

**Ansatz zur Generierung einer
konditionalen, reversiblen
Wt1 k.o.-Maus**

Dissertation zur Erlangung des Grades
,Doktor der Naturwissenschaften'

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

Stephan A. Fees
geboren in Heilbronn

Mainz, 2006

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 19.12. 2006

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	VIII
Tabellenverzeichnis.....	X
Abkürzungen.....	XI
Aminosäuren-Code.....	XIII
1. EINLEITUNG	1
1.1 Die Maus in der Genetik	1
1.2 Transgene Mausmodelle in der Krebsforschung	5
1.3 Der Wilms-Tumor	8
1.3.1 Allgemeines.....	8
1.3.2 Syndrome.....	10
1.3.3 Genetik.....	11
1.3.4 Gene.....	12
1.3.5 Histologie.....	17
1.3.6 Expression.....	20
1.3.7 Wt1-Mausmodelle.....	23
1.4 Ziel der Arbeit	25
2. MATERIAL & METHODEN	28
2.1 Material & Reagenzien	28
2.1.1 Chemikalien.....	28
2.1.2 Puffer & Lösungen.....	28
2.1.3 Enzyme.....	31
2.1.4 Kits.....	31
2.1.5 Plasmide & Vektoren.....	31
2.1.6 Größenstandards.....	31
2.1.7 BAC-Klone.....	31
2.1.8 Bakterienstämme.....	32
2.1.9 Radioisotope.....	32
2.1.10 Verbrauchsmaterialien.....	32
2.1.11 Histologie.....	32
2.1.12 Zellkulturmaterialien.....	33
2.1.13 Tiere.....	33
2.1.14 Geräte.....	33
2.1.15 Oligonukleotidsequenzen.....	35
2.2 DNA-Standardmethoden	38
2.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen.....	38
2.2.2 Isolierung von genomischer DNA aus Zellkulturen.....	38
2.2.3 Quantifizierung von Nukleinsäuren.....	39
2.2.4 Aufreinigung von DNA-Fragmenten.....	39
2.2.5 Fällung von DNA.....	39
2.2.6 Agarose-Gelelektrophorese.....	40
2.2.7 Wiedergewinnung von DNA aus Agarose-Gelen.....	40
2.2.8 Transfer von DNA auf Filtermembranen.....	40
2.2.8.1 <i>Southern Blot</i>	40
2.2.8.2 <i>Dot Blot</i>	41
2.2.9 Sequenzierung von DNA.....	41
2.2.10 Analyse von DNA-Sequenzen.....	42

2.3	Klonierung von DNA-Fragmenten	42
2.3.1	Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen	42
2.3.2	Auffüllen von überhängenden DNA-Enden	43
2.3.3	Vektorvorbereitung und Dephosphorylierung von Vektorenden	43
2.3.4	Ligation	44
2.3.5	Herstellung chemokompetenter Bakterien nach Hanahan	45
2.3.6	Herstellung elektrokompetenter Bakterien	45
2.3.7	Errechnen der Transformationskompetenz von Bakterien	45
2.3.8	Transformation von Bakterien mittels Hitzeschock	46
2.3.9	Transformation von Bakterien mittels Elektroporation	46
2.3.10	Selektion und Analyse transformierter Bakterien	46
2.3.11	Herstellung von Bakterien-Dauerkulturen (Glycerinkulturen)	47
2.4	Splinkerette-Methode	47
2.5	RNA-Standardmethoden	48
2.5.1	Isolierung von RNA aus Geweben	48
2.5.2	Isolierung von RNA aus Zellkulturen	49
2.5.3	Entfernung genomischer DNA aus RNA-Präparationen	49
2.5.4	Transfer von RNA auf Filtermembranen (<i>Northern Blot</i>)	49
2.6	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)-Techniken	50
2.6.1	Standard-PCR	50
2.6.2	<i>Expand</i> -PCR	50
2.6.3	<i>In vitro</i> -Mutagenese	51
2.6.4	Reverse Transkription (RT)	52
2.6.5	Quantitative <i>real time</i> -PCR	52
2.7	Hybridisierungstechniken auf Filtermembranen	53
2.7.1	Radioaktive Markierung von Sonden	53
2.7.2	DNA/DNA-Hybridisierung (<i>Southern</i> -Hybridisierung)	53
2.7.3	<i>Dot Blot</i> -Hybridisierung	54
2.7.4	DNA/RNA-Hybridisierung (<i>Northern</i> -Hybridisierung)	54
2.8	Arbeiten mit Proteinen	54
2.8.1	Luziferase-Assay	54
2.9	Zellbiologische Arbeiten	55
2.9.1	Verwendete Zellen	55
2.9.2	Kultivierung von Zellen	55
2.9.3	Einfrieren und Auftauen von Zellen	56
2.9.4	Transiente Transfektion	56
2.10	Zytogenetische Methoden	56
2.10.1	Präparation von Metaphase-Chromosomen aus der murinen Milz	56
2.10.2	Chromosomen-Spreitung	57
2.10.3	Fluoreszenz <i>in situ</i> -Hybridisierung (FISH)	57
2.10.3.1	DNA Fluoreszenz-Markierung (Nick-Translation)	57
2.10.3.2	Hybridisierung	58
2.10.3.3	Waschschritte	59
2.10.3.4	Auswertung der Hybridisierung mit digitaler Bildverarbeitung	59
2.11	Arbeiten mit Mäusen	59
2.11.1	Durchführung	59
2.11.2	Isolierung genomischer DNA aus Mausschwanz-Biopsien	60
2.11.3	Altersbestimmung pränataler Mausembryonen	60
2.11.4	Präparation von Mausembryo-Fibroblasten (MEF)	61
2.11.5	Analyse muriner embryonaler Stammzellen (ES-Zellen)	61

2.12	Histologische Methoden	62
2.12.1	Gefrierschnitte (Kryodünnschnitte).....	62
2.12.2	X-Gal-Färbung.....	62
2.12.3	Kernechtrot-Färbung	62
2.12.4	H/E-Färbung.....	63
3.	ERGEBNISSE	64
3.1	Responder-Mäuse (Wt1-Resp).....	65
3.1.1	Herstellung der <i>Responder</i> -Konstrukte	65
3.1.2	Generierung transgener <i>Responder</i> -Mäuse	68
3.1.3	Identifizierung transgener <i>Founder</i> -Tiere	69
3.1.4	Etablierung und Zucht der <i>Responder</i> -Linien	70
3.1.5	Charakterisierung der Linien <i>Wt1-Resp1</i> und <i>Wt1-Resp2</i>	72
3.1.5.1	Überprüfung der basalen Expression des <i>Wt1</i> -Transgens	72
3.1.5.2	Untersuchung der Induzierbarkeit in MEF-Assays	73
3.1.5.3	Untersuchung der Induzierbarkeit der Linie <i>Wt1-Resp1</i> mit Effektor-Mäusen ...	77
3.2	Effektor-Mäuse (<i>Wt1-tTA^{+/-}</i>)	81
3.2.1	Generierung von <i>k.o./k.i.</i> -Mäusen	81
3.2.2	Herstellung der Effektor-Konstrukte	84
3.2.3	Effektor-Konstrukt <i>Wt1-targ1</i>	84
3.2.4	Datenbankanalysen zur Aufklärung des murinen <i>Wt1</i> -Lokus	85
3.2.5	Generierung des Effektor-Konstruktes <i>Wt1-targ2</i>	86
3.2.6	Identifizierung homolog rekombinierter ES-Zellklone.....	89
3.2.7	Blastozysten-Injektion der verifizierten ES-Zellen.....	94
3.2.8	Exzision der <i>Neo^{fllox}</i> -Resistenzkassette	96
3.2.9	Charakterisierung der <i>Wt1</i> -Effektor-Mauslinie <i>Wt1-tTA^{+/-}</i> (WE2).....	98
3.2.9.1	Beleg eines <i>Wt1</i> -knock out durch die Integration des tTA-Effektors	98
3.2.9.2	Untersuchungen zum Zustand des 3'-Homologiebereiches im rekombinierten <i>Wt1</i> -Lokus.....	100
3.2.9.3	Nachweis der tTA-Expression in adulten <i>Wt1-tTA^{+/-}</i> -Mäusen.....	106
3.2.10	Charakterisierung der WE2-Linie durch Kreuzung mit Reporter-Mäusen.....	108
3.2.10.1	Untersuchung der tTA-Expression in WE2/LC1-Mäusen	109
3.2.10.2	Analyse der tTA-Gewebespezifität und Dox-abhängigen Regulierbarkeit der Reportergenaktivität in WE2/LZ-Mäusen	112
3.2.10.3	Nachweis <i>Wt1</i> -spezifischer tTA-Expression in der murinen Ontogenese.....	119
3.2.11	<i>Wt1 k.o. Rescue</i> -Versuche.....	126
4.	DISKUSSION	128
4.1	<i>Wt1-Responder</i>-Mäuse.....	129
4.1.1	Generierung der Konstrukte und Herstellung der transgenen Mäuse	129
4.1.2	Zucht der <i>Responder</i> -Linien.....	131
4.1.3	<i>Wt1 k.o. Rescue</i> -Versuche.....	132
4.2	<i>Wt1</i>-Effektor-Mäuse	137
4.2.1	Herstellung der Effektor-Linie	137
4.2.2	Effektor-Konstrukt und homologe Rekombination in ES-Zellen.....	137
4.2.3	Verifizierung transformierter ES-Zellen und falsche 3'-Rekombination	139
4.2.4	Aufklärung der Rekombination in der Effektor-Linie WE2.....	141
4.2.5	Charakterisierung der WE2-Effektor-Linie	144
4.2.5.1	Funktionelle <i>Wt1</i> -Inaktivierung (k.o.) durch tTA-Integration (k.i.).....	144
4.2.5.2	<i>Wt1</i> -spezifische tTA-Expression in WE2-Mäusen.....	145
4.2.5.3	tTA-Expression auf zellulärer Ebene und Dox-abhängige Regulierbarkeit von Reportergenen in adulten Mäusen	148
4.2.5.4	<i>Wt1</i> -spezifische tTA-Expression in der murinen Ontogenese.....	150
4.2.6	Überlegungen zur Rolle von <i>Wt1</i> in fetalen und adulten Geweben	155
4.3	Ausblick.....	159

