werden, wie es durch die Deregulation der kanonischen Wnt-Signalkaskade zur Entstehung dieser Tumorerkrankung kommt und ob dies durch eine Wt1 tTA-analoge Aktivierung von β -Catenin in den tripeltransgenen bzw. doppeltransgenen Tieren der Modelle möglich ist.

Als Grund dieser Tumorerkrankung gilt der fehlgeleitete Prozess der primären Follikelentstehung während der prä- und perinatalen Entwicklung des Ovars (Boerboom *et. al.*, 2006). Im Normalfall entwickeln sich diese durch die Proliferation und Differenzierung von ovarialen somatischen Stammzellen zu Vorläuferzellen von Granulosa-Zellen. Diese differenzieren zu Granulosa-Zellen und bilden im Anschluss zusammen mit Oozyten die primären Follikel (Pepling *et. al.*, 2001). Eine Deregulation der kanonischen Wnt-Signalkaskade in den ovarialen somatischen Stammzellen bzw. den Vorläuferzellen der Granulosa-Zellen scheint, wie in vielen Stammzellen und Vorläuferzellen anderer Gewebe (Merill *et. al.*, 2001,

Miyoshi *et. al.*, 2002; Niemann *et. al.*, 2002; Bierie *et. al.*, 2003; Okubo *et. al.*, 2004), das Schicksal dieser Zellen zu verändern, so dass Ansammlung von strukturell unorganisierten pleomorphen Granulosa-Zellen entstehen, die als Ursprung des Granulosazelltumors gelten (Boerboom *et. al.*, 2006). Aus diesen Zellen entsteht nachfolgend ein Granulosazelltumor und durch die Expression von Knochenmarkergenen, wie z.B. *Ibsp* (*Integrin-binding sialoprotein*), *Cdkn1c* (*Cyclin-dependent kinase inhibitor 1c*), *Bmp4* (*Bone morphogenetic protein 4*) und *Tnfrsf11b* (*Tumor necrosis factor receptor superfamily member 11b*) kommt es zur Transformation dieser Zellen zu Osteoblasten und Osteozyten (Boerboom *et. al.*, 2005, Boerboom *et. al.*, 2006). Dieser Prozess wird als Metaplasie bezeichnet und kann bei einer Vielzahl von Tumorerkrankungen beobachtet werden (Byard *et. al.*, 1988; Haque *et. al.*, 1996; Flejou *et. al.*, 2005).

Generell ist die zuvor beschriebene Entstehung eines Granulosazelltumors durch eine Wt1 tTA-analoge Aktivierung von β -Catenin durchaus vorstellbar. Dies ist damit zu begründen, dass Wt1 nicht nur in den Gonadenanlagen (Armstrong *et. al.*, 1992; Rackley *et. al.*, 1993), sondern auch während der gesamten Differenzierung von Granulosa-Zellen exprimiert wird (Mundlos *et. al.*, 1993). Somit kann es während der prä- und perinatalen Entwicklung von primären Follikeln in den tripeltransgenen bzw. doppeltransgenen Tieren der Modelle zur Aktivierung von β -Catenin in den Wt1 tTA-exprimierenden Vorläuferzellen von Granulosa-Zellen kommen und ein Granulosazelltumor nach dem oben beschriebenen Prozess entstehen. Verwunderlich ist die Tatsache, dass die meisten tripel- und doppeltransgenen Tiere, in denen es zu einer Entwicklung eines Granulosazelltumors kommt, Doxycyclin bis zur dritten Lebenswoche erhalten hatten. Somit hätte es eigentlich nicht zur Entstehung von Granulosazelltumoren kommen können, da dessen Tumorgenese, wie oben beschrieben, während der prä- und perinatalen Entwicklung von primären Follikeln eingeleitet wird und eine Wt1 tTA-vermittelte Aktivierung von β -Catenin in den tripel- bzw. doppeltransgenen Tieren zu diesem Zeitpunkt durch die Gabe von Doxycyclin nicht hätte stattfinden dürfen. Dies weist darauf hin, dass wohl in vielen Tieren die über das Trinkwasser aufgenommene Menge von Doxycyclin nicht ausreichte, um eine Aktivierung von β -Catenin zu verhindern, so dass Granulosazelltumore entstehen.

Des Weiteren war auffällig, dass die Tumorgenese der Granulosazelltumore in den WE2 Wnt1-positiven Tieren, nach einem sechsmonatigen Doxycyclinentzug wesentlich langsamer voranschritt, als in den tripeltransgenen Tieren der Modelle WE2 TC bCat Δ Ex3 und WE2 LC bCat Δ Ex3 (siehe Abb. 3.28 und 3.38). Dagegen war ein Unterschied bei der Inzidenz dieser Tumorerkrankung zwischen den Modellen WE2 Wnt1 (39,3 %, n = 11 von 28; siehe Tabelle 3.5) und WE2 TC bCat Δ Ex3/WE2 LC bCat Δ Ex3 (50,0 %, n = 21 von 42; siehe Tabelle 3.2 und 3.3) kaum feststellbar. Der beobachtete Effekt könnte auf eine unterschiedliche Aktivität der

kanonischen Wnt-Signalkaskade durch die verschiedenen Modelle zurückzuführen sein. So konnten Li und Kollegen zeigen, dass verschiedene *Apc* (*Adenomatous polyposis coli*)-Mutationen in Mäusen eine unterschiedliche Aktivierung der kanonischen Wnt-Signalkaskade zur Folge haben und somit den Ausbruch und die Stärke der familiären adenomatösen Polyposis beeinflussen (Li *et. al.*, 2005). Dieser Dosisseffekt konnte auch von anderen Arbeitsgruppen in ähnlichen Versuchen bei verschiedenen Entwicklungsprozessen und der Tumorgenese des Darms und der Leber bestätigt werden (Übersicht: Gaspar und Fodde, 2004; Buchert *et. al.*, 2010). Daraus kann man schlussfolgern, dass wohl verschiedene Schwellenwerte der Aktivität der kanonischen Wnt-Signalkaskade überschritten werden müssen, um zum einen die Tumorgenese zu induzieren und zum anderen diese zu beschleunigen. Im Bezug auf die Granulosazelltumore und die verschiedenen auslösenden Systeme bedeutet dies, dass sowohl eine β -Catenin-Aktivierung durch eine Wnt1-Stimulation des WE2 Wnt1-Modells, als auch eine aktivierende *Ctnnb1*-Mutation durch die Modelle WE2 TC bCat Δ Ex3 und WE2 LC bCat Δ Ex3 ausreichen, um die Tumorgenese eines Granulosazelltumors zu induzieren. Trotzdem kann nur durch eine Deletion des dritten Exons von *Ctnnb1* die kanonische Wnt-Signalkaskade so stark aktiviert werden, dass der Schweregrad der Tumorerkrankung zunimmt.

Generell stellen die Modelle WE TC bCat Δ Ex3, WE2 LC bCat Δ Ex3 und WE2 Wnt1 somit eine gute Möglichkeit dar, um die Tumorgenese des Granulosazelltumors genauer zu untersuchen. Zudem ergänzen sie das bereits beschriebene murine Granulosazelltumor-Modell von Boerboom und Kollegen und belegen die Induzierbarkeit der verschiedenen Systeme.

4.2.2.4 WE2 Wnt1-positive Männchen entwickeln fehlgebildete Hoden

Die veränderten Hoden von WE2 Wnt1-positiven Mäusen waren im Vergleich zu denen von wildtypischen Tieren wesentlich kleiner (siehe Abb. 3.38). Zudem konnten auf HE-gefärbten Paraffinschnitten dieser veränderten Organe eine Degeneration des Aufbaus der Hodenkanälchen, ein Verlust von Keimzellen und ein vergrößertes Interstitium nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.40), die auch in einem Tiermodell beobachtet werden konnten, in denen es vermittelt über die Expression von *Amhr2* (*Anti-mullerian hormone receptor type II*) während der späten prä- und frühen postnatalen Phase zur Aktivierung von β -Catenin in den sich differenzierenden Sertoli-Zellen kommt (Boyer *et. al.*, 2008; Tanwar *et. al.*, 2010; Richards *et. al.*, 2011). In diesen Tieren scheint die Deregulation der kanonischen Wnt-Signalkaskade die Differenzierung dieser Zellen zu hemmen, was nachfolgend ab der zweiten Lebenswoche der Mäuse zur Degeneration der Hodenkanälchen führt. Dies hängt damit zusammen, dass unreife Sertoli-Zellen zwar das Überleben und die Proliferation von Keimzellen gewährleisten, doch

deren Differenzierung unterbunden wird (Tanwar *et. al.*, 2010). Nachfolgend führt dies zur Apoptose dieser Zellen (Knudson *et. al.*, 1995; Meng *et. al.*, 2000; Shetty *et. al.*, 2008) und der natürliche Aufbau eines Hodenkanälchens ist nicht mehr möglich.

Im Bezug auf die veränderten Hoden von WE2 Wnt1-Mäusen bedeutet dies, dass ähnliche Prozesse für die Veränderung dieser Organe verantwortlich sein könnten. Dies ist durchaus möglich, da Wt1 u.a. ab Tag 12,5 *d.p.c.* in den sich differenzierten Sertoli-Zellen der entstehenden Gonaden exprimiert wird und dessen Expression in reifen Sertoli-Zellen bis ins adulte Tier erhalten bleibt (Pelletier *et. al.*, 1991 c; Armstrong *et. al.*, 1992; Rackley *et. al.*, 1993). Somit könnte es in WE2 Wnt1-positiven Mäusen durch das WE2-Transgen zur Wt1 tTA-vermittelten Deregulation der kanonischen Wnt-Signalkaskade in unreifen Sertoli-Zellen kommen, so dass deren Differenzierung gehemmt und eine Veränderung der Hoden eingeleitet wird. Dass dies tatsächlich der Fall ist, kann daran erkannt werden, dass nach IHC-Färbungen nukleäres β -Catenin in den Sertoli-Zellen der degenerierten Hodenkanälchen nachweisbar war (siehe Ergebnisse 3.43). Zudem konnte durch *Western blot*-Analysen eine erhöhte Aktivierung der kanonischen Wnt-Signalkaskade nachgewiesen werden, wobei die Veränderungen der Hoden wohl nicht auf eine erhöhte Expression von Cyclin D1 und c-myc zurückzuführen sind (siehe Abb. 3.45). Um besser nachweisen zu können, dass unreife Sertoli-Zellen für die Veränderung WE2 Wnt1-positiven Hoden verantwortlich sind, könnten Immunfluoreszenz-Analysen durchgeführt werden, in denen die Expression von AMH (*Anti-Mullerian Hormon*) und GDNF (*Glial cell-derived neurotrophic factor*) untersucht wird. Während AMH ein typischer Marker für unreife Sertoli-Zellen ist (Münsterberg *et. al.*, 1991), wird GDNF von unreifen Sertoli-Zellen abgesondert, so dass die Proliferation von Keimzellen gefördert und deren Differenzierung gestoppt wird (Meng *et. al.*, 2000). Zudem ist GDNF ein direktes Zielgen von β -Catenin (Tanwar *et. al.*, 2010).

Die Hyperplasie des Interstitiums ist wohl nicht auf eine Wt1 tTA-vermittelte Aktivierung von β -Catenin in einigen Leydig-Zellen von veränderten Hoden zurückzuführen (siehe Ergebnisse 3.4.3). Ähnlich wie im Tiermodell von Tanwar und Kollegen, in dem es durch die Expression von Amhr2 zur Aktivierung von β -Catenin in Leydig-Zellen kommt, scheint die Deregulation der kanonischen Wnt-Signalkaskade keine Defekte in diesem Zelltyp zu verursachen. Vielmehr ist die vermeintliche Zunahme von Leydig-Zellen nur auf ein verkleinertes Volumen des Hodens zurückzuführen (Tanwar *et. al.*, 2010). Die gleichen Beobachtungen konnten auch in anderen Tiermodellen gemacht werden (Meng *et. al.*, 2000; Papaioannou *et. al.*, 2009).

Im Allgemeinen hätten sich die Veränderungen der Hoden, ähnlich wie das Auftreten von polyzystischen Nieren und Granulosazelltumoren, gar nicht entwickeln dürfen. Dies ist wiederum mit der Länge der Doxycyclingabe zu begründen, da die Tiere in denen Veränderung der Hoden

auftraten bis zur dritten Lebenswoche das Tetrazyklin erhalten hatten. Normalerweise ist zu diesem Zeitpunkt der Aktivierung des Systems die Differenzierung der Sertoli-Zellen abgeschlossen, was an der Expression von AMH und GDNF erkennbar ist, die kurz nach der Geburt in Sertoli-Zellen kaum mehr nachweisbar sind (Teixeira *et. al.*, 2001; Tanwar *et. al.*, 2010). Somit hätte in den WE2 Wnt1-positiven Hoden eine Wt1 tTA-vermittelte Deregulation der kanonischen Wnt-Signalkaskade nur in differenzierten Sertoli-Zellen stattfinden dürfen. Dies scheint allerdings keinen Effekt zu haben, da in Hoden von WE2 TC bCat Δ Ex3- bzw. WE2 LC bCat Δ Ex3-positiven Tieren, die bis zur dritten Lebenswoche Doxycyclin erhalten hatten und in denen ein *lox-out* des dritten Exons von *Ctnnb1* nachweisbar war, keine Veränderungen der Hoden aufwiesen. Somit scheint in den veränderten Hoden von WE2 Wnt1-positiven Tieren die Menge von Doxycyclin nicht auszureichen, um die Aktivität des Systems während der Differenzierung der Sertoli-Zellen zu hemmen, so dass es zur Deregulation der kanonischen Wnt-Signalkaskade in unreifen Sertoli-Zellen kommt und eine wie oben beschriebene Fehlbildung der Hoden eingeleitet wird.

Insgesamt kann nach der Analyse aller Modelle festgehalten werden, dass es durch kein System möglich war, die Entstehung eines Wilms-Tumors zu simulieren. Doch die Analysen der Modelle WE2 Wnt1, WE2 TC bCat Δ Ex3 und WE2 LC bCat Δ Ex3 wiesen darauf hin, dass eine aktivierende *CTNNB1*-Mutation wahrscheinlich nicht der physiologisch entscheidende Schritt in der Wilms-Tumorgenese ist. Zudem konnte gezeigt werden, dass eine Wt1-tTA induzierte konstitutive β -Catenin-Aktivierung zu einem frühen Zeitpunkt der Schwangerschaft nicht mit dem Überleben vereinbar ist, wobei der Grund unerkannt bleibt, doch die Letalität auf Herzfehlbildungen zurückzuführen sein könnte. Außerdem inhibiert bzw. beeinflusst eine Aktivierung von β -Catenin, die durch eine nicht ausreichende Doxycyclinmenge zwischen der späten prä- und frühen postnatalen Phase in Wt1-tTA exprimierenden Zellen induziert wurde, die Differenzierung von Wt1-positiven Zellen, so dass sich Granulosazelltumore, polyzystische Niere und Veränderungen der Hoden entwickeln (siehe Abb. 4.2). Die Systeme stellen somit Tiermodelle zu den jeweiligen Erkrankungen dar, die es in Zukunft ermöglichen, deren Entwicklung genauer zu untersuchen. Reicht die Doxycyclinmenge aus, um die Systeme bis zum Absetzen der Jungtiere oder auch länger zu inhibieren, so entwickelte sich kein Phänotyp, wobei Veränderungen auch im adulten Gewebe durch zurückbleibende Wt1-exprimierende pluripotente Zellen, wie im Fall der Wilms-Tumorgenese, nicht auszuschließen sind. Generell waren die Systeme nicht immer induzierbar.