5. ZUSAMMENFASSUNG	163
6. LITERATUR	165
7. ANHANG	185
7.1 Lebenslauf.....	185
7.2 Publikationen	187
7.3 Danksagung	189
7.4 Erklärung	191

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis:

Abbildungen:

Abb. 1.1:	Schematische Darstellung der Herstellung eines konditionalen Mausmodells mittels <i>Cre/lox</i> -System	3
Abb. 1.2:	Funktion des <i>Tet on/off</i> -Systems	7
Abb. 1.3:	Wilms-Tumor	9
Abb. 1.4:	WT1 – Region, Lokus, Gen, RNA, Protein	14
Abb. 1.5:	Kanonische WNT-Signalkaskade	16
Abb. 1.6:	Histologische Präparate von Wilms-Tumoren	17
Abb. 1.7:	Metanephrogenese	18
Abb. 1.8:	Strukturen der Niere	19
Abb. 1.9:	<i>Wt1</i> -Expression in der murinen Embryonalentwicklung	21
Abb. 1.10:	Herstellung einer konditionalen <i>Wt1</i> k.o.-Maus auf Basis des <i>Tet on/off</i> -Systems	26
Abb. 2.1:	<i>Splinkerette</i> -PCR	47
<i>RESPONDER</i> -Mäuse		
Abb. 3.1:	Strategie zur Generierung einer konditionalen <i>Wt1</i> k.o.-Maus	65
Abb. 3.2:	Herstellung der <i>Responder</i> -Konstrukte	66
Abb. 3.3:	Expressionsplasmide <i>pWt1-Resp2</i> und <i>pWt1-Resp1</i>	67
Abb. 3.4:	Analyse der <i>Responder</i> -Linien	69
Abb. 3.5:	PCR-Genotypisierung transgener <i>Founder</i> und deren Nachkommen	70
Abb. 3.6:	<i>Southern Blot</i> Genotypisierung der Mauslinien <i>Wt1-Resp1</i> und <i>Wt1-Resp2</i>	70
Abb. 3.7:	<i>Dot Blot</i> zur Identifizierung transgener Nachkommen	71
Abb. 3.8:	ZVTE-Homozygotenzucht von <i>Wt1-Resp1</i>	71
Abb. 3.9:	RT-PCR zur Untersuchung der basalen Expression von transgenem <i>Wt1</i> in den <i>Responder</i> -Linien <i>Wt1-Resp1</i> und <i>Wt1-Resp2</i>	73
Abb. 3.10:	MEF-Assay RT-PCR von <i>CMV-rtTA/Wt1-Resp1</i> Embryonen	74
Abb. 3.11:	Nachweis alternativer Spleißprodukte von Exon 9 in der transgenen <i>Wt1</i> -RNA	75
Abb. 3.12:	Ergebnisse des MEF-Assay der Mauslinie <i>Wt1-Resp2</i>	76
Abb. 3.13:	Fluoreszenzmikroskopie transient transfizierter MEF-Kulturen von <i>Wt1-Resp2</i>	77
Abb. 3.14:	Expressionsstärken der (<i>rtTA</i> -Transgene in den Effektor-Mäusen	79
Abb. 3.15:	Untersuchung der Induzierbarkeit von <i>CMV-rtTA/Wt1-Resp1</i> Mäusen	80
Abb. 3.16:	Untersuchung der Induzierbarkeit von <i>LAP-tTA/Wt1-Resp1</i> Mäusen	80
<i>EFFEKTOR</i> -Mäuse		
Abb. 3.17:	Schema zur Modifikation eines Gen-Lokus mit Hilfe von homologer Rekombination	82

Abb. 3.18:	Herstellungsprinzip von <i>k.o./k.i.</i> -Mäusen	83
Abb. 3.19:	<i>Wt1</i> -Lokus (nach Kreidberg)	84
Abb. 3.20:	Muriner <i>Wt1</i> -Lokus	86
Abb. 3.21:	Effektor/Targeting-Konstrukt <i>Wt1-targ2</i> (linear)	88
Abb. 3.22:	<i>Wt1-targ2</i> Plasmidkarte	88
Abb. 3.23:	Homologe Rekombination von <i>Wt1-targ2</i> in den <i>Wt1</i> -Loku	90
Abb. 3.24:	<i>Southern Blot</i> -Hybridisierung ES-Zellklone	91
Abb. 3.25:	<i>Expand</i> -PCR zum Nachweis der homologen Rekombination des <i>Wt1-targ2</i> Konstruktes in ES-Zellen	92
Abb. 3.26:	Sequenzierungsergebnisse der PCR-Produkte zur Kontrolle der homologen Rekombination in ES-Zellen	93
Abb. 3.27:	Nachweis der Keimbahntransmission (KTM) des Effektor-Konstruktes <i>Wt1-targ2</i> in I.A11 Agouti-Mäusen	95
Abb. 3.28:	Untersuchungen zum Zustand der 3'-Rekombination in der Maus #1 KTM	95
Abb. 3.29:	Genotypisierung WE1/ <i>Sycp-Cre</i> -Mäuse	97
Abb. 3.30:	Nachweis der <i>Neo</i> -Exzision in WE1-Mäusen	97
Abb. 3.31:	Nachweis eines heterozygoten <i>Wt1-k.o.</i> in der Effektor-Linie WE2	99
Abb. 3.32:	Ausgangsinformation bezüglich der Integration des <i>Wt1</i> -Effektor-Konstruktes in den <i>Wt1</i> -Lokus	101
Abb. 3.33:	Ergebnisse der <i>Splinkerette</i> -PCR	102
Abb. 3.34:	<i>Splinkerette</i> Kontroll-PCR zur Verifizierung des 3'-Bruchpunktes	102
Abb. 3.35:	Rekombinanter <i>Wt1</i> -Lokus nach <i>Splinkerette</i> -PCR	103
Abb. 3.36:	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen einer FISH zur Charakterisierung des rekombinanten <i>Wt1</i> -Lokus	104
Abb. 3.37:	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Hybridisierung von <i>Wt1-tTA^{+/-}</i> -Chromosomen mit 10 Kb-Sonden	105
Abb. 3.38:	<i>Northern Blot</i> zur <i>tTA</i> -Expression in Geweben von adulten WE2-Mäusen	107
Abb. 3.39:	Nachweis der <i>Luziferase</i> -Expression in Geweben von WE2/LC1-Mäusen	111
Abb. 3.40:	X-Gal-Färbung auf Kryoschnitten der Niere von WE2/LZ-Mäusen	113
Abb. 3.41:	X-Gal-Färbung auf Kryoschnitten der Hoden von WE2/LZ-Mäusen	114
Abb. 3.42:	X-Gal-Färbung auf Kryoschnitten der Samenblase von WE2/LZ-Mäusen	114
Abb. 3.43:	X-Gal-Färbung auf Kryoschnitten des Ovars von WE2/LZ-Mäusen	115
Abb. 3.44:	X-Gal-Färbung auf Kryoschnitten des Uterus von WE2/LZ-Mäusen	116
Abb. 3.45:	X-Gal-Färbung negativer Gewebe aus WE2/LZ-Mäusen	116
Abb. 3.46:	X-Gal-Färbung auf Kryoschnitten von dtg WE2/LZ-Embryonen der Stadien E12,5 <i>dpc</i> und E14,5 <i>dpc</i>	117
Abb. 3.47:	X-Gal-Färbung auf Kryoschnitten der Niere von WE2/LC1/RLZ-Mäusen	120
Abb. 3.48:	X-Gal-Färbung auf Kryoschnitten der Hoden von WE2/LC1/RLZ-Mäusen	121
Abb. 3.49:	X-Gal-Färbung auf Kryoschnitten der Samenblase von WE2/LC1/RLZ-Mäusen	122
Abb. 3.50:	X-Gal-Färbung auf Kryoschnitten des Ovars von WE2/LC1/RLZ-Mäusen	122
Abb. 3.51:	X-Gal-Färbung auf Kryoschnitten des Uterus von WE2/LC1/RLZ-Mäusen	123

Abb. 3.52:	X-Gal-Färbung auf Kryoschnitten der Harnblase von WE2/LC1/RLZ-Mäusen.....	123
Abb. 3.53:	X-Gal-Färbung auf Kryoschnitten von WE2/LC1/RLZ-Mäusen.....	124
Abb. 3.54:	X-Gal-Färbung in Gefäßen von WE2/LC1/RLZ-Mäusen.....	125
Abb. 3.55:	X-Gal-Färbung in Peritonealepithelien von WE2/LC1/RLZ-Mäusen.....	126
Abb. 4.1:	Vereinfachte Darstellung der in die Gonadalentwicklung involvierten Signalwege.....	133
Abb. 4.2:	Rekombinanter <i>Wt1</i> -Lokus und mögliche Inversion.....	142
Abb. 4.3:	<i>Splinkerette</i>	143
Abb. 4.4	Funktionen von WT1 im Organismus.....	157

Tabellen:

Tabelle 3.1:	Effektor-Mäuse.....	78
Tabelle 3.2:	Verifizierung ES-Zellklone.....	91
Tabelle 3.3:	BAC-Klone zur Charakterisierung der <i>Wt1</i> -Region.....	104
Tabelle 3.4:	Ausgewählte Organe für die Charakterisierung der Wt1-Effektor-Mauslinie WE2.....	107
Tabelle 3.5:	Reporter-Mauslinien.....	109
Tabelle 3.6:	Übersicht der Ergebnisse der X-Gal-Färbung in WE2/LZ-Mäusen.....	118

Abkürzungen

A	Adenin
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
B6	Mausstamm C57BL/6
bp	Basenpaare
BRP	Bruchpunkt
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
ca.	circa
Ci	Curie
cM	Centi Morgan
DBA	Mausstamm <i>Dilute, Brown, Non-Agouti</i>
d. h.	das heißt
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure/DNS)
DNaseI	Desoxyribonuklease I
DNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
Dox	Doxyzyklin
<i>dpc</i>	<i>days post coitum</i>
dtg	doppelt transgen
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat-Dinatriumsalz
ES-Zellen	Embryonale Stammzellen
EtOH	Ethanol
Fa.	Firma
G	Guanin
g	Gramm
h	Stunde
H ₂ O bidest	doppelt destilliertes Wasser
HA	Homologiearm
HE	Hämatoylin-Eosin
inkl.	Inklusive
Kap.	Kapitel
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
kJ	Kilojoule
<i>k.o.</i>	<i>knock out</i>
KTM	Keimbahntransmission
l	Liter
LB	Luria-Bertani
M	Molar
Max.	Maximal
mb	Megabasen
MCS	<i>Multiple Cloning Site</i>
MEF	Mausembryo-Fibroblasten

mg	Milligramm
mglw.	Möglicherweise
min	Minute
Mio.	Millionen
ml	Milliliter
<i>M. m.</i>	<i>Mus musculus</i>
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
o. g.	oben genannt
OP	<i>Outside probe</i> , Sonde
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
Resp1	<i>Wt1-Responder1</i> Mauslinie, tg <i>musWt1</i> -cDNA (+Exon 5;+/-KTS) mit Isolator
Resp2	<i>Wt1-Responder2</i> Mauslinie, tg <i>musWt1</i> -cDNA (+Exon 5;+/-KTS) ohne Isolator
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure/RNS)
RT	Raumtemperatur
rtTA	revers tetrazyklin-abhängiger Transaktivator
s.	siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
sec	Sekunde
siRNA	<i>short interfering RNA</i>
s. o.	siehe oben
sog.	sogenannt
SPF	Spezifiziert Pathogen Frei
SSW	Schwangerschaftswoche
stg	<i>single transgene</i> , einfach transgen
s. u.	siehe unten
T	Thymin
Tab.	Tabelle
Tet	Tetrazyklin
tg	Transgen
tTA	Tetrazyklin-abhängiger Transaktivator
ttg	<i>triple transgene</i> , dreifach transgen
u. a.	unter anderem
ÜN	über Nacht
upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
v. a.	vor allem
vermtl.	vermutlich
vgl.	Vergleiche
WE1	<i>Wt1</i> -Effektor-Mauslinie; <i>Wt1-tTA</i> ^{+/-} [<i>neo</i>]
WE2	<i>Wt1</i> -Effektor-Mauslinie; <i>Wt1-tTA</i> ^{+/-}
z. B.	zum Beispiel
ZVTE	Zentrale Versuchstier-Einrichtung
z. Zt.	zur Zeit

Aminosäuren: Einbuchstaben-Code

A	Alanin
C	Cystein
D	Asparaginsäure
E	Glutaminsäure
F	Phenylalanin
G	Glycin
H	Histidin
I	Isoleucin
K	Lysin
L	Leucin
M	Methionin
N	Asparagin
P	Prolin
Q	Glutamin
R	Arginin
S	Serin
T	Threonin
V	Valin
W	Tryptophan
Y	Tyrosin

1. EINLEITUNG

1.1 Die Maus in der Genetik

Im Dezember 2002 wurde die erste Draft-Sequenz des Mausgenoms durch das Mouse Genome Sequencing Consortium in der Zeitschrift Nature veröffentlicht (Nature 420: 520-562 Mouse Genome Issue). Mit einer Größe von $2,5 \times 10^9$ Basenpaaren (bp) ist es etwas kleiner als das menschliche Genom. Es werden etwa 25.000 proteincodierende Gene geschätzt, wobei zur Zeit erst etwa 21.000 annotiert sind. Zu 99 % dieser Gene findet man orthologe Sequenzen im menschlichen Genom, d. h. zu 80 % humaner Gene gibt es ein entsprechendes murines Gegenstück, 96 % davon liegen in syntänen chromosomalen Regionen. Die Sequenzanalysen ergaben eine durchschnittliche Übereinstimmung der Aminosäuresequenz von 78,5 % (Boguski 2002). Im Vergleich dazu liegt die Übereinstimmung zwischen Maus und Ratte bei 97 % (Makalowski *et al.* 1998) und die von Mensch und *C. elegans* bei 49 % (Wheelan *et al.* 1999). Mit dieser Veröffentlichung war ein weiterer Meilenstein in der Geschichte der Mausgenetik erreicht.