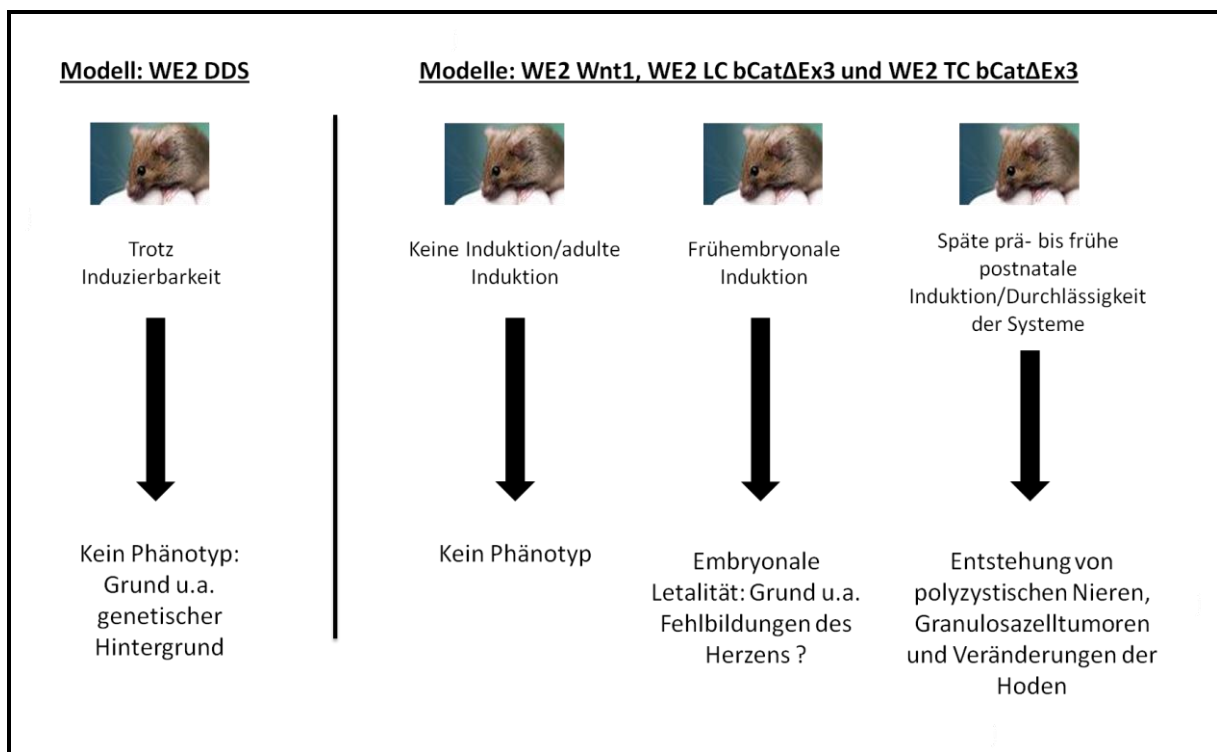


Abbildung 4.2: Effekte der „Wilms-Tumor-Modelle“

Die Abbildung zeigt die Effekte der hergestellten und charakterisierten „Wilms-Tumor-Modelle“. Dabei konnte bei dem Versuch einer Simulation eines DDS trotz Induzierbarkeit kein Phänotyp beobachtet werden (linke Seite/WE2 DDS-Modell). Kam es dagegen in Mäusen zur *Wt1*-analogen β -Catenin-Aktivierung, so war es abhängig von der Induzierbarkeit und dem Zeitpunkt der Aktivierung der Systeme, ob dies embryonal letal ist oder in adulten Tieren polyzystische Nieren, Granulosazelltumore oder Veränderungen der Hoden entstehen (rechte Seite/ WE2 TC *bCatΔEx3*-, WE2 LC *bCatΔEx3*-, WE2 *Wnt1*-Modell). Durch kein Modell konnte eine Wilms-Tumorerkrankung simuliert werden.

4.3 Analyse *Wt1*-exprimierender Zellen der AGM-Region

Bei der Charakterisierung der WE2-Effektor-Mauslinie war aufgefallen, dass *Wt1* in der AGM-Region im Endothel und dem darunterliegenden Mesenchym des mittleren und ventralen Teils der dorsalen Aorta exprimiert wird (siehe Abb. 3.7 und 3.9). Gerade das Endothel (mittlerer und ventraler Bereich) gilt als Entstehungsort von hämatopoetischen Stammzellen, die in das Lumen der dorsalen Aorta freigesetzt werden (Boisset *et. al.*, 2010; Yokomizo und Dziernak, 2010; Rybtsov *et. al.*, 2011), so dass vermutet wurde, dass *Wt1* eine Rolle bei der Bildung dieser Zellen spielt. Während die zur Charakterisierung der *Wt1*-exprimierenden Zellen durchgeführten Immunfluoreszenz-Versuche, die direkte Beteiligung von *Wt1* an der Entstehung von hämatopoetischen Stammzellen zeigten (siehe Kap. 3.3.1), wurde dies nur bedingt durch Durchflusszytometrie-Versuche bestätigt (siehe Kap. 3.3.2). Doch zusätzlich durchgeführte Transplantationsversuche und hämatopoetische Stammzellassays belegten (siehe Kap. 3.3.3 und 3.3.4), dass embryonale *Wt1*-exprimierende Zellen (Tag 11,5 *d.p.c.*) hämatopoetische

Stammzell-Eigenschaften besitzen, so dass dieser Transkriptionsfaktor wohl tatsächlich eine Funktion während der frühen Hämatopoese ausübt. Dieser Aspekt soll im Folgenden diskutiert werden.

4.3.1 Die Rolle von Wt1 während der frühen Hämatopoese

Um die Rolle von Wt1 während der frühen Hämatopoese zu analysieren, sollten zunächst die embryonalen Wt1-positiven Zellen (Tag 11,5 *d.p.c.*) der AGM-Region charakterisiert werden. Dazu wurden Immunfluoreszenz-Versuche auf Kryo- bzw. Paraffinschnitten von WE2 EZ-positiven Embryonen durchgeführt. Somit waren alle aktuell Wt1-exprimierenden Zellen durch den Nachweis von EGFP erkennbar und eine Analyse der Koexpression mit verschiedenen Markern möglich, die bei der Entstehung von hämatopoetischen Stammzellen eine Rolle spielen. Generell konnte dabei im Endothel des mittleren und ventralen Bereichs der dorsalen Aorta eine Koexpression von Wt1 mit endothelialen Markern (CD31, CD144, CD309) nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.46), welche bei der Bildung und Freisetzung von hämatopoetischen Stammzellen aus dem Endothel ins Lumen der dorsalen Aorta von Bedeutung sind (Übersicht: Yokomizo und Dzierzak, 2010, Medvinsky *et. al.*, 2011). Auch ein gemeinsamer Nachweis mit hämatopoetischen Stammzellmarkern (*c-kit*) und Genen, die für die Differenzierung dieser Zellen wichtig sind (*Runx1*, *CD49d*) (Sanchez *et. al.*, 1996; Arroyo *et. al.*, 1999; North *et. al.*, 2002), war möglich (siehe Abb. 3.47). Zudem konnte die direkte Beteiligung von Wt1 an der Freisetzung von prä-hämatopoetischen Stammzellen des Typs I ($CD144^+ CD41^+ CD45^-$) und II ($CD144^+ CD41^+ CD45^+$) gezeigt werden (Übersicht: Rybtsov *et. al.*, 2011), wobei die Wt1-Expression in diesen Zellen auch noch in der Leber nachweisbar war (siehe Abb. 3.48). Wt1 scheint somit eine Rolle bei der Entstehung von hämatopoetischen Stammzellen zu spielen.

Im Allgemeinen ähnelt dieser Prozess einer EMT, da differenzierte epitheliale Zellen der dorsalen Aorta zu undifferenzierten hämatopoetischen Stammzellen werden, um sich anschließend in das Lumen dieses Gefäßes abzuschnüren. In diesem Zusammenhang muss es zur Lösung des Zell-Zell-Kontakts, zum Umbau des Zellskeletts und zur Veränderung der epitheltypischen Zellpolarität kommen, so dass sich nicht nur der Zellphänotyp ändert, sondern auch eine Bewegung von Zellen möglich ist (Übersicht: Hugo *et. al.*, 2007). Da Wt1 in vielen Entwicklungsprozessen eine EMT steuert (Wilm *et. al.*, 2005; Que *et. al.*, 2008; Zhou *et. al.*, 2008), könnte es durchaus sein, dass dieser Transkriptionsfaktor auch bei der Entstehung von hämatopoetischen Stammzellen diese Funktion übernimmt. Als möglicher Regulationsmechanismus wäre eine Inhibition von E-Cadherin und eine Überexpression von *Snai1* denkbar, die durch Wt1 bei der EMT des Epikards induziert wird (Martinez-Estrada *et. al.*, 2010). Gerade *Snai*-Proteine (*Snai1* und *Snai2*) sind ausschlaggebend für die Einleitung einer

EMT, da durch sie, genau wie durch Wt1, die Expression des Epithelzellmarkers E-Cadherin gehemmt wird (Battle *et. al.*, 2000; Bolos *et. al.*, 2003), der bedeutend für den Erhalt des Zell-Zell-Kontakts ist (Nollet *et. al.*, 1996) und dessen Verlust die weiteren Prozesse einer EMT einleitet (Übersicht: Hugo *et. al.*, 2007).

Ein weiterer Mechanismus durch den Wt1 eine EMT steuert und ebenfalls an der Entstehung von hämatopoetischen Stammzellen beteiligt sein könnte, wurde von von Gise und Kollegen entschlüsselt. In ihren Tiermodell konnten sie nachweisen, dass Wt1 über β -Catenin, Wnt5a und Raldh2 (*Retinaldehyde dehydrogenase 2*) die EMT des Epikards steuert und widersprachen den Regulationsmechanismus der Wt1-vermittelten epikardialen EMT von Martinez-Estrada und Kollegen (von Gise *et. al.*, 2011). Der Transkriptionsfaktor β -Catenin könnte dabei Snai2 aktivieren und somit die EMT einleiten (Vallin *et. al.*, 2001). Zudem ist Wnt5a ein Stimulator des Wnt/PCP-Signalwegs, der die Zellpolarität und -bewegung reguliert und somit einen positiven Einfluss auf eine EMT hat (Katoh, 2005). Welcher Mechanismus nun die Entstehung von hämatopoetischen Stammzellen steuern könnte, bleibt unklar, doch sprechen erst kürzlich veröffentlichte Daten dafür, dass der zuletzt beschriebene Mechanismus, die Bildung dieser Zellen fördert, da β -Catenin im Endothel der dorsalen Aorta exprimiert wird und an der Entstehung von hämatopoetischen Stammzellen beteiligt ist (Ruiz-Herguido *et. al.*, 2012). In Zukunft durchzuführende Koexpressionsanalysen von Wt1 mit β -Catenin, Wnt5a und Raldh2 sollten Aufschluss darüber geben, ob Wt1 wirklich u.a. durch die Stimulation von β -Catenin den EMT-ähnlichen Prozess der Entstehung von hämatopoetischen Stammzellen reguliert.

Sind die Wt1-positiven prä-hämatopoetischen Stammzellen des Typs I und II einmal ins Lumen der dorsalen Aorta abgegeben, so scheinen sie entsprechend des normalen Ablauf der Hämatopoese mit dem Blutstrom in die sich bildende Leber zu gelangen und diese zu besiedeln (siehe Abb. 3.48) (Dzierzak und Speck, 2008). Ähnlich wie in embryonalen und adulten Wt1-positiven hämatopoetischen Vorläuferzellen ($CD34^+ CD38^-$ bzw. $CD34^+ CD38^+$) könnte Wt1 dabei einen proliferativen, anti-apoptotischen und differenzierenden Effekt auf die prä-hämatopoetischen Stammzellen haben (Ellisen *et. al.*, 2001; Ariyaratana und Loeb, 2007). Wichtige Wt1-Zielgene, die in diesem Zusammenhang eine Rolle spielen könnten, sind Bcl-2, c-myc und Cyclin E (Ariyaratana und Loeb, 2007), deren Koexpression mit Wt1 in prä-hämatopoetischen Stammzellen des Typs I und II in Zukunft zu analysieren wäre.

Im Allgemeinen könnte die Funktion von Wt1 während der embryonalen Hämatopoese nicht nur auf die zuvor beschriebenen Prozesse beschränkt sein. So ist es auch vorstellbar, dass Wt1 die Proliferation von endothelialen Zellen fördert (Wagner *et. al.*, 2008) und somit entstehende Lücken im Endothel der dorsalen Aorta durch das Freisetzen von hämatopoetischen Stammzellen des Typs I und II geschlossen werden. Des Weiteren könnte Wt1 direkt an der

Entstehung des hämatopoetischen Endothels der dorsalen Aorta beteiligt sein, da der Transkriptionsfaktor im lateralen Mesoderm exprimiert wird (Armstrong *et. al.*, 1992; Rackley *et. al.*, 1993) und dieses Gewebe als Ursprung des Endotheliums gilt (Zovein *et. al.*, 2010). In diesem Zusammenhang wäre es vorstellbar, dass der Transkriptionsfaktor, ähnlich wie bei der Wt1-gesteuerten Gefäßbildung des Darms, an der Migration von gefäßbildenden Zellen vom lateralen Mesoderm zum Ort der Neovaskularisation beteiligt ist (Wilm *et. al.*, 2005), wobei im Falle der dorsalen Aorta diese migrierenden Zellen in der vorliegenden Dissertation anhand des Wt1-positiven Mesenchyms unterhalb der dorsalen Aorta zu erkennen sein könnten (siehe Abb. 3.46-3.48). Nachfolgend könnte Wt1 durch eine von Kirschner und Kollegen gezeigte Stimulation von CD144, CD309 und Angiopoietin-2, die Differenzierung von gefäßbildenden Zellen zu endothelialen Zellen fördern (Kirschner *et. al.*, 2010), so dass das hämatopoetische Endothel entsteht und dies die gemeinsame Expression von Wt1, CD144 und CD 309 in diesem Gewebe erklärt (siehe Abb. 3.46).

Wie schon in Kapitel 4.3 erwähnt, wurden die Ergebnisse der Immunfluoreszenz-Versuche nur bedingt durch die Durchflusszytometrie-Versuche bestätigt (siehe Kap.3.3.2). So konnte zwar bei diesen mit WE2 EZ-positiven Embryonen (Tag 11,5 *d.p.c.*) durchgeführten Versuchen in allen EGFP-positiven Zellen eine Koexpression mit den untersuchten hämatopoetischen Stammzellmarkern festgestellt werden, doch waren aufgrund der Fluoreszenzintensität nur die EGFP⁺/CD49d⁻ bzw. die EGFP⁺/CD41^{low} und EGFP⁺/CD41^{high}-Zellen als echte Zellpopulation identifizierbar (siehe Abb. 3.50 und 3.51). Zudem wiesen so gut wie keine Zellen, die Eigenschaften prä-hämatopoetischer Stammzellen des Typs I und II auf (siehe Abb. 3.51). Der Grund für diese Ergebnisse könnte auf methodische Ursachen zurückzuführen sein (siehe Material und Methoden 2.6.6 und 2.7.9). So ist es möglich, dass durch einen unvollständigen Verdau der Embryonen Gewebereste in den Petrischalen zurückbleiben, so dass diese nicht in 15 ml PP-Röhrchen überführt und analysiert werden. Zudem werden die Zellen eines Embryos für mehrere Färbungen aufgeteilt, so dass z.B. bei einem Nachweis von EGFP⁺/CD41⁺-Zellen nicht die Zellpopulation von EGFP⁺/CD144⁺-Zellen berücksichtigt wird. Ferner wird von den gefärbten Zellen (zwischen 200.000 und 300.000 Zellen) nur ein kleiner Anteil (30.000 Zellen) ausgewertet, weil viele Zellen durch deren Tod oder unzureichender Vereinzelung nicht analysiert werden können. Da auch diese Zellen wahrscheinlich viele EGFP-positive Zellen beinhalten, werden sie ebenfalls nicht in die Auswertung mit einbezogen. Somit weisen die angesprochenen Punkte darauf hin, dass die Ergebnisse der Immunfluoreszenz-Versuche mehr zu gewichten sind, wobei dies auch damit begründet werden kann, dass durch sie der direkte zelluläre Nachweis einer Koexpression von Wt1 mit Markern, die für die Entstehung von

hämatopoetischen Stammzellen von Bedeutung sind, auf Kryo- bzw. Paraffinschnitten möglich ist.