Allerdings war der Weg der Maus zum wichtigsten Modellorganismus für die biologisch-medizinische Forschung lang. Im Mesozoikum vor ca. 125 Mio. Jahren lebte während der unteren Kreidezeit ein gemeinsamer Vorfahre von Maus und Mensch. *Eomaia scansoria* war der früheste bekannte Vertreter der *Eutheria*-Linie (lebendgebärende Säuger) aus der die heute lebenden Plazentalier hervorgingen. Vor etwa 6 Mio. Jahren etablierte sich die Gattung *Mus*, deren Name sich von dem aus dem Sanskrit stammenden Wort ‚*mush*‘ ableitet, was soviel bedeutet wie ‚stehlen‘. Erst 8000 v. Chr. tritt die Hausmaus (*Mus musculus*) als eigene Spezies auf, die von nun an kommensal mit dem Menschen lebt.

Die *Mus musculus* Gruppe umfasst vier Subspezies (*M. m. -musculus*, *-domesticus*, *-castaneus* und *-bactrianus*), die alle in distinkten Regionen dieser Erde leben. Überraschenderweise kommt es an den Artgrenzen zu keiner räumlichen und genetischen Vermischung dieser Subspezies (Silver 1995).

Die moderne Mausgenetik beginnt um 1900 (Silver 1995, Morse 1978). Mit Abbie Lathrop (in Granby, Massachusetts/USA) züchtet zum ersten Mal jemand im großen Stil kontrolliert und dokumentiert Mäuse für kommerzielle und wissenschaftliche Zwecke. Viele der heute für die Genetik wichtigen Mauslinien, u. a. C57BL/6 und C57BL/10, gehen auf ihre Zuchten zurück (Morse 1978). Als einer der ersten Pioniere der Mausgenetik gilt William Ernest Castle, damals Leiter des *Bussey Institutes* an der Harvard Universität. Sein Labor bezog seine Versuchstiere von Lathrops Farm, um die Mendel'schen Regeln bei der Vererbung der Fellfarbe von Mäusen zu studieren. Zusammen mit

Clerence C. Little erkannte er früh die Notwendigkeit homozygoter Mauslinien für die Erforschung von Vererbungsmechanismen (Nadeau 2002). 1909 präsentierte Little dann den ersten Inzuchtstamm DBA, mit den Fellfarbenallelen *diluted*, *brown*, *non-agouti*. 1921 folgte der Stamm C57BL/6, der etwa 80 Jahre später als Grundlage für die Sequenzierung des Mausgenoms dient. Acht Jahre danach gründete Little das *Jackson Laboratory* in Bar Harbor, Maine/USA. Es ist heute das größte Zentrum der Mausforschung mit offen zugänglichen Datenbanken. Neben anderen Anbietern wie *Taconic Farms* und *Charles River Laboratories* ist es darüber hinaus auch ein kommerzieller Vertreiber von Laborstämmen.

In den folgenden Jahrzehnten werden weitere Inzuchtstämme wie C3H, CBA, BALB/c, 129 generiert, die zum Teil heute noch ihre Anwendung finden. Viele dieser Stämme werden im Hinblick auf bestimmte erwünschte Phänotypen gezüchtet. ‚*Senescence-accelerated mice*‘ (SAM) beispielsweise zeigen die Charakteristiken einer schnellen Alterung (Takeda *et al.* 1991), Linien mit auffälligen Verhaltensmustern werden vor allem in den Neurowissenschaften genutzt (Crawley *et al.* 1997). Die Empfindlichkeit von C3H- und BALB/c-Mäusen bei der Mutagenese durch *N*-Ethyl-*N*-Nitrosoharnstoff (engl.: *N-Ethyl-N-Nitroso-urea*, ENU) machen sich großangelegte Mutageneseprogramme zu Nutze (Kuraguchi *et al.* 2001, Kiernan *et al.* 2002, Srivastava *et al.* 2003). Andere Inzuchtstämme offenbarten Eigenschaften, die heute für die Techniken zur Herstellung von Transgenen und *knock out*-Mäusen von Vorteil sind. Die großen Pronuklei bei FVB-Mäusen eignen sich besonders gut für die Injektion von DNA-Konstrukten in die befruchtete Oozyte zur Generierung transgener Tiere (Taketo *et al.* 1991). Aus dem Mausstamm 129 hergestellte ES-Zelllinien haben eine hohe Frequenz bei der Keimbahntransmission und werden deshalb zur Entwicklung von *knock out* (*k.o.*)/*knock in* (*k.i.*)-Mäusen verwendet (Szabo *et al.* 1994, Auerbach *et al.* 2000).

Im Jahr 2000 waren etwas mehr als 450 Inzuchtstämme beschrieben (Beck *et al.* 2000). Die meisten dieser Laborstämme gehen auf eine kleine Gründerpopulation, möglicherweise sogar auf ein einziges Gründerpaar Anfang des 20. Jahrhunderts zurück (Wade *et al.* 2002, Nadeau 2002). Genetische Analysen zeigen, dass die große Mehrzahl der heute verwendeten klassischen Inzuchtstämme ein *M. m. musculus* Y-Chromosom trägt, das auch zwischen scheinbar voneinander unabhängigen Laborstämmen wie C57BL/6, BALB/c, 129 und SEA genetisch nicht zu unterscheiden ist (Bishop *et al.* 1985, Tucker *et al.* 1992). Ebenso stammt die mitochondriale DNA aller Inzuchtstämme zum Zeitpunkt der Untersuchung ausschließlich von einem einzigen gemeinsamen *M. m. domesticus* Weibchen als maternalem Vorfahr dieser Linien (Yonekawa *et al.* 1980, Ferris *et al.* 1982). Immer wieder werden phylogenetische Stammbäume erstellt, die den Verwandtschaftsgrad zwischen den

Mus musculus Spezies, den Laborinzuchtstämmen und der aus den 129er-Linien generierten ES-Zellen darstellen (Yonekawa *et al.* 1981, Atchley *et al.* 1991, Simpson *et al.* 1997, Prager *et al.* 1998).

Anfang der 80er Jahre gibt es die ersten Publikationen zur Anwendung von DNA-Mikroinjektion in Oozyten, aus der lebende ‚transgene‘ Mäuse hervorgehen (Gordon *et al.* 1980, Palmiter *et al.* 1982 a). 1982 veröffentlichen Palmiter und Evans dann tatsächlich die erste transgene Maus, bei der ein Fusionsgen bestehend aus dem Wachstumshormon der Ratte und der MT1-Promotorregion durch Zinkgabe differenziell reguliert werden kann (Palmiter *et al.* 1982 b). Zwischen 1987 und 1989 folgen die Gruppen von Evans, Smithies und Capecchi mit den ersten *k.o.*-Mäusen (Doetschman *et al.* 1987, Kuehn *et al.* 1987, Thomas *et al.* 1987, Mansour *et al.* 1988, Koller *et al.* 1989). Alle drei Wissenschaftler erhielten 2001 für ihre Arbeiten und Erfolge auf dem Feld des ‚*gene targeting*‘, u. a. für die Entwicklung und Etablierung der notwendigen Techniken zur Herstellung von *k.o.*-Mäusen den *Lasker Award*.

Die zweite Generation von *k.o.*-Mäusen wird zu Beginn der 90er Jahre generiert (Barinaga 1994). Sogenannte konditionale *k.o.*-Mäuse ermöglichen eine zeitliche und räumliche Kontrolle eines Zielgens. Die ersten induzierbaren Mäuse dieser Art basieren auf dem *Cre/lox*-System (Lakso *et al.* 1992, Orban *et al.* 1992, Kuhn *et al.* 1995, s. Abb. 1.1).