Nichts desto trotz sprechen auch die Resultate der Durchflusszytometrie-Versuche für eine Rolle von Wt1 in der frühen embryonalen Hämatopoese. So könnte die geringe Anzahl an Wt1-exprimierenden prä-hämatopoetischen Stammzellen des Typs I und II nicht nur auf methodische Ursachen zurückzuführen sein, sondern damit begründet werden, dass die Entstehung dieser Zellen um Tag 11,5 *d.p.c.* generell ein seltenes Ereignis ist (Kumaravelu *et. al.*, 2002; Robin *et. al.*, 2006; Boisset *et. al.*, 2010). Des Weiteren weist auch die Koexpression von EGFP und CD41 auf eine Funktion von Wt1 in der frühen Hämatopoese hin. So wird CD41 während der Embryogenese in allen hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen, sowie in Megakaryozyten exprimiert (Corbel und Salaun, 2002; Ferkowicz *et. al.*, 2003; Mikkola *et. al.*, 2003; Bertrand *et. al.*, 2005). Dabei zeigen hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen eine CD41^{low}-Expression und Megakaryozyten eine CD41^{high}-Expression (Yokomizo und Dzierzak, 2010). Da bei den Durchflusszytometrie-Versuchen CD41^{low} und CD41^{high}-Zellen EGFP exprimierten, ist davon auszugehen, dass der Transkriptionsfaktor an der Entstehung dieser Zellen beteiligt ist. Bestätigt wird dies durch die Ergebnisse der hämatopoetischen Stammzellassays, bei denen sich aus embryonalen Wt1-exprimierenden Zellen (Tag 11,5 *d.p.c.*) hämatopoetische Vorläuferzellen und Megakaryozyten bildeten (siehe Abb. 3.55 und 3.56). Dagegen ist im Falle der EGFP⁺/CD49d⁺-Zellen unklar, ob es sich allein um Zellen des hämatopoetischen Endothels handelt, da Wt1 und CD49d auch im Epikard (Kirschner *et. al.*, 2006) und hämatopoetischen Vorläuferzellen koexprimiert wird (Arroyo *et. al.*, 1996; Alberta *et. al.*, 2003; Priestley *et. al.*, 2006).

Generell widersprechen die Ergebnisse der Durchflusszytometrie-Versuche zum Teil der aus den Immunfluoreszenz-Versuchen gewonnenen Erkenntnis, dass Wt1 an der Entstehung von hämatopoetischen Stammzellen beteiligt ist. Doch die durchgeführten Transplantationsversuche und hämatopoetischen Stammzellassays bestärken diesen Verdacht. So konnte durch embryonale Wt1-exprimierende Zellen (Tag 11,5 *d.p.c.*) von tripeltransgenen WE2 TC RG-positiven Mäusen das Blutssystem radioaktiv bestrahlter Mäuse wieder aufgebaut werden, so dass die Mäuse überlebten und Wt1-tTA-positive Zellen auch nach 16 Wochen bzw. 6 Monaten im Blut und blutbildenden/blutdifferenzierenden Organen nachweisbar waren (siehe Abb. 3.53 und 3.54). Zudem bildeten sich aus embryonalen Wt1-positiven Zellen (Tag 11,5 *d.p.c.*) von WE2 EZ-positiven Mäusen hämatopoetische Vorläuferzellen, die sich u.a. zu Megakaryozyten differenzieren (siehe Abb. 3.55 und 3.56). Somit bewiesen diese Versuche, dass embryonale Wt1-exprimierende Zellen (Tag 11,5 *d.p.c.*) hämatopoetische Stammzell-Eigenschaften besitzen.

In Abbildung 4.3 sind alle neuen Erkenntnisse und möglichen Funktionen von Wt1 während der frühen Hämatopoese zusammengefasst.

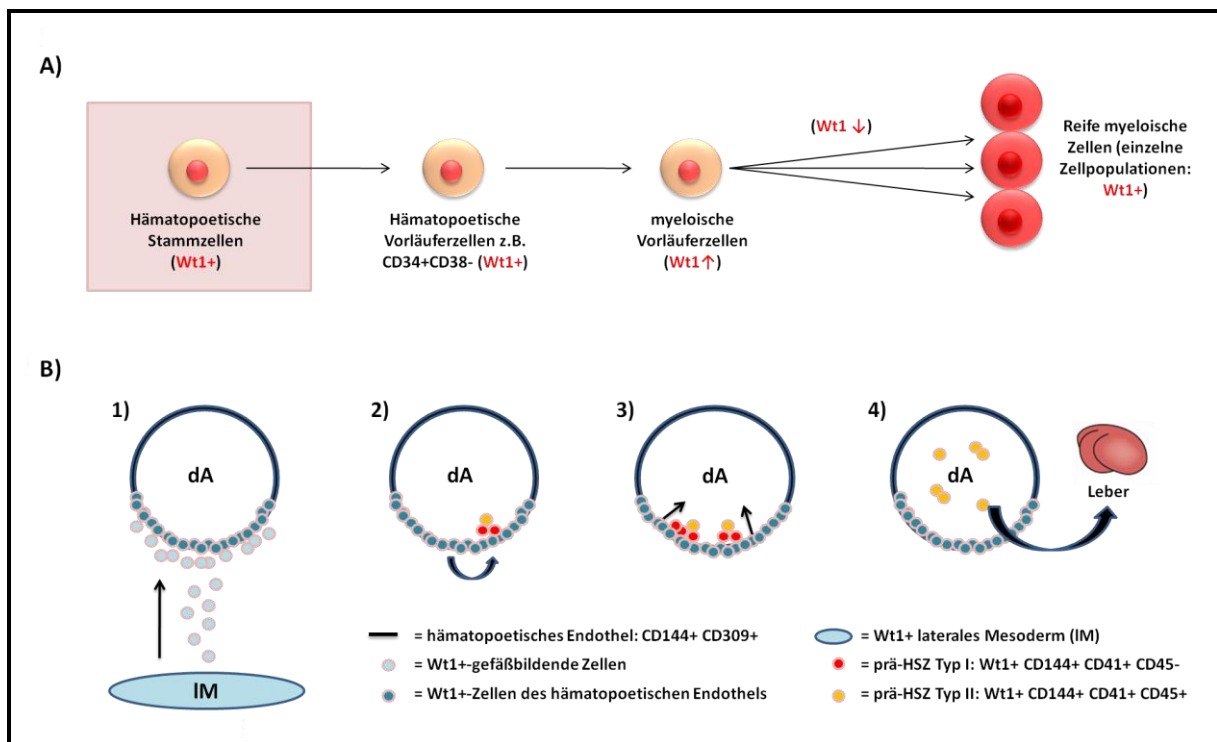


Abbildung 4.3: Wt1-Funktionen während der frühen Hämatopoese

A) Die Rolle von Wt1 während der embryonalen und adulten Hämatopoese war bisher darauf beschränkt, dass dieser Transkriptionsfaktor durch einen anti-apoptotischen Effekt den Erhalt und anschließend die Proliferation von hämatopoetischen Vorläuferzellen fördert, bevor er die Differenzierung von myeloischen Zellen einleitet und dessen Expression in reifen myeloischen Zellen kaum mehr nachweisbar ist. Doch durch die Analysen der vorliegenden Dissertation konnte gezeigt werden, dass Wt1 schon zu Beginn der Hämatopoese eine Rolle spielt und in hämatopoetischen Stammzellen (rosa Kasten) exprimiert wird. **B)** In diesem Abschnitt sind die möglichen Funktionen von Wt1 während der frühen Hämatopoese dargestellt. So könnte Wt1 ausgehend vom lateralen Mesoderm (IM) an der Entstehung der dorsalen Aorta (dA) beteiligt sein (1) oder durch die Proliferation endothelialer Zellen entstehende Lücken durch das Freisetzen von hämatopoetischen Stammzellen schließen (2). Zudem könnte der Transkriptionsfaktor direkt durch die Regulation eines EMT-ähnlichen Prozesses die Freisetzung von prä-hämatopoetischen Stammzellen induzieren (3) und dessen Expression einen proliferativen, anti-apoptotischen und differenzierenden Effekt auf prä-hämatopoetische Stammzellen des Typs II haben, so dass diese Zellen in die Leber gelangen und am Aufbau des Blutsystems beteiligt sind (4).

Die zuvor diskutierten Ergebnisse dieser Dissertation zeigen eindeutig, dass Wt1 an der frühen Hämatopoese beteiligt ist. Allerdings weisen Untersuchungen von Alberta und Kollegen darauf hin, dass der Transkriptionsfaktor in diesem Zusammenhang vielleicht nicht essentiell ist (Alberta *et. al.*, 2003), was durch King-Underwood und Kollegen bestätigt wurde (King-Underwood *et. al.*, 2005). So konnte in beiden Studien gezeigt werden, dass embryonale Leberzellen (Tag 13 *d.p.c.* oder Tag 13,5 *d.p.c.*) von homozygoten *Wt1*-mutierten Mäusen in der Lage waren, das hämatopoetische Blutssystem von radioaktiv bestrahlten Mäusen wieder aufzubauen. Somit scheint in diesen Tieren die Bildung des hämatopoetischen Endothels, eine Entstehung von prä-hämatopoetischen Stammzellen des Typs I und II sowie die Besiedlung der

blutbildenden bzw. blutdifferenzierenden Leber durch diese Zellen auch ohne *Wt1* möglich zu sein (Alberta *et. al.*, 2003; King-Underwood *et. al.*, 2005). Im Falle einer *Wt1*-Mutation könnte es also anderen Gene bzw. Regulationsmechanismen geben, die eine ähnliche Funktion während der frühen Hämatopoese ausführen und einen *Wt1*-Verlust kompensieren. Diese gilt es in Zukunft zu entschlüsseln, genauso wie die zuvor beschriebenen Versuchsansätze zur Untersuchung der Funktion von *Wt1* während der frühen Hämatopoese durchzuführen, um mehr über diesen zum Teil noch recht unerforschten und widersprüchlich diskutierten Prozess zu erfahren.

4.4 Ausblick

Durch die Versuchsansätze der hier präsentierten Arbeit war es nicht möglich ein Wilms-Tumor-Modell herzustellen. Dies lag u.a. daran, dass wohl eine alleinige β -Catenin-Aktivierung in *Wt1*-exprimierenden Zellen des metanephrischen Mesenchyms nicht ausreichte, um die Wilms-Tumorgenese zu induzieren. Um trotzdem ein Mausmodell für einen triphasischen Wilms-Tumor zu generieren und zu charakterisieren, in dem es wie in einer Gruppe von humanen Wilms-Tumoren durch Mutationen von *Wt1* und *Ctnnb1* zur Entwicklung dieser Tumorerkrankung kommt, wäre es sinnvoll die *Wt1*-defizienten Mäuse (*Wt1*^{-fl}) von Hu und Kollegen mit der Tamoxifen-induzierbaren Mauslinie *CRE-ER*TM und *bCat* Δ Ex3 zu verpaaren (Harada *et. al.*, 1999; Hayashi *et. al.*, 2002; Hu *et. al.*, 2011). Anschließend könnte es in *Wt1*^{-fl} *CRE-ER*TM *bCat* Δ Ex3-positiven Embryonen (Tag 11,5 *d.p.c.*) durch die gleiche Versuchsdurchführung wie im Mausmodell von Hu und Kollegen zur Expression der Cre-Rekombinase in einzelnen Zellen des metanephrischen Mesenchyms kommen (Hu *et. al.*, 2011). Dies würde nachfolgend zum homozygoten *Wt1*-Verlust in den Nierenvorläuferzellen führen, so dass deren Differenzierung ausbleibt und durch die aktivierende Mutation von *Ctnnb1* die Entstehung eines triphasischen Wilms-Tumors induziert wird. Zudem hätte dieses Modell den Vorteil, dass das Problem der Durchlässigkeit und der Induzierbarkeit des *Tet-off* Systems umgangen wird und eine konstitutive β -Catenin-Aktivierung auf die Niere beschränkt ist.

Um weitere Einblicke in die Wilms-Tumorgenese zu erhalten, wäre es zudem sinnvoll eine *WTX* *k.o.*-Maus zu generieren. Mit diesen Mäusen könnte z.B. bestätigt werden, dass eine β -Catenin-Aktivierung wirklich nicht der physiologisch entscheidende Schritt bei der Entstehung von Wilms-Tumoren ist. Des Weiteren könnten diese Mäuse mit den *Wt1*-defizienten Tieren (*Wt1*^{-fl}) von Hu und Kollegen und der Tamoxifen-induzierbaren Mauslinie *CRE-ER*TM verpaart werden, so dass in gleicher Weise wie oben beschrieben, ein alternatives Wilms-Tumor-Modell hergestellt wird (Hayashi *et. al.*, 2002; Hu *et. al.*, 2011).

Würden nun durch diese Modelle Wilms-Tumore generiert werden, so wäre es von Interesse, ob diese Tumore, ähnlich wie im Tiermodell von Hu und Kollegen, durch eine Aktivierung von *ERK1/2* entstehen (Hu *et. al.*, 2011). Wenn dies der Fall wäre, so würde dies dafür sprechen, dass es trotz verschiedener Genmutationen vielleicht einen gemeinsamen Mechanismus der Wilms-Tumorgenese gibt.

Abgesehen von der Tatsache, dass es in der vorliegenden Arbeit durch kein Modell möglich war, eine Wilms-Tumorerkrankung zu simulieren und es daher der Herstellung neuer Wilms-Tumor-Modelle bedarf, ergaben sich während der Charakterisierung der WE2-Effektor-Mauslinie und der Modelle neue Erkenntnisse, die zur weiteren Aufklärung der komplexen Rollen von Wt1 und β -Catenin während der Embryonalentwicklung und in adulten Lebewesen beitragen könnten. So wurde z.B. durch mehrere Versuche belegt, dass Wt1 eine Rolle in der frühen Hämatopoese spielt. Dabei sind die diskutierten Annahmen zur möglichen Wt1-Funktion in diesem Prozess rein spekulativ und müssen durch weitere zum Teil schon in der Diskussion beschriebene Versuchsansätze (siehe Diskussion 4.3) bewiesen werden. Um z.B. belegen zu können, dass Wt1 an der Entstehung des hämatopoetischen Endothels beteiligt ist, müssten *timed matings* von WE2 TC RR-Mäusen angesetzt und deren Embryonen zwischen Tag 9,5-12,5 *d.p.c.* präpariert und mit X-Gal gefärbt werden. Somit könnte nach dem Herstellen von Paraffinschnitten und dem Gegenfärben mit KER das Schicksal der Wt1-positiven Zellen des lateralen Mesoderms zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Embryogenese untersucht werden und deren Beitrag zur Bildung des hämatopoetischen Endothels beurteilt werden.

Zudem sollten die Durchflusszytometrie-Versuche mit Tag 10,5 *d.p.c.* alten WE2 EZ-positiven Embryonen wiederholt werden, da zu diesem Zeitpunkt der Embryogenese die Entstehung hämatopoetischer Stammzellen am häufigsten ist (Yokomizo und Dzierzak, 2010) und somit durch den Nachweis einer echten Zellpopulation von EGFP-positiven prä-hämatopoetischen Stammzellen des Typ I und II bestätigt wäre, dass Wt1 direkt an der Entstehung dieser Zellen beteiligt ist. Außerdem könnte durch weitere Durchflusszytometrie-Versuche versucht werden, EGFP-positiven prä-hämatopoetischen Stammzellen des Typ I und II von den restlichen EGFP-positiven Zellen zu separieren, so dass es möglich wäre mit diesen Zellen die Transplantationsversuche und hämatopoetischen Stammzellassays zu wiederholen. Somit könnte ausgeschlossen werden, dass die Ergebnisse der Transplantationsversuche und hämatopoetischen Stammzellassays in der vorliegenden Dissertation auf Wt1-exprimierende hämatopoetische Vorläuferzellen ($CD34^+ CD38^-$ bzw. $CD34^+ CD38^+$ - Zellen) zurückzuführen sind und allein auf Wt1-exprimierenden prä-hämatopoetischen Stammzellen des Typs I und II beruhen.

Ferner konnte bei der Charakterisierung der Modelle WE2 TC bCat Δ Ex3, WE2 LC bCat Δ Ex3 und WE2 Wnt1 festgestellt werden, dass es durch eine Wt1-analoge Aktivierung von β -Catenin zur Entstehung von polyzystischen Nieren, Granulosazelltumoren und Veränderungen der Hoden kommt. Zukünftig bieten diese Modelle somit die Möglichkeit die Pathogenese dieser organischen Veränderungen genauer zu untersuchen. Gerade im Falle der unterschiedlichen Schwere der Granulosazell-Tumorgenese, die wohl auf die verschiedenen Systeme zurückzuführen ist, wäre es interessant zu analysieren, ob tatsächlich Schwellenwerte der Aktivität der kanonischen Wnt-Signalkaskade überschritten werden müssen, um zum einen die Tumorgenese zu induzieren und zum anderen diese zu beschleunigen. Die Untersuchung der Expression verschiedener kanonischer Wnt-Zielgene, wie z.B. Cyclin D1 und c-myc, durch quantitative PCRs könnte dazu beitragen, die Aktivität des Signalwegs zu bestimmen, so dass Aussagen dazu getroffen werden können, ab wann es zur Entwicklung eines Granulosazelltumors kommt bzw. die Tumorgenese beschleunigt wird. Zudem könnte durch die Gabe von β -Catenin-Inhibitoren wie z.B. Riccardin D oder Quercetin untersucht werden, ob die Modelle zur Therapieabklärung geeignet sind (Park *et. al.*, 2005; Liu *et. al.*, 2012).

5. Zusammenfassung

Der Wilms-Tumor ist eine embryonale Tumorerkrankung der Niere, als deren Ursprung Nierenvorläuferzellen des metanephrischen Mesenchyms gelten, deren Differenzierung während der frühen Nephrogenese ausbleibt und aus denen nachfolgend durch eine maligne Transformation Wilms-Tumore entstehen. Zwei Gene, die an der Wilms-Tumorgenese beteiligt zu sein scheinen, sind *WT1* (*Wilms-Tumorgen 1*) und *CTNNB1* (*Catenin, cadherin-associated protein, beta 1*). Während *WT1* u.a. die Differenzierung des metanephrischen Mesenchyms steuert, begünstigen aktivierende Mutationen von *CTNNB1* und eine dadurch bedingte Akkumulation seines Proteins β -Catenin die Tumorgenese vieler Organe. So verwundert es nicht, dass eine alleinige heterozygote Keimbahnmutation von *WT1*, die einen dominant-negativen Effekt auf funktionsfähiges *WT1* ausübt, häufig zur Entstehung von Wilms-Tumoren in Patienten mit Denys-Drash-Syndrom (DDS) führt, sowie in etwa 15 % aller sporadischen Wilms-Tumore *WT1* und *CTNNB1* mutiert sind.

Der Mechanismus der Entstehung von Wilms-Tumoren ist weitgehend unbekannt, was u.a. daran liegt, dass homozygote *Wt1*-Mutationen in der Maus embryonal (~ Tag 13,5 *d.p.c.*) letal sind. In der vorliegenden Arbeit sollten daher mit Hilfe einer *Wt1* *k.o.*-Effektormaus (WE2) vier murine konditional reversible Wilms-Tumor-Modelle auf Basis des *Tet off*-Systems hergestellt werden. Dadurch lag in den zu generierenden Tieren *Wt1* durch die Integration des WE2-Transgens zwar nur heterozygot mutiert vor, doch durch den endogenen *Wt1*-Promotor des Transgens sollte es zur zeitlichen und räumlichen *Wt1*-analogen Expression eines tetrazyklinabhängigen Transaktivators (tTA) kommen, der ohne die Gabe von Doxycyclin Tet-regulierbare Transgene in *Wt1*-exprimierenden Zellen aktivieren kann, die einen positiven Einfluss auf die Wilms-Tumorgenese haben könnten. So sollte durch das WE2 DDS-Modell ein DDS simuliert werden und es in Tieren der Modelle WE2 TC bCat Δ Ex3, WE2 LC bCat Δ Ex3 und WE2 Wnt1 zur Akkumulation von β -Catenin in *Wt1*-exprimierenden Nierenvorläuferzellen kommen, so dass deren Differenzierung ausbleibt und es durch eine maligne Transformation zur Entstehung eines Wilms-Tumors kommt.

Mit Hilfe von histologischen Analysen an entsprechenden *Responder*-Linien konnte zunächst gezeigt werden, dass die embryonale und adulte Expressionsdomäne des WE2-Effektors mit der von endogenen *Wt1* übereinstimmt. Gleichzeitig wurden aber auch neue Expressionsorte von *Wt1* nachgewiesen. So konnte die Expression des WE2-Effektors z.B. im Endothel der dorsalen Aorta detektiert werden, der als Entstehungsort von hämatopoetischen Stammzellen gilt. Anschließend hier vorgestellte Experimente zeigten, dass *Wt1* direkt an diesem Prozess

beteiligt ist und belegten eine noch nicht beschriebene Funktion von Wt1 in der frühen Hämatopoese.

Es war jedoch mit keinem System möglich, eine Wilms-Tumorerkrankung zu simulieren. Während Tiere des WE2 DDS-Modells trotz nachweisbarer Induktion keinen Phänotyp aufwiesen, war wohl in den anderen Modellen eine konstitutive β -Catenin-Aktivierung in der Frühschwangerschaft nicht mit dem embryonalen Überleben vereinbar. Dabei schienen alle tripeltransgenen bzw. doppeltransgenen Embryonen, in denen durch einen frühen Doxycyclinzug die Entstehung von Wilms-Tumoren möglich gewesen wäre, intrauterin zu sterben. Wurde dagegen Doxycyclin erst in der dritten Lebenswoche entzogen, so entwickelten die Tiere durch eine Wt1-vermittelte β -Catenin-Aktivierung Granulosazelltumore, polyzystische Nieren und Veränderungen der Hoden. Da alle diese organischen Veränderungen während der prä- bis frühen postnatalen Phase induziert wurden, schien die Doxycyclinmenge nicht auszureichen, um eine β -Catenin-Aktivierung zu verhindern. Es hätte also auch zur Entstehung von Wilms-Tumoren kommen können, so dass diese Ergebnisse darauf hinweisen, dass eine β -Catenin-Aktivierung wahrscheinlich nicht der physiologisch entscheidende Schritt bei der Entstehung eines Wilms-Tumors ist.

Die Charakterisierung der WE2-Effektormaus und die Herstellung und Analysen der Systeme geben damit Einblick in die *WT1*- bzw. *WT1/CTNNB1*-assoziierte Wilms-Tumorgenese und ermöglichen die weitere Erforschung von Granulosazelltumoren, polyzystischen Nieren, Veränderungen von Hoden und der Rolle von WT1 in der frühen Hämatopoese.

6. Literaturverzeichnis

- Aberle, H., Bauer, A., Stappert, J., Kispert, A., Kernler, R. (1997): Beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J.* 16: 3797-3804
- Alberta, J.A., Springett, G.M., Rayburn, H., Natoli, T.A., Loring, J., Kreidberg, J.A., Housman, D. (2003): Role of the WT1 tumor suppressor in murine hematopoiesis. *Blood* 101 (7): 2570-2574
- Ariyaratana, S., Loeb, D.M. (2007): The role of the Wilms tumour gene (WT1) in normal and malignant haematopoiesis. *Expert reviews in molecular medicine* 9 (14): 1-17
- Armstrong, J.F., Pritchard-Jones, K., Bickmore, W.A., Hastie, N.D., Bard, J.B. (1993): The expression of the Wilms' tumour gene, WT1, in the developing mammalian embryo. *Mech. Dev.* 40 (1-2): 85-97
- Arroyo, A.G., Yang, J.T., Rayburn, H., Hynes, R.O. (1996): Differential requirements for alpha4 integrins during fetal and adult hematopoiesis. *Cell* 85: 997-1008
- Arroyo, A.G., Yang, J.T., Rayburn, H., Hynes, R.O. (1999): Alpha4 integrins regulate the proliferation/differentiation balance of multilineage hematopoietic progenitors in vivo. *Immunity* 11: 555-566
- Baird, P.N., Simmons, P.J. (1997): Expression of the Wilms' tumor gene (WT1) in normal hematopoiesis. *Exp. Hematol.* 25: 312-320
- Battle, E., Sancho, E., Franci, C., Dominguez, D., Monfar, M., Baulida, J., Garcia De Herreros, A. (2000): The transcription factor snail is a repressor of E-Cadherin gene expression in epithelial cells. *Nat. Cell. Biol.* 2: 84-89
- Bardeesy, N., Zabel, B., Schmitt, K., Pelletier, J. (1994 a): Wt1 mutations associated with incomplete Denys-Drash syndrome define a domain predicted to behave in a dominant-negative fashion. *Genomics* 21: 663-664
- Bardeesy, N., Falkoff, D., Petrucci, M.J., Nowak, N., Zabel, B., Adam, M., Aguiar, M.C., Grundy, P., Shows, T., Pelletier, J. (1994 b): Anaplastic Wilms' tumour, a subtype displaying poor prognosis, harbor p53 gene mutations. *Nature Genet.* 7: 91-97
- Beckwith, J.B., Kiviat, N.B., Bonadio, J.F. (1990): Nephrogenic rests, nephroblastomatosis, and the pathogenesis of Wilms' Tumor. *Pediatr. Pathol.* 10: 1-36
- Beckwith, J.B. (1997): New developments in the pathology of Wilms' tumor: Developmental and clinical considerations. *American Journal of Medical Genetics* 79: 268-273
- Beckwith, J.B. (1998): Nephrogenic Rests and the Pathogenesis of Wilms Tumor: Development and Clinical Considerations. *American Journal of Medical Genetics* 79: 268-273
- Bennington, J., Beckwith, J.B. (1975): Tumors of the kidney, renal pelvis and ureter. Armed Forces Institute of Pathology, Washington D.C.
- Berger, S.L., Pina, B., Silverman, N., Marcus, G.A., Apapite, J., Regier, J.L., Triezenberg, S.J., Guarente, L. (1992): Genetic isolation of ADA2: a potential transcriptional adaptor required for function of certain acidic activation domains. *Cell* 70: 251-265

- Bertrand, J.Y., Giroux, S., Golub, R., Klaine, M., Jalil, A., Boucontet, L., Godin, I., Cumano, A. (2005): Characterization of purified intraembryonic hematopoietic stem cells as a tool to define their site of origin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 134-139
- Bierie, B., Nozawa, M., Renou, J.P., Shillingford, J.M., Morgan, F., Oka, T., Taketo, M.M., Cardiff, R.D., Miyoshi, K., Wagner, K.U., Robinson, G.W., Henninghausen, L. (2003): Activation of β -Catenin in prostate epithelium induces hyperplasias and squamous transdifferentiation. *Oncogene* 22: 3875-3887
- Bockkamp, E., Maringer, M., Spangenberg, C., Fees, S., Fraser, S., Eshkind, L., Oesch, F., Zabel, B. (2002): Of mice and models: improved animal models for biomedical research. *Physiol. Genomics* 11:115-132
- Boerboom, D., Paquet, M., Hsieh, M., Liu, J., Jamin, S.P., Behringer, R.R., Sirois, J., Taketo, M.M., Richards, J.S. (2005): Misregulated Wnt/ β -Catenin Signaling Leads to Ovarian Granulosa Cell Tumor Development. *Cancer Res.* 65 (20): 9206-9215
- Boerboom, D., White, L.D., Dalle, S., Courty, J., Richards, J. S. (2006): Dominant-Stable β -Catenin Expression Causes Cell Fate Alterations and Wnt Signaling Antagonist Expression in a Murine Granulosa Cell Tumor Model. *Cancer Res.* 66 (4): 1964-1973
- Boisett, J.C., van Cappellen, W., Andrieu-Soler, C., Galjart, N., Dzierzak, E., Robin, C. (2010): In vivo imaging of haematopoietic cells emerging from the mouse aortic endothelium. *Nature* 464: 116-121
- Bonetta, L., Kuehn, S.E., Huang, A., Law, D.J., Kalikin, L.M., Koi, M., Reeve, A.E., Brownstein, B.H., Yeger, H., Williams, B.R.G., Feinberg, A.P. (1990): Wilms tumor locus on 11p13 defined by multiple CpG island-associated transcripts. *Science* 250: 994-997
- Bolos, V., Peinado, H., Perez-Moreno, M.A., Fraga, M.F., Esteller, M., Cano, A. (2003): The transcription factor Slug represses E-Cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transitions: A comparison with Snail and E47 repressors. *J. Cell. Sci.* 116: 499-511
- Borel, F., Barilla, K.C., Hamilton, T.B., Iskandar, M., Romaniuk, P.J. (1996): Effects of Denys-Drash syndrome point mutations on DNA binding activity of Wilms' tumor suppressor protein WT1. *Biochemistry* 35 (37): 12070-12076
- Boyer, A., Hermo, L., Paquet, M., Robaire, B., Boerboom, D. (2008): Seminiferous Tubule Degeneration and Infertility in Mice with Sustained Activation of WNT/CTNNB1 Signaling in Sertoli Cells. *Biology of reproduction* 79: 475-485
- Boyer, A., Goff, A.K., Boerboom, D. (2009): WNT signaling in ovarian follicle biology and tumorigenesis. *Cell Press* 21 (1): 25-32
- Brabletz, T., Jung, A., Dad, S. et. al. (1999): Beta-Catenin regulates the expression of the matrix metalloproteinase-7 in human colorectal cancer. *Am. J. Pathol.* 155: 1033-1038
- Bruening, W., Winnett, E., Pelletier, J. (1995): Wilms' Tumor: A paradigm for insights into development and cancer. *Cancer Investigation* 13 (4): 431-443
- Buchert, M., Athineos, D., Abud, H.E., Burke, Z.D., Faux, M.C., Samuel, M.S., Jarnicki, A.G., Winbanks, C.E., Newton, I.P., Meniel, V.S., Suzuki, H., Stacker, S.A., Näthke, I.S., Tosh, D., Huelsken, J., Clarke, A.R., Heath, J.K., Sansom, O.J., Ernst, M. (2010): Genetic Dissection of Differential Signaling Threshold Requirements for the Wnt/ β -Catenin Pathway in vivo. *PLoS Genetics* 6 (1): 1-13