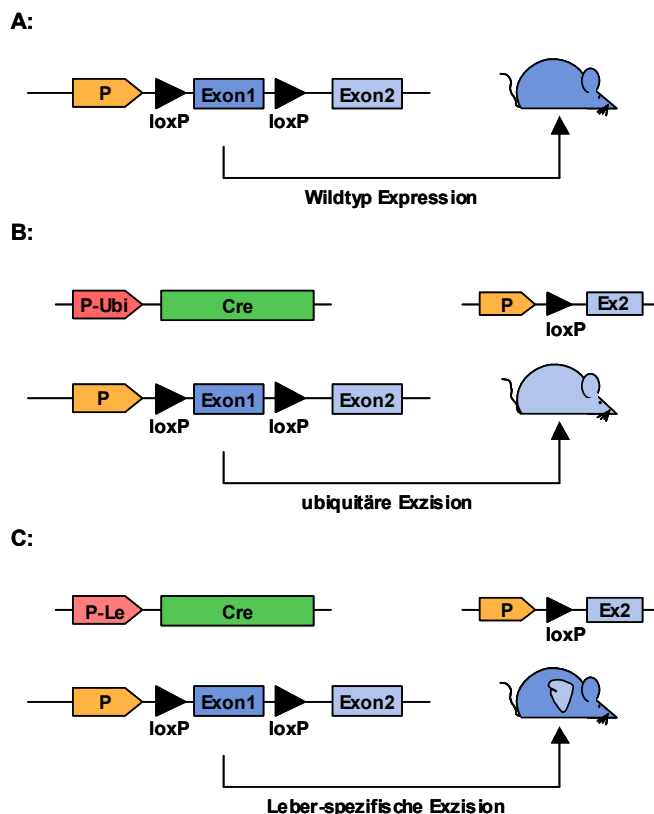


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der Herstellung eines konditionalen Mausmodells mittels Cre/lox-System.

Die Eigenschaften des Promotors zur *Cre*-Expression bedingen die räumliche und zeitliche Exzision des Exon 1 aus einem modifizierten Zielgen. **A:** Modifiziertes Zielgen, dessen erstes Exon von *loxP* (*locus of Crossing-over of P1*)-Sequenzen flankiert ist. Eine wildtypische Expression des Gens bleibt gewährleistet. **B:** Durch den Einsatz eines ubiquitär aktivierenden Promotors für die *Cre*-Rekombinase kommt es zur Exzision von Exon 1 im gesamten Organismus. Die *Cre*-Rekombinase erkennt die *loxP*-Sequenzen als Zielsequenz und entfernt die dazwischen liegenden Sequenzen aus dem Zielgen. Bei Funktionsverlust des transkribierten Restproduktes wäre dies ein konditionaler *Gene knock out*. **C:** Durch einen Leber-spezifischen Promotor kommt es zur Exzision in einem definierten Kompartiment des Organismus. Die *Cre*-Rekombinase ruft hier einen gewebe-spezifischen *knock out* ausschließlich in der Leber hervor. (P): Lokus-spezifischer Promotor, (P-Ubi): Ubiquitärer Promotor, (P-Le): Leber-spezifischer Promotor, (loxP): *Cre*-Erkennungssequenzen, (Cre): *Cre*-Rekombinase.

Zwei Jahre später folgt eine auf Tetrazyklinregulation (*Tet on/off*-System) basierende transgene Maus, bei der tetrazyklinabhängige Transaktivatoren die Expression von Reportergenen steuern (Furth *et al.* 1994). Shin *et al.* veröffentlichen dann 1999 die erste durch diese Technik gesteuerte konditionale *k.o.*-Maus, die eine zeitlich-räumliche Induzierbarkeit zusätzlich noch mit Reversibilität verbindet. Weitere induzierbare Systeme, wie die auf Hormonrezeptoren-basierenden (Brasemann *et al.* 1993, Gardner *et al.* 1996, No *et al.* 1996), und die auf der Grundlage der in *S. cerevisiae* gefundenen Flp-Rekombinase (Flp/FRT-System) arbeitenden werden zur selben Zeit entwickelt (Ludwig *et al.* 1996, Dymecki 1996).

Ein Jahr nach der Geburt des Klonschafes Dolly gelingt 1998 Wakayama und Yanagimachi die Herstellung der ersten geklonten Maus. Aufgrund der Wahl des Spenderkerns aus Cumulus-Zellen für die Injektion in die entkernte Oozyte wurde das Tier auf den Namen *Cumulina* getauft (Wakayama *et al.* 1998). 1999 bildet sich dann das *Mouse Genome Sequencing Consortium*, das zuvor Teil des *Human Genome Sequencing Consortiums* war, mit dem Ziel der Entschlüsselung des Mausgenoms.

Die Labormaus wurde über diese Zeit zum bedeutensten Modellorganismus für die Aufklärung menschlicher Krankheiten und zu einer der wichtigsten Komponenten der medizinisch-genetischen Forschung. Die Vorteile liegen auf der Hand: Als kleinstes Säugetier (25-40 g Gewicht bei 5-10 cm Körpergröße) zeigt sie starke genetische, anatomische und physiologische Parallelen zum Menschen. Dies ermöglicht es von der Embryonalentwicklung, über den Bau von Organen, deren Funktion, physiologische Vorgänge, die Reproduktion, das Verhalten, bis hin zur Untersuchung von Krankheiten die Maus als Vorlage für die Biologie beim Menschen zu nutzen (Bradley 2002). Eine relativ einfache Tierhaltung, die für Säuger sehr schnelle Generationsfolge (etwa 21 Tage Tragezeit und weitere vier Wochen bis zur Geschlechtsreife) mit vielen Nachkommen, die Zugänglichkeit des Mausgenoms für genetische Techniken (s. o.) macht die Maus zu einem idealen Modellobjekt für die Genetik und viele andere wissenschaftliche Disziplinen, in denen Tiermodelle notwendig sind.

Trotz allem beinhaltet dies auch ein enormes logistisches Problem für die Wissenschaft. Die Anzahl der Labore, die *k.o.*-Mäuse herstellen und deren Phänotypen untersuchen steigt stetig, seit die Techniken Ende der 80er Jahre etabliert wurden. Im Jahr 2002 waren schon mehr als 3000 *k.o.*-Stämme veröffentlicht und diese Zahl steigt weiter. Die potenziellen Tierzahlen werden immens hoch, nimmt man für jedes der geschätzten 30.000 Gene mindestens ein Mausmodell an. Geht man im Durchschnitt von fünf sinnvollen Mutationen pro Gen aus, handelt es sich schon um 150.000 verschiedene zu untersuchende Genotypen. Viele der *knock outs* bzw. Mutationen müssen in verschiedenen Mausstämmen untersucht werden, weil der genetische Hintergrund

Einfluss auf die Ausprägung hat (Bowers *et al.* 1999). Zusätzlich können Fragestellungen oft nur durch die Anwendung unterschiedlicher Modelle wie Transgene, konventionelle oder konditionale *knock outs*, in ausreichendem Maß beleuchtet werden. Neuere Methoden des *gene-silencing*, wie siRNA-Techniken erweitern die vorhandenen Möglichkeiten noch. Dieses Szenario macht eine Verbesserung der Methoden zur Kryokonservierung von Spermien oder Embryonen unabdingbar (Knight *et al.* 2002). Eine Tierhaltung aller möglichen Varianten mit gleichzeitiger Bereitstellung der Arbeitskräfte zur Untersuchung und Charakterisierung der Phänotypen ist gar nicht zu leisten.

Dennoch bieten nur Tiermodelle die Möglichkeit, bestimmte Fragestellungen der Entwicklung, des Verhaltens, der Physiologie und der Pathogenese am lebenden Organismus zu untersuchen. Besonders für die Krebsforschung ist die Maus ein idealer Modellorganismus. Durch gezieltes Ausschalten oder Überexprimieren mit Hilfe von Manipulationen des Genoms durch Einfügen von Mutationen kann die Rolle von Tumorsuppressor- oder Onkogenen bei der Tumorentstehung und -entwicklung, sowie ihre Bedeutung für die normalen zellulären Regelkreisläufe in Gewebeverbänden direkt analysiert werden.