- Burrow, C.R. (2000): Regulatory molecules in kidney development. *Pediatric Nephrology* 14: 240-253
- Byard, R.W., Thomas, M.J. (1988) Osseous metaplasia within tumours. A review of 11 cases. *Ann. Pathol.* 8: 64-66
- Cadigan, K.M., Peifer, M. (2009): Wnt Signaling from Development to Disease: Insights from Model Systems. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 1: 1-23
- Call, K.M., Glaser, T., Ito, C.Y., Buckler, A.J., Pelletier, J., Haber, D.A., Rose, E.A., Kral, A., Yeger, H., Lewis, W.H., Jones, C., Housman, D.E. (1990): Isolation and characterization of a zinc-finger polypeptide gene at human chromosome 11 Wilms' Tumor locus. *Cell*: 60: 509-520
- Charles, A.K., Brown, K.W., Berry, P.J. (1998): Microdissecting the genetic events in nephrogenic rests and Wilms' tumor development. *American Journal of Pathology* 153 (3): 991-1000
- Clevers, H. (2006): Wnt/ β -Catenin Signaling in Development and Disease. *Cell* 127: 469-480
- Constien, R., Forde, A., Liliensiek, B., Grone, H.J., Nawroth, P., Hammerling, G., Arnold, B. (2001): Characterization of a novel EGFP reporter mouse to monitor Cre recombination as demonstrated by a Tie2 Cre mouse line. *Genesis* 30 (1): 36-44
- Cook, D.M., Hinkes, M.T., Burnfield, M., Rauscher, F.J. III (1996): Transcriptional activation of the syndecan-1 promoter by the Wilms' tumor protein WT1. *Oncogene* 272: 2901-2913
- Coppes, M. J. (1993): Serum biological markers and paraneoplastic syndromes in Wilms' tumor. *Med. Pediatr. Oncol.* 21: 213-221
- Corbel, C., Salaun, J. (2002): AlphaIIb integrin expression during development of the murine hematopoietic system. *Dev. Biol.* 243: 301-311
- Corbin, M., de Reynies, A., Rickman, D.S., Berrebi, D., Boccon-Gibod, L., Cohen-Gogo, S., Fabre, M., Jaubert, F., Faussillon, M., Yilmaz, F., Sarnacki, S., Landman-Parker, J., Patte, C., Schleiermann, G., Antigac, C., Jeanpierre, C. (2009): WNT/ β -Catenin Pathway Activation in Wilms' Tumors: A Unifying Mechanism with Multiple Entries. *Genes, Chromosomes & Cancer* 48: 816-827
- Dai, C., Stolz, D.B., Kiss, L.P., Monga, S.P., Holzman, L.B., Liu, Y. (2009): Wnt/ β -Catenin signaling promotes podocyte dysfunction and albuminuria. *J. Am. Soc. Nephrol.* 20: 1997-2008
- Damgaard-Petersen, K. (1980): CT and IVU in the diagnosis of Wilms' tumor. *Pediatr. Radiol.* 9: 207-211
- Daugherty, R.L., Gottardi, C.J. (2007): Phospho-regulation of β -Catenin Adhesion and Signaling Functions. *Physiology* 22: 303-309
- Davidoff, A.M. (2009): Wilms' tumor. *Current Opinion in Pediatrics* 21: 357-364
- Davidson, G., Wu, W., Shen, J., Bilic, J., Fenger, U., Stanek, P., Glinka, A., Niehrs, C. (2005): Casein kinase 1 gamma couples Wnt receptor activation to cytoplasmic signal transduction. *Nature* 438: 867-872
- Davies, R.C., Calvio, C., Bratt, E., Larsson, S.H., Lamond, A.I., Hastie, N.D. (1998): WT1 interacts with the splicing factor U2AF65 in an isoform-dependent manner and can be incorporated into spliceosomes. *Genes & Development* 12: 3217-3225

- Denys, P., Malvaux, P., van de Berghe, H., Tangbe, W., Proesmans, W. (1967): Association d'un syndrome anatomo-pathologique de pseudohermaphroditisme masculine, d'une tumeur de Wilms, d'une néphropathie parenchymateuse et d'un mosaïcisme XX/XY. *Arch. Franc. Pediat-* 24: 729-739
- Dey, B.R., Sukhatme, V.P., Roberts, A.B., Sporn, M.B., Rauscher, F.J., Kim, S.J. (1994): Repression of the transforming growth factor-beta 1 gene by the Wilms' tumor suppressor WT1 gene product. *Mol. Endocrinol.* 8 (5): 595-602
- Diehl, J.A. (2002): Cycling to Cancer with Cyclin D1. *Cancer Biology & Therapy* 1 (3): 226-231
- Drake, C.J., Fleming, P.A. (2000): Vasculogenesis in the day 6,5 to 9,5 mouse embryo. *Blood* 95: 1617-1679
- Drash, A., Sherman, F., Hartman, W.H., Blizzard, R.M. (1970): A syndrome of pseudohermaphroditism, Wilms' tumor, hypertension, and degenerative renal disease. *J. Pediat.* 76: 585-593
- Dressler, G.R., Wilkinson, J.E., Rothenpieler, U.W., Patterson, L.T., Williams-Simons, L., Westphal, H. (1993): Deregulation of Pax-2 expression in transgenic mice generates severe kidney abnormalities. *Nature* 362: 65-67
- Dressler, G.R. (2002): Development of excretory system. In: *Mouse development*, Rosant, J., Tam, P.P.L. (Hrsg.), Academic Press: 395-420
- Drews, U. (1993): *Taschenatlas der Embryologie*. 1. Auflage. Georg Thieme Verlag Stuttgart/New York
- Dzierzak, E., Speck, N.A. (2008): Of lineage and legacy: the development of mammalian hematopoietic stem cells. *Nature immunology* 9 (2): 129-136
- Eder, S., Gutjahr, P. (2010): *Embryonale Tumore bei Erwachsenen*. Pädiatrische Onkologie (Band 5). Shaker Verlag
- Ehrlich, D., Bruder, E., Thome, M.A., Gutt, C.N., von Knebel Doeberitz, M., Niggli, F., Peratoni, A.O., Koesters, R. (2010): Nuclear Accumulation of β -Catenin Protein Chemically Induced Rat Nephroblastomas. *Pediatr. Dev. Pathol.* 13 (1): 1-8
- Ellisen, L.W., Carlesso, N., Cheng, T., Scadden, D.T., Haber, D.A. (2001): The Wilms tumor suppressor WT1 directs stage-specific quiescence and differentiation of human hematopoietic progenitor cells. *EMBO Journal* 20 (8): 1897-1909
- Elvert, G., Kappel, A., Heidenreich, R., Englmeier, U., Lanz, S., Acker, T., Rauter, M., Plate, K., Sieweke, M., Breier, G., Flamme, I. (2003): Cooperative interaction of hypoxia-inducible factor 2alpha (HIF-2alpha) and Ets-1 in the transcriptional activation of vascular endothelial growth factor receptor-2 (Flk-1). *J. Biol. Chem.* 278: 7520-7530
- Englert, C., Maheswaran, S., Garvin, A.J., Kreidberg, J., Haber, D.A. (1997): Induction of p21 by the Wilms' tumor suppressor gene WT1. *Cancer Res.* 57 (8): 1429-1434
- Eremina, V., Sood, M., Haigh, J., Nagy, A., Lajoie, G., Ferrara, N., Gerber, H.P., Kikkawa, Y., Miner, J.H., Quaggin, S.E. (2003): Glomerular-specific alterations of VEGF-A expression lead to distinct congenital and acquired renal diseases. *J. Clin. Invest.* 111: 707-716
- Fees, S. (2006): *Ansatz zur Generierung einer konditionalen, reversible Wt1 k.o.-Maus*. Dissertation im Fachbereich Biologie der Johannes Gutenberg Universität Mainz

- Ferkowicz, M.J., Starr, M., Xie, X., Li, W., Johnson, S.A., Shelley, W.C., Morrison, P.R., Yoder, M.C. (2003): CD41 expression defines the onset of primitive and definitive hematopoiesis in the murine embryo. *Development* 130: 4393-4403
- Fleming, S. (1997): Genetics of renal tumours. *Cancer and Metastasis Reviews* 16: 127-140
- Flejou, J.F. (2005): Barrett's oesophagus: from metaplasias to dysplasia and cancer. *Gut* 54 Suppl. 1: 16-12
- Fraizer, G.C., Patmasirawat, P., Zhang, X., Saunders, G.F., (1995): Expression of the tumor suppressor gene WT1 on both human and mouse bone marrow. *Blood* 86 (12): 4704-4706
- Fukuchi, T., Sakamoto, M., Tsuda, H., Maruyama, K., Nozawa, S., Hirohashi, S. (1998): Beta-Catenin mutation in carcinoma of the uterine endometrium. *Cancer Res.* 58: 3526-3528
- Fukuzawa, R., Heathcott, R.W., Sano, M., Morison, I.M., Yun, K., Reeve, A.E. (2004): Myogenesis in Wilms' tumors is associated with mutations of the WT1 gene and activation of Bcl-2 and the Wnt signaling pathway. *Pediatr. Dev. Pathol* 7: 125-137
- Fukuzawa, R., Heathcott, R.W., More, H. E., Reeve, A.E. (2007): Sequential WT1 and CTNNB1 mutations of β -catenin localization in intralobar nephrogenic rests and associated Wilms tumours: two case studies. *J. Clin. Pathol.* 60: 1013-1016
- Fukuzawa, R., Anaka, M.R., Heathcott, R.W., McNoe, L.A., Morison, I.M., Perlman, E.J., Reeve, A.E. (2008): Wilms tumour histology is determined by distinct types of precursor lesions and not epigenetic changes. *J. Pathol.* 60: 1013-1016
- Fukuzawa, R., Anaka, R.J., Weeks, R.J., Morison, I.M., Reeve, A.E. (2009): Canonical WNT signaling determines lineage specificity in Wilms tumour. *Oncogene* 1-13
- Fukuzawa, R., Holman, S.K., Chow, C.W., Savarirayan, R., Reeve, A.E., Robertson, S.P. (2010): WTX mutations can occur both early and late in the pathogenesis of Wilms tumour. *J. Med. Genet.* 47: 791-794
- Furth, P.A., St. Onge, L.; Boger, H., Gruss, P., Gossen, M., Kistner, A., Bujard, H., Hennighausen, L. (1994): Temporal control of gene expression in transgenic mice by a tetracycline-responsive promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:9302-9306
- Gabow, P.A. (1993): Autosomal dominant polycystic kidney disease. *N. Engl. J. Med.* 329: 332-342
- Gao, Z.H., Seeling, J.M., Hill, V., Yochum, A., Virshup, D.M. (2002): Casein kinase I phosphorylates and destabilizes the beta-Catenin degradation complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 1182-1187
- Gao, F., Maiti, S., Sun, G., Ordonez, N.G., Udtha, M., Deng, J.M., Behringer, R.R., Huff, V. (2004): The Wt1+/R394W Mouse Displays Glomerulosclerosis and Early-Onset Renal Failure Characteristic of Human Denys-Drash Syndrome. *Molecular and Cellular Biology* 24 (22): 9899-9910
- Gao, X., Chen, X., Taglienti, M., Rumballe, B., Little, M.H., Kreidberg, J.A. (2005): Angioblast-mesenchyme induction of early kidney development is mediated by WT1 and VEGFA. *Development* 132: 5437-5449

- Garcia-Porrero, J.A., Manaia, A., Jimeno, J., Lasky, L.L., Dieterlen-Lievre, F., Godin, I.E. (1998): Antigenic profiles of endothelial and hematopoietic lineages in murine intraembryonic hemogenic sites. *Develop. and Comp. Immunol.* 22: 303-319
- Gaspar, C., Fodde, R. (2004): APC dosage effects in tumorigenesis and stem cell differentiation. *Int. J. Dev.* 48: 377-386
- Gerdes, J.M., Liu, Y., Zaghoul, N.A., Leitch, C.C., Lawson, S.S., Kato, M., Beachy, P.A., Beales, P.L., DeMartino, G.N., Fisher, S., Badano, J.L., Katsanis, N. (2007): Disruption of the basal body compromises proteasomal function and perturbs intracellular WNT response. *Nat. Genet.* 39: 1350-1360
- Gessler, M., König, A., Bruns, G.A. (1992): The genomic organization and expression of the *Wt1* gene. *Genomics* 12 (4): 807-813
- Gise von, A., Zhou, B., Honor, L.B., Ma, Q., Petryk, A., Pu, W.T. (2011): WT1 regulates epicardial epithelial to mesenchymal transition through β -Catenin and retinoic acid signaling pathways. *Developmental Biology* 356: 421-431
- Gossen, M., Bujard, H. (1992): Tight control of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 5547-5551
- Grantham, J.J. (1996): The etiology, pathogenesis, and treatment of autosomal dominant polycystic kidney disease: recent advances. *Am. J. Kidney Dis.* 28: 788-803
- Green, D.M. (1985): *Diagnosis and Management of Malignant Solid Tumors in Infants and Children* Boston, Nijhoff pp 1-552
- Grigoryan, T., Wend, P., Klaus, A., Birchmeier, W. (2008): Deciphering the function of canonical Wnt signals in development and disease: conditional loss- and gain-of-function mutations of β -catenin in mice. *Genes & Development* 22:2308-2341
- Grundy, P.E., Telzerow, P.E., Breslow, N., Moksness, J., Huff, V., Paterson, M.C. (1994): Loss of heterozygosity for chromosomes 16q and 1p in Wilms' tumors predicts an adverse outcome. *Cancer Res.* 54: 2331-2333
- Grundy, P.E., Pritchard, J., Scambler, P., Cowell, J.K. (1998): Loss of heterozygosity for the short arm of chromosome 7 in sporadic Wilms tumour. *Oncogene* 17: 395-400
- Guo, G., Morrison, D.J., Licht, J.D., Quaggin, S.E. (2004): WT1 activates a glomerular-specific enhancer identified from the human nephrin gene. *J. Am. Soc. Nephrol.* 15: 2851-2856
- Gutjahr, P. (1999): *Krebs bei Kindern und Jugendlichen*. 4. Auflage. Deutscher Ärzte-Verlag
- Haase, V.H., Glickman, J.N., Socolovsky, M., Jaenisch, R. (2001): Vascular tumors in livers with targeted inactivation of the von Hippel-Lindau tumor suppressor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98 (4): 1583-1588
- Haber, D.A., Buckler, A.J., Glaser, T., Call, K.M., Pelletier, J., Sohn, R.L., Douglass, E.C., Housman, D.E. (1990): An internal deletion within an 11p13 zinc finger gene contributes to the development of Wilms' tumor. *Cell* 61: 1257-1269
- Haber, D.A., Sohn, R.L., Buckler, A.J., Pelletier, J., Call, K.M., Housman, D.E. (1991): Alternative splicing and genomic structure of the Wilms' tumor gene *WT1*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 9618-9622