1.2 Transgene Mausmodelle in der Krebsforschung

Ursprünglich wurden Tumore an Inzuchtstämmen nur bei spontanem Auftreten untersucht. Selbst die Induktion durch karzinogene Substanzen oder radioaktive Bestrahlung veränderte die Rolle der Maus in der Krebsforschung nur bedingt. Die langen Latenzzeiten bei der Tumorentstehung und die teilweise langwierigen Kopplungsanalysen zur Identifikation tumorrelevanter Läsionen waren erschwerende Bedingungen. Erst mit dem Erfolg der transgenen Techniken zu Beginn der 80er Jahre ändert sich dies. Die ersten transgenen Krebsmodelle entstanden zu dieser Zeit durch die Überexpression von viralem SV40T-Antigen sowie zellulärem *c-myc*-Onkogen in spezifischen Geweben (Brinster *et al.* 1984, Hanahan 1985, Stewart *et al.* 1984, Adams *et al.* 1985). Die Inaktivierung von typischen Tumorsuppressorgenen, wie *Rb1* und *Tp53* gelingt dagegen erst 1992 mit Hilfe von *knock outs* (Jacks *et al.* 1992, Donehower *et al.* 1992). Zum Einen sind diese Modelle, bei denen ein transgenes Onkogen, das möglicherweise noch in mehreren Kopien (*multi-copy integration*) vorliegt und ubiquitär exprimiert wird, nur bedingt geeignet die Rolle bei einer gewebespezifischen sporadischen fokalen Tumorgenese zu beschreiben. Zum Anderen verhindert die embryonale Letalität einiger homozygoter *k.o.*-Mäuse rezessiver Tumorsuppressorgene deren Verwendung als Tumormodelle. Diese Probleme konnten erst mit der Entwicklung ‚verbesserter‘

Tiermodelle umgangen werden. Die induzierbaren Modelle erlauben die gewebespezifische Aktivierung einer Mutation zu definierten Zeitpunkten in der Entwicklung. Es gibt verschiedene Ansätze zur Generierung induzierbarer konditionaler Mausmodelle (Bockamp *et al.* 2002). Dabei können dominante *gain of function*-Allele in der Maus zur Darstellung der Effekte mutierter Onkogene oder dominant-negativer Effekte entarteter Tumorsuppressorgene verwendet werden. *Loss of function*-Strategien dagegen können die Bedeutung der Deletion von Tumorsuppressoren bei der Entstehung entsprechender Tumoren einer experimentellen Untersuchung zugänglich machen. Die Fragestellung bedingt die Wahl der Methode. Die beiden am häufigsten verwendeten Ansätze zur Herstellung induzierbarer Modelle sind das *Cre/loxP*- (Lakso *et al.* 1992) und das *Tet on/off*-System (Gossen und Bujard 1992).

Auf Basis des ***Cre/loxP*-Systems** (s. Abb. 1.1) gelingt Shibata *et al.* die Herstellung einer konditionalen *k.o.*-Maus als Modell der *Apc*-vermittelten Entstehung des Kolonkarzinoms. Tiere mit von *loxP*-Sequenzen [*locus of crossing (X)-over of P1*] flankiertem Exon 14 des *Apc*-Gens entwickeln sich normal. Erst nach der Applikation eines adenoviralen Vektors zur Expression der bakteriellen *Cre*-Rekombinase ausschließlich im Kolon der transgenen Tiere kommt es zur Entwicklung von Polypen im Darm (Shibata *et al.* 1997). Die *Cre*-Rekombinase erkennt die *loxP*-Sequenzen als Zielsequenz zur Exzision des Exon 14 und bewirkt so die Inaktivierung des Tumorsuppressorgens. Giovannini *et al.* (2000) erreichen mit dem selben System die *Cre*-vermittelte Inaktivierung des *Nf2*-Gens in Schwann-Zellen und rekapitulieren so in Mäusen den Phänotyp von Patienten mit Neurofibromatose. Je nach Lage und Orientierung der *loxP*-Sequenzen lassen sich mit Hilfe des *Cre/loxP*-Systems Deletionen oder auch Inversionen (Ramirez-Solis *et al.* 1995) bzw. Translokationen zwischen nicht homologen Chromosomen hervorrufen (Smith *et al.* 1995). Buchholz *et al.* (2000) nutzen diese Möglichkeit zur Erzeugung des AML1/ETO-Fusionsproteins, das beim Menschen bei der Entstehung von akuter myeloischer Leukämie (AML) eine entscheidende Rolle spielt. Die Translokation (t8;21) verbindet die 5' gelegene *runt* DNA-Bindungs-domäne von *AML1* und das nahezu komplette *ETO*-Gen zu einem möglicherweise dominant-negativen Inhibitor der normalen Transaktivierung von AML1-Zielgenen (Nucifora *et al.* 1994, Tenen *et al.* 1997).

Das auf der Steuerung durch **Tetrazykl**ingabe basierende ***Tet on/off*-System** wurde zum ersten Mal von Furth *et al.* 1994 für die Expression von Reportergenen in Mäusen verwendet. Grundlage ist die Fusion des *Tet-Repressors* (*TetR*) aus Bakterien mit der VP16-Transaktivierungsdomäne des *Herpes simplex Virus* mit dem Ergebnis eines tetrazyklinabhängigen **Transaktivators** (***tTA***) als sogenannte Effektor-Komponente. In Abwesenheit von Tetrazyklin (bzw. seines heute verwendeten Analogons Doxizylin,

Dox) bindet dieser an eine spezifische Tet-Operator-Konsensussequenz (*TetO*). Kombiniert man diese *TetO*-Kassette mit einem Minimalpromotor, kann auf diese Weise die Expression nachgeschalteter cDNAs als *Responder*-Komponente reguliert werden (s. Abb. 1.2). Eine mutagenisierte Variante des tTA zeigt bei Doxyzyklinapplikation einen reversen Phänotyp (**rtTA**, reverser tetrazyklinabhängiger Transaktivator) (Gossen *et al.* 1995).

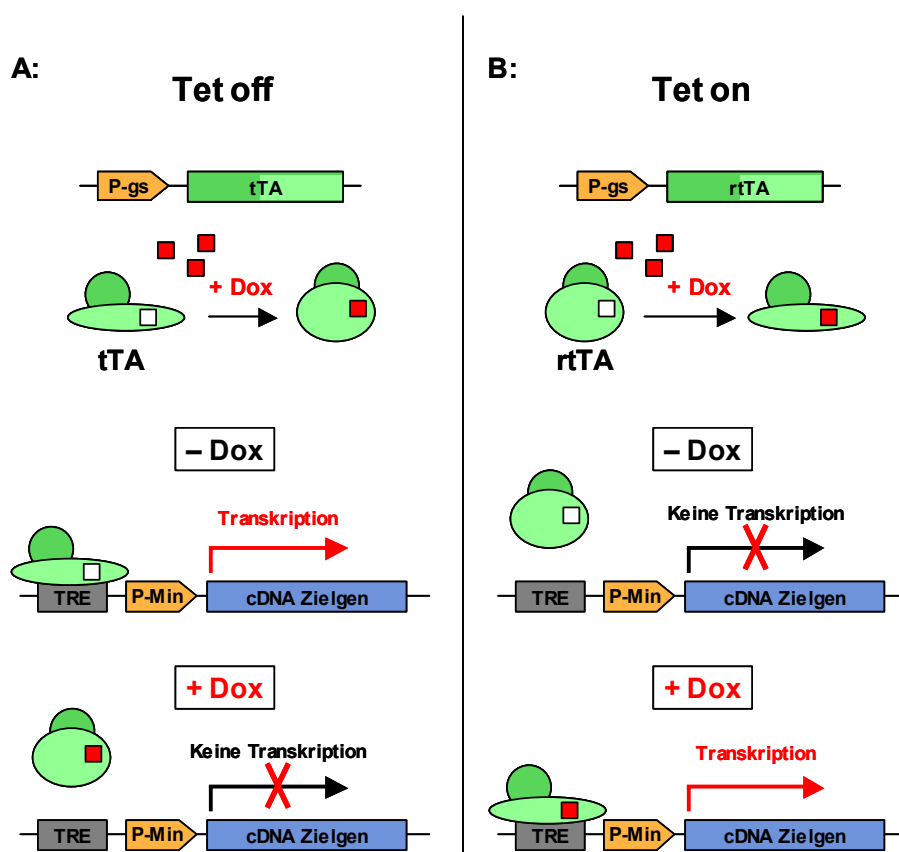


Abbildung 1.2: Funktion des Tet on/off-Systems.