- Hanahan, D., Weinberg, R.A. (2011): Hallmarks of Cancer: The next Generation. *Cell* 144: 646-674
- Hanson, J., Gorman, J., Reese, J., Fraizer, G. (2007): Regulation of vascular endothelial growth factor, VEGF, gene promoter by the tumor suppressor, WT1. *Front. Biosci.* 12: 2279-2290
- Haque, S., Eisen, R.N., West, A.B. (1996): Heterotopic bone formation in the gastrointestinal tract. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 120: 666-670
- Harada, N., Tamai, Y., Ishikawa, T., Sauer, B., Takaku, K., Oshima, M., Taketo, M.M. (1999): Intestinal polyposis in mice with a dominant stable mutation of the beta-catenin gene. *EMBO J.* 18 (21): 5931-5942
- Haruta, M., Arai, Y., Sugawara, W., Watanabe, N., Honda, S., Ohshima, J., Soejima, H., Nakadate, H., Okita, H., Hata, J., Fukuzawa, M., Kaneko, Y. (2008): Duplication of Parental IGF2 or Loss of Maternal IGF2 Imprinting Occurs in Half of Wilms Tumors with Various Structural WT1 Abnormalities. *Genes, Chromosomes & Cancer* 47: 712-727
- Harms, D., Zeidler, H. (1981): Histologie der Nephroblastome. *Klein. Pädiat.* 193: 206-212
- Hasan, M.T., Schonig, K., Berger, S., Graewe, W., Bujard, H. (2001): Long-term, noninvasive imaging of regulated gene expression in living mice. *Genesis.* 29 (3):116-122
- Hashiya, N., Jo, N., Aoki, M., Matsumoto, K., Nakamura, T., Sato, Y., Ogata, N., Ogihara, T., Kaneda, Y., Morishita, R. (2004): In vivo evidence of angiogenesis induced by transcription factor Ets-1: Ets-1 is located upstream of angiogenesis cascade. *Circulation* 109: 3035-3041
- Hastie, N.D. (1992): Dominant negative mutations in the Wilms tumour (Wt1) gene cause Denys-Drash syndrome-proof that a tumour-suppressor gene plays a crucial role in normal genitourinary development. *Hum. Molec. Genet.* 1: 293-295
- Hengel van, J., Nollet, F., Berx, G., van Roy, N., Speleman, F., van Roy, F. (1995): Assignment of the human beta-catenin gene (CTNNB1) to 3p22 → p21.3 by fluorescence insitu hybridization. *Cytogenetics and Cell Genetics* 70 (1-2): 68-70
- Herzenberg, L.A., Parks, D., Sahaf, B., Perez, O., Roederer, M., Herzenberg, L.A. (2002): The History and Future of the Fluorescence Activated Cell Sorter and Flow Cytometry: A View from Stanford. *Clinical Chemistry* 48 (10): 1819-1827
- Herzer, U., Crocoll, A., Barton, D., Howells, N., Englert, C. (1999): The Wilms tumor suppressor gene wt1 is required for development of the spleen. *Current Biology* 9:837-840
- Hewitt, S.M., Hamada, S., McDonell, T.J., Rauscher, F.J., Saunders, G.F. (1995): Regulation of the proto-oncogenes bcl-2 and c-myc by the Wilms' tumor suppressor gene WT1. *Cancer Res.* 55: 5386-5389
- Hohenstein, P., Hastie, N.D. (2006): The many facets of the Wilms' tumor gene, Wt1. *Human Molecular Genetics* 15 (2): R196-R201
- Hollink, I.H., van den Heuvel-Eibrink, M.M., Zimmermann, M., Balgobind, B.V., Arentsen-Peters, S.T., Alders, M., Willasch, A., Kaspers, G.J., Trka, J., Baruchel, A., de Graaf, S.S., Creutzig, U., Pieters, R., Reinhardt, D., Zwaan, C.M. (2009): Clinical relevance of Wilms tumor 1 gene mutations in childhood acute myeloid leukemia. *Blood* 113: 5951-5960

- Hosen, N., Sonoda, Y., Oji, Y., Kimura, T., Minamiguchi, H., Tamaki, H., Kawakami, M., Asada, M., Kanato, K., Motomura, M., Fujioka, T., Masuda, T., Kim, E.H., Tsuboi, A., Oka, Y., Soma, T., Ogawa, H., Sugiyama, H. (2002): Very low frequencies of human normal CD34+ haematopoietic cells express the Wilms' tumour gene WT1 at levels similar to those in leukemia cells. *BR. J. Haematol.* 116: 409-420
- Hosen, N., Shirakata, T., Nishida, S., Yanagihara, M., Tsuboi, A., Kawakami, M., Oji, Y., Okabe, M., Tan, B., Sugiyama, H., Weissman, I.L. (2007): The Wilms' tumor gene WT1-GFP knock-in mouse reveals the dynamic regulation of WT1 expression in normal and leukemic hematopoiesis. *Leukemia* 21: 1783-1791
- Hossain, A., Saunders, G.F. (2001): The human sex-determining gene SRY is a direct target of Wt1. *J. Biol. Chem.* 276: 16817-16823
- Hu, Q., Gao, F., Tian, W., Ruteshouser, E.C., Wang, Y., Lazar, A., Stewart, J., Strong, L.C., Behringer, R.R., Huff, V. (2011): Wt1 ablation and Igf2 upregulation in mice result in Wilms tumors with elevated ERK1/2 phosphorylation. *The Journal of Clinical Investigation.* 121 (1): 174-183
- Huang, A., Campbell, C.E., Bonetta, L., McAndrews-Hill, M.S., Chilton-MacNeill, S., Coppes, M.J., Law, D.J., Feinberg, A.P., Yeager, H., Williams, B.R.G. (1990): Tissue, developmental, and tumor-specific expression of divergent transcripts in Wilms tumor. *Science* 250: 991-994
- Huber, A.H., Nelson, W.J., Weis, W.I. (1997): Three-dimensional structure of the armadillo repeat region of beta-catenin. *Cell* 90: 871-882
- Huff, V. (1998): Wilms tumor genetics. *Am. J. Med. Genet.* 79:260-267
- Huff, V. (2011): Wilms' tumours: about tumour suppressor genes, an oncogene and a chameleon gene. *Nature reviews* 11: 111-121
- Hugo, H., Ackland, M.L., Blick, T., Lawrence, M.G., Clements, J.A., Williams, E.D., Thompson, E.W. (2007): Epithelial-Mesenchymal and Mesenchymal-Epithelial Transitions in Carcinoma Progression. *J. Cell. Physiol.* 213: 374-383
- Ijpenberg, A., Perez-Pomares, J.M., Guadix, J.A., Carmona, R., Portillo-Sanchez, V., Macias, D., Hohstein, P., Miles, C.M., Hastie, N.D., Munoz-Chapuli, R. (2007): Wt1 and retinoic acid signaling are essential for stellate cell development and liver morphogenesis. *Dev. Biol.* 312 (1): 157-170
- Inoue, K., Sugiyama, H., Ogawa, H., Kakagawa, M., Yamagami, T., Miwa, H., Kita, K., Hiraoka, A., Masaoka, T., Nasu, K. (1994): WT1 as a new prognostic factor and a new marker for the detection of minimal residual disease in acute leukemia. *Blood* 84: 3071-3079
- Inoue, K., Ogawa, H., Yamagami, T., Soma, T., Tani, Y., Tatekawa, T., Oji, Y., Tamaki, H., Kyo, T., Dohy, H., Hiraoka, A., Masaoka, T., Kishimoto, T., Sugiyama, H. (1996): Long-term follow-up of minimal residual disease in leukemia patients by monitoring WT1 (Wilms tumor gene) expression levels. *Blood* 88: 2267-2278
- Kaufman, M.H. (1994): *The Atlas of Mouse Development.* 2. Auflage. Academic Press London
- Katoh, M. (2005): WNT/PCP signaling pathway and human cancer (review). *Oncol. Rep.* 14 (6): 1583-1588

- Kim, M.K.-H., Mc Garry, T.J., O'Broin, P., Flatow, J.M., Golden, A.A.-J., Licht, J.D. (2009): An integrated genome screen identifies the Wnt signaling pathway as a major target of WT1. *PNAS* 106 (27): 11154-11159
- King-Underwood, L., Little, S., Baker, M., Clutterbuck, R., Delassus, S., Enver, T., Lebozer, C., Min, T., Moore, A., Schedl, A., Pritchard-Jones, K. (2005): Wt1 is not essential for hematopoiesis in the mouse. *Leukemia Research* 29: 803-812
- Kirschner, K., Wagner, N., Wagner, K.-D., Wellmann, S., Scholz, H. (2006): The Wilms Tumor Suppressor Wt1 Promotes Cell Adhesion through Transcriptional Activation of the $\alpha 4$ integrin Gene. *Journal of Biological Chemistry* 281 (42): 31930-31939
- Kirschner, K., Sciesielski, L.K., Scholz, H. (2010): Wilms' tumour protein Wt1 stimulates transcription of the gene encoding vascular endothelial cadherin. *Eur. J. Physiol.*
- Kistner, A., Gossen, M., Zimmermann, F., Jerecic, J., Ullmer, C., Lübbert, H., Bujard, H. (1996): Doxycycline-mediated quantitative and tissue-specific control of gene expression in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 10933-10938
- Knudson, A.G.Jr., Strong, L.C. (1972): Mutation and cancer: a model for Wilms' tumor of the kidney. *J. Natl. Cancer Inst.* 48: 313-324
- Knudson, C.M., Tung, K.S., Tourtelotte, W.G., Brown, G.A., Korsmeyer, S.J. (1995): Bax-deficient mice with lymphoid hyperplasia and male germ cell death. *Science* 270: 96-99
- Koesters, R., Ridder, R., Kopp-Schneider, A., Betts, D., Adams, V., Niggli, F., Briner, J., von Knebel Doeberitz, M. (1999): Mutational activation of the β -Catenin proto-oncogene is a common event in the development of Wilms' tumors. *Cancer Res.* 59: 3880-3882
- Koesters, R., Niggli, F., von Knebel Doeberitz, M., Stallmach, T. (2003): Nuclear accumulation of beta-Catenin protein in Wilms' tumours. *J. Pathol.* 199: 68-76
- Kraus, C., Liehr, T., Hülsken, J., Behrens, J., Birchmeier, W., Grzeschik, K.H., Ballhausen, W.G. (1994): Localization of the Human β -Catenin Gene (CTNNB1) to 3p21: A Region Implicated in Tumor Development. *Genomics* 21 (1): 272-274
- Kreidberg, J.A., Sariola, H., Loring, J.M., Maeda, M., Pelletier, J., Housman, D., Jaenisch, R. (1993): WT-1 is Required for Early Kidney Development. *Cell* 74: 679-691
- Krestel, H.E., Mayford, M., Seeburg, P.H., Sprengel, R. (2001): A GFP-equipped bidirectional expression module well suited for monitoring tetracycline-regulated gene expression in mouse. *Nucleic Acids Res.* 29 (7): E39
- Kuhn, R., Schwenk, F., Aguet, M., Rajewsky, K. (1995): Inducible gene targeting in mice. *Science* 269: 1427-1429
- Kumaravelu, P., Hook, L., Morrison, A.M., Ure, J., Zhao, S., Zuyev, S., Ansell, J., Medvinsky, A. (2002): Quantitative developmental anatomy of definitive aorta-gonad-mesonephros (AGM) region and the yolk sac in colonization of the mouse embryonic liver. *Development* 129: 4891-4899
- Ladomery, M.R., Slight, J., McGhee, S., Hastie, N.D. (1999): Presence of WT1, the Wilms' tumor suppressor gene product, in nuclear Poly (A)+ ribonucleoprotein. *Journal of Biological Chemistry* 274: 36520-36526

- Laity, J.H., Dyson, H.J., Wright, P.E. (2000): Molecular basis for modulation of biological function by alternate splicing of the Wilms' tumor suppressor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 11932-11935
- Lakso, M, Sauer, B., Mosinger, B. Jr., Lee, E.J., Manning, R.W., Yu, S.H., Mulder, K.L., Wesphal, H. (1992). Targeted oncogene activation by site-specific recombination in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 6232-6236
- Lancaster, M.A., Gleeson, J.G. (2010): Cystic kidney disease: the role of Wnt signaling. *Cell Press* 16 (8): 349-360
- Larsson, S.H., Charlier, J.P., Miyagawa, K., Engelkamp, D., Rassoulzadegan, M., Ross, A., Cuzin, F., van Heyningen, V., Hastie, N.D. (1995): Subnuclear localization of Wt1 in splicing or transcription factor domains is regulated by alternative splicing. *Cell* 81: 391-401
- Lee, S.B., Huang, K., Palmer, R., Truong, V.B., Herzlinger, D., Kolquist, K.A., Wong, J., Paulding, C., Yoon, S.K., Gerald, W., Oliner, J.D., Haber, D.A. (1999): The Wilms' tumor suppressor WT1 encodes a transcriptional activator of amphiregulin. *Cell* 98:663-673
- Li, L., Yuan, H., Weaver, C.D., Mao, J., Farr, G.H., Sussman, D.J., Jonkers, J., Kimelman, D., Wu, D. (1999): Axin and Frat1 interact with dvl and GSK, bridging Dvl to GSK in Wnt-mediated regulation of LEF-1. *EMBO J.* 18: 4233-4240
- Li, C.M., Kim, C.E., Margolin, A.A., Guo, M., Zhu, J., Mason, J.M., Hensle, T.W., Murty, V.V.V.S., Grundy, P.E., Fearon, E.R., D'Agati, V., Licht, J.D., Tycko, B. (2004): CTNNB1 Mutations and Overexpression of Wnt/ β -Catenin Target Gene in WT1-Mutant Wilms' Tumors. *American Journal of Pathology* 6 (165): 1943-1953
- Li, Q., Ishikawa, T., Oshima, M., Taketo, M.M. (2005): The Threshold Level of Adenomatous Polyposis Coli Protein for Mouse Intestinal Tumorigenesis. *Cancer Res.* 65 (19): 8622-8627
- Little, M. H., Williamson, K. A., Mannens, M., Kelsey, A., Gosden, C., Hastie, N.D., van Heyningen, V. (1993): Evidence that WT1 mutations in Denys-Drash syndrome patients may act in a dominant-negative fashion. *Human Molecular Genetics* 2: 259-264
- Little, M., Wells, C. (1997): A clinical overview of WT1 gene mutations. *Hum. Mutat.* 9: 209-225
- Liu, H.P., Gao, Z.H., Cui, S.X., Sun, D.F., Wang, Y., Zhao, C.R., Lou, H.X., Qu, X.J. (2012): Inhibition of intestinal adenoma formation in APC (Min/+) mice by Riccardin D, a natural product derived from liverwort plant *Dumortiera hirsute*. *PLoS One.* 7 (3): e33243
- Logan, C.Y., Nusse, R. (2004): The Wnt signaling in development and disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 20: 781-810
- Maiti, S., Alam, R., Amos, C.I., Huff, V. (2000 a): Frequent association of β -Catenin and WT1 mutations in Wilms tumors. *Cancer Res.* 60: 6288-6292
- Major, M.B., Camp, N.D., Berndt, J.D., Yi, X., Goldenberg, S.J., Hubbert, C., Biechele, T.L., Gingras, A.-C., Zheng, N., MacCoss, M.J., Angers, S., Moon, R.T. (2007): Wilms Tumor Suppressor WTX Negatively Regulates WNT/ β -Catenin Signaling. *Science* 316: 1043-1046
- Maretto, S., Cordenonsi, M., Dupont, S., Braghetta, P., Broccoli, V., Hassan, A.B., Volpin, D., Bressan, G.M., Piccolo, S. (2003): Mapping Wnt/ β -catenin signaling during mouse development and colorectal tumors. *Developmental Biology* 100 (6): 3299-3304

- Markus, M.A., Heinrich, B., Raitskin, O., Adams, D.J., Mangs, H., Goy, C., Lodomery, M., Sperling, R., Stamm, S., Morris, B.J. (2006): WT1 interacts with splicing protein RBM4 and regulates its ability to modulate alternative splicing *in vivo*. *Experimental Cell Research* 31 (17): 3379-3388
- Martinez-Estrada, O.M., Lettice, L.A., Essafi, A., Guadix, J.A., Slight, J., Velecela, V., Hall, E., Reichmann, J., Devenney, P.S., Hohenstein, P., Hosen, N., Hill, R.E., Munoz-Chapuli, R., Hastie, N.D. (2010): Wt1 is required for cardiovascular progenitor cell formation through transcriptional control of Snail and E-Cadherin. *Nature genetics* 42 (1): 89-95
- Maurer, U., Weidmann, E., Karakas, T., Hoelzer, D., Bergmann, L. (1997): Wilms tumor gene (wt1) mRNA is equally expressed in blast cells from acute myeloid leukemia and normal CD34+ progenitors. *Blood* 90:4230-4232
- Maw, M.A., Grundy, P.E., Millow, L.J., Eccles, M.R., Dunn, R.S., Smith, P.J., Feinberg, A.P., Law, D.J., Paterson, M.C., Telzerow, P.E. (1992): A third Wilms' tumor locus on chromosome 16q. *Cancer Res.* 52: 3094-3098
- Mayo, M.W., Wang, C.Y., Drouin, S.S., Madrid, L.V., Marshall, A.F., Reed, J.C., Weissman, B.E., Baldwin, A.S. (1999): WT1 modulates apoptosis by transcriptionally upregulating the bcl-2 proto-oncogene. *EMBO J.* 18: 3990-4003
- McCrea, P.D., Turck, C.W., Gumbiner, B. (1991): A homolog of the armadillo protein in *Drosophila* (plankoglobin) associated with E-Cadherin. *Science* 254: 1359-1361
- McElreavey, K., Fellous, M. (1999): Sex determination and the Y chromosome. *Am. J. Med. Genet.* 89: 176-185
- Medvinsky, A., Rybtsov, S., Taoudi, S. (2011): Embryonic origin of the adult hematopoietic system: advances and questions. *Development* 138: 1017-1031
- Meeks, J.J., Russell, T.A., Jeffs, B., Huhtaniemi, I., Weiss, J., Jameson, J.L. (2003): Leydig Cell-Specific Expression of DAX1 Improves Fertility of the Dax1-Deficient Mouse. *Biology of Reproduction* 69: 154-160
- Meng, X., Lindahl, M., Hyvonen, M.E., Parvinen, M., de Rooij, D.G., Hess, M.W., Raatikainen-Ahokas, A., Sainio, K., Rauvala, H., Lakso, M., Pichel, J.G., Westphal, H., Saarma, M., Sariola, H. (2000): Regulation of cell fate decision of undifferentiated spermatogonia by GDNF. *Science* 287: 1489-1493
- Menssen, H.D., Renkl, H.J., Rodeck, U., Maurer, J., Notter, M., Schwartz, S., Reinhardt, R., Thiel, E. (1995): Presence of Wilms' tumor gene (wt1) transcripts and the WT1 nuclear protein in the majority of human acute leukemias. *Leukemia* 9: 1060-1067
- Merill, B.J., Gat, U., DasGupta, R., Fuchs, E. (2001): Tcf3 and Lef1 regulate lineage differentiation of multipotent stem cells in skin. *Genes Dev.* 15: 1688-1705
- Mikkola, H.K., Fujiwara, Y., Schlaeger, T.M., Traver, D., Orkin, S.H. (2003): Expression of CD41 marks the initiation of definitive hematopoiesis in the mouse embryo. *Blood* 101: 508-516
- Miyagawa, K., Hayashi, Y., Fukuda, T., Mitani, K., Hirai, H., Kamiya, K. (1999): Mutations of the WT1 Gene in Childhood Nonlymphoid Hematological Malignancies. *Genes, Chromosomes & Cancer* 25: 176-183

- Miyoshi, K., Shillingford, J.M., Le Provost, F., Gounari, F., Bronson, R., von Boehmer, H., Taketo, M.M., Cardiff, R.D., Henninghausen, L., Khazaie, K. (2002): Activation of β -Catenin signaling in differentiated mammary secretory cells induces transdifferentiation into epidermis and squamous metaplasias. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 99: 219-224
- Miwa, H., Beran, M., Saunders, G.F. (1992): Expression of the Wilms' tumor gene (WT1) in human leukemias. *6*: 405-409
- Moffet, P., Bruening, W., Nakagama, H., Bardeesy, N., Housman, D.E., Pelletier, J. (1995): Antagonism of Wt1 activity by protein self-association. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 11105-11109
- Moore, A.W., Schedl, A., McInnes, L., Doyle, M., Hecksher-Sorensen, J., Hastie, N.D. (1998): YAC transgenic analysis reveals Wilm' tumour 1 gene activity in the proliferating coelomic epithelium, developing diaphragm and limb. *Mech. Dev.* 79 (1-2): 169-184
- Morrison, A.A., Rebecca, L.V., Lodomery, M.R. (2008): The post-transcriptional roles of WT1, a multifunctional zinc-finger protein. *Elsevier* 1785: 55-62
- Mueller, R.F. (1994): The Denys-Drash syndrome. *J. Med. Genet.* 31: 471-477
- Mundlos, S., Pelletier, J., Darveau, A., Bachmann, M., Winterpacht, A., Zabel, B. (1993): Nuclear localization of the protein encoded by Wilms' tumor gene Wt1 in embryonic and adult tissues. *Development* 119: 1329-1341
- Münsterberg, A., Lovell-Badge, R. (1991): Expression of the mouse anti-müllerian hormone gene suggests a role in both male and female sexual differentiation. *Development.* 113: 613-624
- Niemann, C., Owens, D.M., Hulsken, J., Birchmeier, W., Watt, F.M. (2002): Expression of Δ NLef1 in mouse epidermis results in differentiation of hair follicles into squamous epidermal cysts and formation of skin tumours. *Development* 129: 95-109
- Nollet, T., Berx, G., Moelmans, F., van Roy, P. (1996): Genomic organization of the human beta-Catenin gene (CTNNB1). *Genomics* 32 (3) 353-362
- North, T.E., de Bruijn, M.F.T.R., Stacy, T., Talebian, L., Lind, E., Robin, C., Binder, M., Dziernak, E., Speck, N.A. (2002): Runx1 Expression Marks Long-Term Repopulating Hematopoietic Stem Cells in the Midgestation Mouse Embryo. *Immunity* 16: 661-672
- Ogawa, O., Eccles, M.R., Szeto, J., McNoe, L.A., Yun, K., Maw, M.A., Smith, P.J., Reeve, A.E. (1993): Relaxation of insulin-like growth factor II gene imprinting implicated in Wilms' tumour. *Nature* 362: 749-751
- Oikawa, M., Abe, M., Kurosawa, H., Hida, W., Shirato, K., Sato, Y. (2001): Hypoxia induces transcription factor ETS-1 via the activity of hypoxia-inducible factor-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 289: 39-43
- Okubo, T., Hogan, B.L. (2004): Hyperactive Wnt signaling changes the developmental potential of embryonic lung endoderm. *J. Biol.* 3:11
- Orban, P.C., Chui, D., Marth, J.D. (1992): Tissue- and site-specific DNA recombination in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 6861-6865
- Palmer, R.E., Kotsianti, A., Cadman, B., Boyd, T., Gerald, W., Haber, D.A. (2001): WT1 regulates the expression of the major glomerular podocyte membrane protein podocalyxin. *Curr. Biol.* 11: 1805-1809

- Papaoiannou, M.D., Pitetti, J.L., Ro, S., Park, C., Aubry, F., Schaad, O., Vejnar, C.E., Kuhne, F., Descombes, P., Zdobnov, E.M., McManus, M.T., Guillou, F. et.al. (2009): Sertoli cell Dicer is essential for spermatogenesis in mice. *Dev. Biol.* 326: 250-259
- Papayannpoulou, T., Craddock, C., Nakamoto, B., Priestley, G.V., Wolf, N.S. (1995): The VLA4/VCAM-1 adhesion pathway defines contrasting mechanisms of lodgement of transplanted murine hemopoietic progenitors between bone marrow and spleen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 9647-9651
- Park, S., Bernard, A., Bove, K.E., Sens, D.A., Hazen-Martin, D.J., Garvin, A.J., Haber, D.A. (1993): Inactivation of *Wt1* in nephrogenic rests, genetic precursors to Wilms' tumor. *Nature Genetics* 5: 363-367
- Park, S.Y., Meeks, J.J., Raverot, G., Pfaff, L.E., Weiss, J., Hammer, G.D., Jameson, J.L. (2005): Nuclear receptors *Sf1* and *Dax1* function cooperatively to mediate somatic cell differentiation during testis development. *Development* 132: 2415-2423
- Park, C.H., Chang, J.Y., Hahm, E.R., Park, S., Kim, H.K., Yang, C.H. (2005): Quercetin, a potent inhibitor against beta-catenin/Tcf signaling in SW480 colon cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 328 (1): 227-234
- Paschka, P., Marcucci, G., Ruppert, A.S., Whitman, S.P., Mrozek, K., Maharry, K., Langer, C., Baldus, C.D., Zhao, W., Powell, B.L., Baer, M.R., Carroll, A.J., Caligiuri, M.A., Koltz, J.E., Larson, R.A., Bloomfield, C.D (2008): Wilms' tumor 1 gene mutations independently predict poor outcome in adults with cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a cancer and leukemia group B study. *J. Clin. Oncol.* 26: 4595-4602
- Pelengaris, S., Khan, M. (2003): The many faces of c-Myc. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 416: 129-136
- Pelletier, J., Bruening, W., Kashtan, C.E., Mauer, S.M., Manivel, J.C., Striegel, J.E., Houghton, D.C., Junien, C., Habib, R., Fouser, L., Fine, R.N., Silverman, B.L., Haber, D.A., Housman, D. (1991 a): Germline mutations in the Wilms' tumor suppressor gene are associated with abnormal urogenital development in Denys-Drash syndrome. *Cell* 67: 437-447
- Pelletier, J., Schalling, M., Buckler, A.J., Rogers, A., Haber, D.A., Glase, T., Housman, D.E. (1991 b): *WT1* mutations contribute to abnormal genital system development and hereditary Wilms' tumour. *Nature* 353: 431-434
- Pelletier, J., Schalling, M., Buckler, A.J., Rogers, A., Haber, D.A., Housman, D. (1991 c): Expression of the Wilms' tumor gene *WT1* in the murine urogenital system. *Genes Develop.* 5: 1345-1356
- Pendergrass, T.W. (1976): Congenital anomalies in children with Wilms' tumor. *Cancer* 37: 403-408
- Pepling, M.F., Spradling, A.C. (2001): Mouse ovarian germ cell cysts undergo programmed breakdown to form primordial follicles. *Dev. Biol.* 234: 339-351
- Perotti, D., Gamba, B., Sardells, M., Spreafico, F., Terenziani, M., Collini, P., Pession, A., Nantron, M., Fossati-Bellani, F., Radice, P. (2008): Functional inactivation of the *WTX* gene is not frequent in Wilms' tumors. *Oncogen* 27: 4625-4632
- Pizzo, P.A., Poplack, D.G. (1993): Principles and Practice of Pediatric Oncology. 2. Edition 1993. J.B. Lippincott Company

- Polakis, P. (1999): The oncogenic activation of beta-catenin. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 9: 15-21
- Polakis, P (2000): Wnt signaling and cancer. *Genes & Development.* 14: 1837-1851
- Priestley, G.V., Scott, L.M., Ulyanova, T., Papayannopoulou, T. (2006): Sustained alternations in biodistribution of stem/progenitor cells in Tie2Cre+ alpha (f/f) mice are hematopoietic cell autonomous. *Blood* 107: 2959-2967
- Pritchard-Jones, K., Fleming, S., Davidson, D., Bickmore, W., Proteus, D., Gosden, C., Bard, J., Buckler, A., Pelletier, J., Housman, D., Van Heyningen, V., Hastie, N. (1990): The candidate Wilms' tumor gene is involved in genitourinary development. *Nature* 346: 194-197
- Qian, C.N., Knol, J., Igarashi, P., Lin, F., Zylstra, U., The, B.T., Williams, B.O. (2005): Cystic renal neoplasia following conditional inactivation of Apc in mouse renal tubular epithelium. *J. Biol. Chem.* 280: 3938-3945
- Que, J., Wilm, B., Hasegawa, H., Wang, F., Bader, D., Hogan, B.L.M. (2008): Mesothelium contributes to vascular smooth muscle and mesenchym during lung development. *PNAS* 43: 16626-16630
- Rackley, R.R., Flenniken, A.M., Kuriyan, N.P., Kessler, P.M., Stoler, M.H., Williams, B.R. (1993): Expression of the Wilms' tumour suppressor gene WT1 during mouse embryogenesis. *Cell Growth Differ.* 4 (12): 1023-1031
- Rance, T.F. (1814): Case of fungus haematodes of the kidneys. *Med. Phys. J.* 32: 19-25
- Ratelade, J., Arrondel, C., Hamard, G., Garbay, S., Harvey, S., Biebuyck, N., Schulz, H., Hastie, N., Pontoglio, M., Gubler, C., Antignac, C., Heidet, L. (2009): A murine model of Denys-Drash Syndrome reveals novel transcriptional targets of Wt1 in podocytes. *Humane Molecular Genetics* 19 (1): 1-15
- Rauscher, F.J., Morris, J.F., Tournay, O.E., Cook, D.M., Curran, T. (1990): Binding of the Wilms' tumor locus zinc finger protein to the EGR-1 consensus sequence. *Science* 250: 1259-1262
- Reya, T., Duncan, A., Ailles, L., Domen, J., Scherer, D., Willert, K., Hintz, L., Nusse, R., Weissman, I.L. (2003): A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature* 423: 409-414
- Richard, D.J., Schumacher, V., Royer-Pokora, B., Roberts, S.G.E (2001): Par4 is a coactivator for a splice isoform-specific transcriptional activation domain in WT1. *Genes & Development* 15: 328-339
- Richards, J.S., Fan, H-Y., Liu, Z., Tsoi, M., Lague, M.-N., Boyer, A., Boerboom, D. (2011): Either *Kras* activation or *Pten* loss similarly enhance the dominant-stable CTNNB1-induced genetic program to promote granulose cell tumor development in the ovary and testis. *Oncogene* 1-17
- Rivera, M.N., Haber, D.A. (2005): Wilms' Tumor: Connecting tumorigenesis and organ development in the kidney. *Nature reviews* 5: 699-712
- Rivera, T.F., Kim, W.J., Wells, J., Driscoll, D.R., Brannigan, B.W., Han, M., Kim, J.C., Feinberg, A.P., Gerald, W.L., Vargas, S.O., Chin, L., Iafrate, A.J., Bell, D.W., Haber, D.A. (2007): An X chromosome gene, WTX, is commonly inactivated in Wilms tumor. *Science* 315: 642-645

- Rivera, M.N., Kim, W.J., Wells, J., Stone, A., Burger, A., Coffman, E.J., Zhang, J., Haber, D.A. (2009): The tumor suppressor WTX shuttles to the nucleus and modulates WT1 activity. *PNAS* 1-6
- Robin, C., Ottersbach, K., Durand, C., Peeters, M., Vanes, L., Tybulewicz, V., Dzierzak, E. (2006): An unexpected role for IL-3 in the embryonic development of hematopoietic stem cells. *Dev.Cell* 11: 171-180
- Rose, E.A., Glaser, T., Jones, C., Smith, C.L., Lewis, W.H., Call, K.M., Minden, M., Champagne, E., Bonetta, L., Yeger, H., Housman, D. (1990): Complete physical map of the WAGR region of 11p13 localizes a candidate Wilms' tumor gene. *Cell* 60: 495-508
- Ruiz-Herguido, C., Guiu, J., D'Altri, T., Ingles-Esteve, J., Dzierzak, E., Espinosa, L., Bigas, A. (2012): Hematopoietic stem cell development requires transient Wnt/ β -catenin activity. *J. Exp. Med.* 209 (8): 1457-1468
- Ruteshouser, E.C., Robinson, S.M., Huff, V. (2008): Wilms tumor genetics: mutations in WT1, WTX, and CTNNB1 account for only about one-third of tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 47: 461-470
- Ryan, G., Steel-Perkins, V., Morris, J.F., Rauscher, F.J., Dressler, G.R. (1995): Repression of Pax-2 by WT1 during normal kidney development. *Development* 121: 867-875
- Rybtsov, S., Sobiesiak, M., Taoudi, S., Souilhol, C., Senserrich, J., Liakhovitskaia, A., Ivanovs, A., Frampton, J., Zhao, S., Medvinsky, A. (2011): Hierarchical organization and early hematopoietic specification of the developing HSC lineage in the AGM region. *JEM* 208 (6): 1305-1315
- Saadi-Kheddoui, S., Berrebi, D., Romagnolo, B., Cluzeaud, F., Peuchmaur, M., Kahn, A., Vandewalle, A., Perret, C. (2001): Early development of polycystic kidney disease in transgenic mice expressing an activated mutant of the β -catenin gene. *Oncogene* 20: 5972-5981
- Saam, J.R., Gordon, J.I. (1999): Inducible gene knockouts in the small intestinal and colonic epithelium. *J. Biol. Chem.* 274: 38071-38082
- Sadler, T.W. (2008): *Medizinische Embryologie*. 11. Auflage. Georg Thieme Verlag
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A. (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989): *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
- Sanchez, M.J., Holmes, A., Miles, C., Dzierzak, E. (1996): Characterization of the first definitive hematopoietic stem cells in the AGM and liver of the mouse embryo. *Immunity* 5: 513-525
- Satoh, Y., Nakadate, H., Nakagawachi, K., Joh, K., Masaki, Z., Uozumi, J., Kaneko, Y., Mukai, T., Soejima, H. (2006): Genetic and epigenetic alterations on the short arm of chromosome 11 are involved in a majority of sporadic Wilms' tumours. *British Journal of Cancer* 95: 541-547
- Sarnhorst, V., van der Eb, A.J., Jochemsen, A.G. (2001): WT1 proteins: functions in growth and differentiation. *Gene* 273: 141-161
- Schedl, A., Hastie, N.D. (2000): Cross-talk in kidney development. *Current Opinion in Genetics and Development* 10: 543-549