Mit Hilfe des Tet-Systems lässt sich die Expression von Zielgenen in der Maus konditional steuern. Dafür sind zwei Komponenten notwendig. Der Effektor (Induktor: tTA oder rtTA) wird durch einen wählbaren, endogenen Promotor (P-gs) angetrieben, um eine gewebespezifische Expression zu gewährleisten. Der *Responder* (transgene cDNA eines Zielgens) wird von einem Minimalpromotor (P-Min) mit Tet-responsivem Element (TRE) transaktivatorabhängig gesteuert. **A:** Das **Tet off-System (tTA)** aktiviert die transgene cDNA in Abwesenheit des Liganden (Dox), da der Transaktivator so an das TRE (bestehend aus repetitiven Tet-Operator (*TetO*)-Sequenzen) binden kann. Die Applikation von Dox bewirkt eine Konformationsänderung des tTA und verhindert eine Bindung an die *TetO*-Sequenzen. Die Expression des Transgens wird abgeschaltet. **B:** Das **Tet on-System (rtTA)** zeigt einen reversen Phänotyp. Die transkriptionelle Aktivierung des Zielgens erfolgt nur bei Anwesenheit des Liganden (Dox). Die dadurch hervorgerufene Konformationsänderung erlaubt dem rtTA an TRE zu binden und die Expression der cDNA zu induzieren.

Über die folgenden Jahre erfährt dieses System grundlegende Verbesserungen. So werden zunächst die basale Aktivität des *TetOCMV*-Minimalpromotors in Abwesenheit des Effektors (tTA) unterbunden, sowie zusätzlich die bidirektionale Expression eines Reportergens ermöglicht (Baron *et al.* 1995, Kistner *et al.* 1996). Künstliche Veränderungen an den Transaktivatoren führen zur Reduktion intrazellulärer Toxizität, einer

erhöhten Dox-Sensitivität, höherer mRNA-Stabilität, deutlich verbesserter Aktivierungskinetik und somit zu einer zweiten Generation von tTAs und rtTAs (Urlinger *et al.* 2000, Valencik *et al.* 2001).

Mit der Verwendung eines rtTA-Systems zeigen Chin *et al.* (1999) die Bedeutung einer *Ras*-Expression bei der Entstehung von Melanomen in *Ink4a*-defizienten Mäusen. Unter Dox-Administration erfolgt die Expression einer mutierten *H-Ras*-Variante in der Haut, die zur Bildung von Melanomen führt. Der Entzug von Doxyzyklin und die damit verbundene Senkung der *H-Ras*-Expression führt zu deren Remission. Ähnliche Studien zeigen die Rolle von *Myc* bei hämatopoetischen Tumorerkrankungen (Felsher und Bishop 1999), sowie erneut die Funktion von *Ras* bei der Induktion und der apoptotischen Remission von Adenokarzinomen in der Lunge (Fisher *et al.* 2001). Eine ausführliche Datenbank der zur Zeit vorhandenen *tTA/rtTA*-Effektor-, *Responder*- bzw. entsprechender Reporter-Mauslinien kann unter folgender der Internetadresse eingesehen werden: <http://www.zmg.uni-mainz.de/tetmouse/index.htm>. Die dort aufgeführten Beispiele zeigen das enorme Potenzial konditionaler, reversibler Mausmodelle für die biomedizinische Forschung.

Insbesondere bei der Aufklärung der Entstehung des Wilms-Tumors spielen Mausmodelle eine Schlüsselrolle, da die aberrante Nierenentwicklung als Ausgangsort der Tumorentstehung nur durch die Untersuchung der beteiligten Gene und deren Funktion in den ungestörten Prozessen der Nephrogenese beleuchtet werden kann. Von entscheidender Bedeutung wird hier die Möglichkeit sein, zu definierten Zeitpunkten in der Embryogenese, ebenso wie im adulten Tier den Ausfall des interessierenden Gens zu simulieren. Denn wie bei keinem anderen Tumor kommt es beim Wilms-Tumor zu einer Verzahnung zwischen der normalen Entwicklung des Organs und der Pathogenese.

1.3 Der Wilms-Tumor

1.3.1 Allgemeines:

Im Jahr 1899 beschrieb Max Wilms an einem Patienten erstmalig diese bösartige Neoplasie der Niere (Scholz *et al.* 2005, s. Abb. 1.3). Der Wilms-Tumor (WT) oder auch Nephroblastom (*OMIM-ID: 194070) ist ein maligner embryonaler Nierentumor. Mit einer Inzidenz von 1 in 10.000 Lebendgeburten ist er nach dem Astrozytom und dem Neuroblastom der dritthäufigste solide Tumor bei Kindern und mit ~ 7 % eine der fünf häufigsten Krebserkrankungen im Kindesalter (Miller *et al.* 1994, Hastie *et al.* 1994).

Epidemiologische Studien zeigen ein Hauptmanifestationsalter des Tumors zwischen dem dritten und vierten Lebensjahr der Patienten (Breslow *et al.* 1993). Eine Erkrankung

nach dem zehnten Lebensjahr ist eher selten. Die meisten Wilms-Tumore entstehen unilateral und sporadisch, wobei die Patienten ein Durchschnittsalter von ~ 3,5 Jahren aufweisen. 10 % der Betroffenen dagegen entwickeln bilaterale oder multifokale Tumore, bei einem Altersdurchschnitt von ~ 2,5 Jahren (Fleming 1997). In diesen Fällen ist eine Assoziation mit komplexen genetischen Krankheitsbildern (z. B. WAGR-, Denys-Drash- und Beckwith-Wiedemann-Syndrom, s. u.) festzustellen (Stiller 2004). Nur in 2 % aller WT-Fälle ist ein familiärer Hintergrund nachgewiesen (Breslow *et al.* 1996).