- Schedl, A. (2007): Renal abnormalities and their development origin. *Nature reviews* 8: 791-801
- Schmidt, A., Tief, K., Foletti, A., Hunziker, A., Penna, D., Hummler, E., Beermann, F. (1998): LacZ Transgenic mice to monitor gene expression in embryo and adult. *Brain Research Protocols* 3(1) 54-60
- Schumacher, V., Schneider, S., Figge, A., Wildhardt, G., Harms, D., Schmidt, D., Weirich, A., Ludwig, R., Royer-Pokora, B. (1997): Correlation of germ-line mutations and two-hit inactivation of the WT1 gene with Wilms' tumors of stromal-predominant histology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94: 3972-3977
- Scotting, P.J., Walker, D.A., Perilongo, G. (2005): Childhood solid tumours: a developmental disorder. *Nature reviews* 5: 481-488
- Shalaby, F., Ho, J., Stanford, W.L., Fischer, K.D., Schuh, A., Schwartz, L., Bernstein, A., Rossant, J. (1997): A requirement for flk-1 in primitive and definitive hematopoiesis and vasculogenesis. *Cell* 89: 981-990
- Shetty, G., Shao, S.H., Weng, C.C. (2008): p53-dependent apoptosis in the inhibition of spermatogonial differentiation in juvenile spermatogonial depletion (Utp14bjsd) mice. *Endocrinology* 149: 2773-2781
- Simons, M., Gloy, J., Ganner, A., Bullerkotte, A., Bashkurov, M., Krönig, C., Schermer, B., Benzing, T., Cabello, O.A., Jenny, A., Mlodzik, M., Polok, B., Driever, W., Obara, T., Walz, G. (2005): Inversin, the gene product mutated in nephronophthisis type II, functions as a molecular switch between WNT signaling pathways. *Nat. Genet.* 37: 537-543
- Soriano, P. (1999): Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nat. Genet.* 21 (1): 70-71
- Sparks, A.B., Morin, P.J., Vogelstein, B., Kinzler, K.W. (1998): Mutational analysis of the APC/beta-catenin/Tcf pathway in colorectal cancer. *Cancer Res.* 58: 1130-1134
- Steenman, M.J. *et al.* (1994): Loss of imprinting of IGF2 is linked to reduced expression and abnormal methylation of H19 in Wilms' tumour. *Nature Genet.* 7: 433-439
- Summers, K., Stevens, J., Kakkas, I., Smith, M., Smith, L.L., Macdougall, F., Cavenagh, J., Bonnet, D., Young, B.D., Lister, T.A., Fitzgibbon, J. (2007): Wilms' tumour 1 mutations are associated with FLT3-ITD and failure of standard induction chemotherapy in patients with normal karyotype AML. *Leukemia* 21: 550-551
- Tanwar, P.S., Kaneko-Tarui, T., Zhang, L., Rani, P., Taketo, M.M., Teixeira, J. (2010): Constitutive WNT/Beta-Catenin Signaling in Murine Sertoli Cells Disrupts Their Differentiation and Ability to Support Spermatogenesis. *Biology of reproduction* 82: 422-432
- Tashiro, E., Tsuchiya, A., Imoto, M. (2007): Functions of cyclin D1 as an oncogene and regulation of cyclin D1 expression. *Cancer Sci.* 98 (5): 629-635
- Teixeira, J., Maheswaran, S., Donahoe, P.K. (2001): Mullerian-inhibiting substance: an instructive developmental hormone with diagnostic and possible therapeutic applications. *Endocr. Rev.* 22: 657-674
- Urlinger, S., Baron, U., Thellmann, M., Hasan, M.T., Bujard, H., Hillen, W. (2000): Exploring the sequence space for tetracycline-dependent transcriptional activators: novel mutations yield expanded range and sensitivity. *Proc. Natl. Acad. U.S.A.* 97 (14): 7963-7968

- Vainio, S., Lin, Y. (2002): Coordinating early kidney development: lessons from gene targeting. *Nature Rev. Genet.* 3: 533-543
- Vallin, J., Thuret, R., Giacomello, E., Faraldo, M.M., Thiery, J.P., Broders, F. (2001): Cloning and characterization of three *Xenopus* slug promoters reveal direct regulation by Lef/beta-Catenin signaling. *J. Biol. Chem.* 276: 30350-30358
- Varan, A. (2008): Wilms' Tumor in Children: An Overview
- Voeller, H.J., Truica, C.I., Gelmann, E.P. (1998): Beta-catenin mutations in human prostate cancer. *Cancer Res.* 58: 2520-2523
- Wagner, K.D., Wagner, N., Vidal, V.P., Schley, G., Wilhelm, D., Schedl, A., Englert, C., Scholz, H. (2002): The Wilms' tumor gene *Wt1* is required for normal development of the retina. *EMBO J.* 21 (6): 1398-1405
- Wagner, N., Wagner, K.D., Xing, Y., Scholz, H., Schedl, A. (2004): The major podocyte protein nephrin is transcriptionally activated by the Wilms' tumor suppressor WT1. *J. Am. Soc. Nephrol.* 15: 3044-3051
- Wagner, N., Wagner, K.D., Hammes, A., Kirschner, K.M., Vidal, V.P., Schedl, A., Scholz, H. (2005): A splice variant of the Wilms' tumour suppressor *Wt1* is required for normal development of the olfactory system. *Development* 132 (6): 1327- 1336
- Wagner, K.D., Wagner, N., Guo, J.K., Elger, M., Dallman, M.J., Bugeon, L., Schedl, A. (2006): An inducible mouse model for PAX2-dependant glomerular disease: insights into a complex pathogenesis. *Curr. Biol.* 16: 793-800
- Wagner, N., Michiels, J.F., Schedl, A., Wagner, K.D. (2008): The Wilms' tumour suppressor WT1 is involved in endothelial cell proliferation and migration: expression in tumour vessels in vivo. *Oncogene* 1-11
- Wallingford, J.B., Habas, R. (2005): The developmental biology of Dishevelled: an emerging protein governing cell fate and cell polarity. *Development* 132: 4421-4436
- Wang, Z., Qui, Q., Deuel, T. (1993): The Wilms' tumor gene product WT1 activates or suppresses transcription through separate functional domains. *Journal of Biological Chemistry* 268: 9172-9175
- Wang, D., Dai, C., Li, Y., Liu, Y. (2011): Canonical Wnt/ β -Catenin signaling mediates transforming growth factor- β 1-driven podocyte injury and proteinuria. *Kidney international* 1159-1169
- Wegert, J., Wittmann, S., Leuschner, I., Geissinger, E., Graf, N., Gessler, M. (2009): WTX inactivation is a frequent, but late event in Wilms tumors without apparent clinical impact. *Genes Chromosomes Cancer* 48: 1102-1111
- Welsch, U., Sobotta, J. (2006): *Lehrbuch Histologie – Zytologie, Histologie, mikroskopische Anatomie.* Elsevier, Urban & Fischer Verlag, München
- Wilhelm, D., Englert, C. (2002): The Wilms tumor suppressor WT1 regulates early gonad development by activation of Sf1. *Genes Dev.* 16: 1839-1851
- Wilm, B., Ipenberg, A., Hastie, N.D., Burch, J.E., Bader, D.M. (2005): The serosal mesothelium is a major source of smooth muscle cells of the gut vasculature. *Development and disease* 132: 5317-5328

Wilms, M. (1899): Die Mischgeschwülste der Niere. Leipzig, A. Georgi, pp 1-90

Wodarz, A., Nusse, R. (1998): Mechanisms of WNT signaling in development. *Annual Reviews in Cell and Developmental Biology* 14: 59-88

Wright, K., Wilson, P., Morland, S., Campbell, I., Walsh, M., Hurst, T., Ward, B., Cummings, M., Chenevix-Trench, G. (1999): Beta-catenin mutation and expression analysis in ovarian cancer: Exon 3 mutations and nuclear translocation in 16 % of endometrioid tumours. *Int. J. Cancer*. 82: 625-629

www.ensembl.org

www.stanford.edu/~rnusse/wntwindow.html

Yang, Y., Jeanpierre, C., Dressler, G.R., Lacoste, M., Niaudet, P., Gubler, M.C. (1999): WT1 and PAX-2 podocyte expression in Denys-Drash syndrome and isolated diffuse mesangial sclerosis. *Am. J. Pathol.* 54: 181-192

Yang, A.H., Chen, J.Y., Chen, B.F. (2004): The dysregulated glomerular cell growth in Denys-Drash syndrome. *Virchows Arch.* 445: 305-314

Yokomizo, T., Dzierzak, E. (2010): Three-dimensional cartography of hematopoietic clusters in the vasculature of whole mouse embryos. *Development* 137: 3651-3661

Yost, C., Torres, M., Miller, J.R., Huang, E., Kimelman, D., Moon, R.T. (1996): The axis-inducing activity, stability, and subcellular distribution of beta-catenin is regulated in *Xenopus* embryos by glycogen synthase kinase 2. *Gene Dev.* 10: 1443-1454

Zeng, X., Tamai, K., Doble, B., Li, S., Huang, H., Habas, R., Okamura, H., Woodgett, J., He, X. (2005): A dual-kinase mechanism for Wnt co-receptor phosphorylation and activation. *Nature* 438: 873-877

Zirn, B., Samans, B., Wittmann, S., Pietsch, T., Leuschner, I., Graf, N., Gessler, M. (2006): Target genes of the WNT/beta-Catenin pathway in Wilms tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 45: 565-574

Zhou, B., Qing, M., Rajagopal, S., Wu, S.M., Domian, I., Rivera-Feliciano, J., Jiang, D., von Gise, A., Ikeda, S., Chien, K.R., Pu, W.T. (2008): Epicardial progenitors contribute to the cardiomyocyte lineage in the developing heart. *Nature* 10: 1-5

Zovein, A.C., Turlo, K.A., Ponec, R.M., Lynch, M.R., Chen, K.C., Hofmann, J.J., Cox, T.C., Gasson, J.C., Iruela-Arispe, M.L. (2010): Vascular remodeling of the vitelline artery initiates extravascular emergence of hematopoietic clusters. *Blood* 116: 3435-3444

7. Anhang

7.1 Lebenslauf

Name: Christoph David Steinwender
Geboren am: 03.01.1981 in Wiesbaden
Familienstand: verheiratet, 1 Kind
Staatsangehörigkeit: deutsch

Adresse:

Email:

Telefon:

Schulische Ausbildung

1987 bis 1991 Grundschule Nordenstadt

1991 bis 2000 Oranienschule Wiesbaden; Allgemeine Hochschulreife

Praktikum

07/2000 bis 10/2000 Humangenetische Praxis von Dr. med. E. Schwaab, Wiesbaden

Zivildienst

11/2000 bis 09/2001 Arbeiter-Samariter-Bund (ASB), Wiesbaden; Rettungshelfer im Rettungsdienst

Hochschulausbildung

10/2001 bis 06/2007 Studium der Biologie an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz (Diplom)

Währenddessen von 07/2004 bis 06/2005 Teilnehmer des SOKRATES/ERASMUS-Programms der Europäischen Union (Lund, Schweden)

Von 05/2006 bis 09/2006 mündliche Diplomprüfungen:

Fächer: Genetik, Pharmakologie, Botanik

Ab 10/2006 bis 06/2007 experimentelle Diplomarbeit:

Durchgeführt im Forschungslabor der Urologischen Klinik der Universitätsmedizin Mainz in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. W. Brenner

Thema: Die Rolle des Tumorsuppressors PTEN in der Progression und Metastasierung des klarzelligen Nierenzellkarzinoms

Währenddessen von 11/2006 bis 04/2007 Stipendiat des Förderstipendiums der Johannes Gutenberg-Universität

Beruflicher Werdegang

10/2007 bis 09/2008

Beginn der experimentellen Doktorarbeit im molekular-genetischen Labor der Kinderklinik der Universitätsmedizin Mainz in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. B. Zabel

10/2008 bis heute

Weiterführung der experimentellen Doktorarbeit im molekular-genetischen Labor der Klinik für Allgemeine Kinderheilkunde und Jugendmedizin des Universitätsklinikums Freiburg in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. B. Zabel

Thema: Untersuchung der physiologischen Rolle des Wilms-Tumorgens 1 (*WT1*) im Rahmen der Generierung muriner *in vivo*-Modelle für die Wilms-Tumorerkrankung

Fertigstellung der Promotion: 11/2012

Berufliche Weiterbildung

07/2008

Fortbildung: Versuchstierkundliches Praktikum der ZVTE Mainz

7.2 Publikationen

Artikel

Lausch, E., Hermanns, P., Farin, H.F., Alanay, Y., Unger, S., Nikkel, S., **Steinwender, C.**, Scherer, G., Spranger, J., Zabel, B., Kispert, A., Superti-Furga, A. (2008): TBX15 mutations cause craniofacial dysmorphism, hypoplasia of scapula and pelvis, and short stature in Cousin syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 83 (5): 649-655

Schneider, E., Keppler, R., Prawitt, D., **Steinwender, C.**, Roos, F.C., Thüroff, J.W., Lausch, E., Brenner, W. (2011): Migration of renal tumor cells depends on dephosphorylation of Shc by PTEN. *Int. J. Oncol.* 38 (3): 823-831

Kongressbeiträge

Lausch, E., Keppler, R., **Steinwender, C.**, Unger, S., Spranger, J., Superti-Furga, A., Zabel, B.: The role of matrix metalloproteinases in growth and endochondral ossification. *Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik 2010 (Hamburg)*

Steinwender, C., Fees, S., Spangenberg, C., Prawitt, D., Bockamp, E., Keppler, R., Reicherter, K., Zabel, B., Lausch, E.: Wt1 is a stem cell factor in early haematopoiesis. *Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik 2011 (Regensburg)*

Keppler, R., Reutzel, D., Bockamp, E., **Steinwender, C.**, Reicherter, K., Zabel, B., Lausch, E.: VHL and PTEN act cooperatively in tumor suppression. *Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik 2011 (Regensburg)*

Reicherter, K., Lausch, E., Hollander, S., Keppler, R., **Steinwender, C.**, Welting, T.J.M., Zabel, B.: Do RMRP mutations affect telomerase function? *Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik 2011 (Regensburg)*

Steinwender, C., Fees, S., Spangenberg, C., Prawitt, D., Bockamp, E., Keppler, R., Reicherter, K., Zabel, B., Lausch, E.: A conditional mouse model for granulosa cell tumour driven by Wt1. *European Human Genetics Conference 2012 (Nürnberg)*

Keppler, R., **Steinwender, C.**, Reicherter, K., Zabel, B., Lausch, E.: The additional effect of VHL and PTEN mutations in tumour development. *European Human Genetics Conference 2012 (Nürnberg)*

Reicherter, K., Lausch, E., Hermanns, P., Keppler, R., **Steinwender, C.**, Welting, T.J.M., Zabel, B.: The mutation makes the difference – Analysis of RMRP transcript levels in Cartilage-hair hypoplasia. *European Human Genetics Conference 2012 (Nürnberg)*

7.3 Danksagung

7.4 Erklärung

Ich versichere hiermit, die vorliegende Arbeit selbstständig und nur mit den angegebenen Quellen und Hilfsmitteln angefertigt zu haben.

Christoph Steinwender