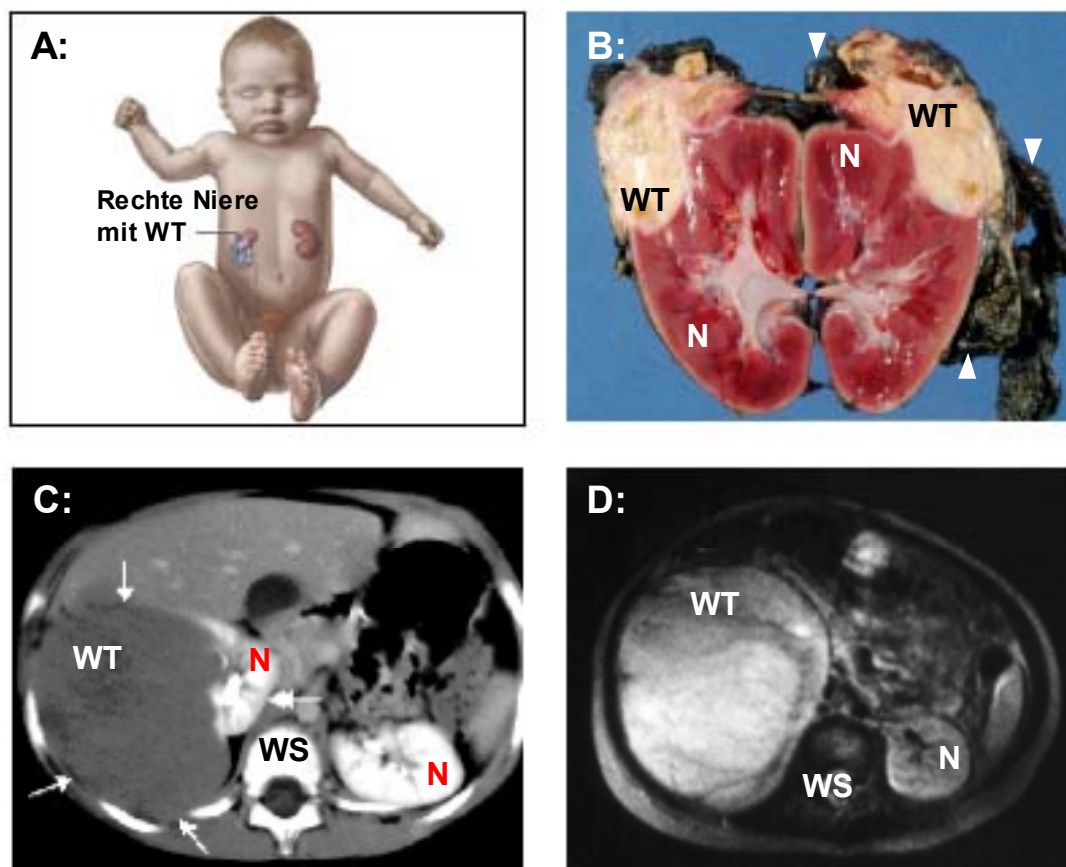


Abbildung 1.3: Wilms-Tumor.

A: Gezeigt ist ein Säugling (Schema) mit unilateralem Wilms-Tumor (WT) der rechten Niere. **B:** Präparat einer fetalen Niere mit WT nach Nephrektomie (Längsschnitt). Deutlich zu sehen sind gesundes (rotes) Nierengewebe (N) mit weißem Nierenbecken. Die Wucherung des WT links bzw. rechts oben in der Niere (weißlich/gelblich) ist ebenfalls gut zu erkennen. Weiße Pfeile markieren nekrotisches Gewebe. **C** und **D:** Radiologische Darstellung des Abdomens von Wilms-Tumor Patienten zur Verdeutlichung der Raumforderung des Tumors.

(N): Niere, (WS): Wirbelsäule, (WT): Wilms-Tumor. (**Die Abbildungen wurden den am Ende der Einleitung aufgeführten Internetseiten entnommen und bearbeitet.)

Die schnelle Entwicklung und deutlichen Verbesserungen auf dem Feld der operativen, chemotherapeutischen und nuklearmedizinischen Therapieansätze, in Verbindung mit therapieoptimierenden zentralen Studien und Richtlinien von SIOP (*Society of Pediatric Oncology*) und NWTs (*National Wilms' Tumor Study*), führten in den

letzten Jahren zu einer Überlebensrate von über 85 % bei Wilms-Tumor Patienten (Wilms' Tumor: Status Report 1990, Miller *et al.* 1994, Plesko *et al.* 2001, Rivera *et al.* 2005, Gommersall *et al.* 2005). Unabhängig davon liegen die Mechanismen, sowie die Rolle der beteiligten bzw. verantwortlichen Gene bei der Entstehung des Wilms-Tumors immer noch weitgehend im Dunkeln und bedürfen weiterer Aufklärung. Eine verlässliche Korrelation zwischen Phänotyp und genetischen Markern wäre wünschenswert, um therapeutische Maßnahmen tumor- und patientenspezifisch zu optimieren. Es könnten so akute Nebenwirkungen und Spätfolgen der Behandlung reduziert werden.

1.3.2 Syndrome:

Verschiedene Syndrome (Erkrankungen mit sehr komplexen Krankheitsbildern, bedingt durch das gleichzeitige Auftreten mehrerer genetischer Veränderungen und phänotypischer Merkmale) sind mit der Erkrankung an Wilms-Tumor assoziiert:

WAGR-Syndrom (OMIM: 194072): Die Abkürzung steht für *Wilms' tumour, aniridia, genitourinary abnormalities, mental retardation*. WAGR-Patienten leiden am Verlust der Iris (Aniridie), Defekte des Urogenitalsystems (z. B. Bauchhoden und Fehlmündung der Harnröhre), sowie geistiger Entwicklungsstörung. Circa 30 % der Betroffenen entwickeln einen Wilms-Tumor (Miller *et al.* 1964). Untersuchungen an WAGR-Patienten und positionelle Klonierungsansätze führten zur Identifizierung des *Wilms' Tumor 1*-Gens (*WT1*) (Call *et al.* 1990, Gessler *et al.* 1990). Zusätzlich konnte *PAX6* als verantwortliches Gen für die Aniridie identifiziert werden (Ton *et al.* 1991). Zytogenetische Analysen zeigen große Deletionen in der chromosomalen Region 11p13 als Ursache für das WAGR-Syndrom.

Beckwith-Wiedemann-Syndrom (BWS, OMIM: 130650): Auch *EMG-Syndrom* genannt. Das Erscheinungsbild dieses Syndroms beinhaltet **Exomphalos** (Nabelschnurbruch), **Makroglossie** (vergrößerte Zunge), **Gigantismus** (Großwuchs) und ein erhöhtes Risiko für das Auftreten verschiedener Tumore (Wiedemann 1983). Ungefähr 5 % der Patienten entwickeln Wilms-Tumore. BWS ist mit Mutationen und epigenetischen Veränderungen in der chromosomalen Region 11p15 verknüpft (Enklaar *et al.* 2006). Es werden mehrere Gene (u. a. *H19*, *IGF2*, *CDKN1C*) als beteiligt angenommen (Zhang *et al.* 1992, Ohlsson *et al.* 1993, Hatada *et al.* 1996).

Denys-Drash-Syndrom (DDS, OMIM: 194080): Als Ursache für die Entstehung konnten hier Punktmutationen in der Zinkfinger-Domäne des bereits erwähnten *WT1*-Gens identifiziert werden (Pelletier *et al.* 1991 c). Der Funktionsverlust von *WT1* ist durch einen dominant-negativen Effekt der mutierten Variante auf funktionsfähiges *WT1*-

Protein zu erklären (Little *et al.* 1993, Bardeesy *et al.* 1994, Moffet *et al.* 1995, Reddy *et al.* 1995). Als Folge davon ergeben sich schwerwiegende Urogenitaldefekte, wie Nierenversagen durch das Auftreten mesangialer Sklerose, XY-Hermaphroditismus und intersexuelle Geschlechtsorgane. Bei etwa 90 % der Betroffenen kommt es zur Entwicklung von Wilms-Tumoren.

Frasier-Syndrom (OMIM: 136680): Patienten mit Frasier-Syndrom entwickeln sehr selten einen Wilms-Tumor, sind aber ebenfalls Träger konstitutioneller *WT1*-Mutationen, die eine bestimmte Stelle des Zinkfingerbereichs betreffen (Donorspleißstellen-Mutationen in Exon 9, vgl. DDS; s. o.) und zur Ausprägung des Krankheitsbildes führen (Barbaux *et al.* 1997, Klamt *et al.* 1998). Frasier-Patienten leiden vornehmlich unter Defekten des Urogenitalsystems. Dazu gehören u. a. Nierenversagen durch eine fokale Glomerulosklerose und XY-Gonadenfehlbildungen. Darüber hinaus haben Frasier-Patienten ein erhöhtes Gonadoblastomrisiko (Moorthy *et al.* 1987).

Einige weitere Syndrome mit einem erhöhten Wilms-Tumorrisiko wurden bereits beschrieben (s. Rivera *et al.* 2005). Dazu gehören u. a. das *Simpson-Golabi-Behmel*- (Pilia *et al.* 1996, OMIM: 312870), das *Sotos*- (Hersh *et al.* 1992, OMIM: 117550), die *Fanconi Anämie Typ D1* (Tischkowitz *et al.* 2003, Reid *et al.* 2005, OMIM: 605724) und das *Perlman*-Syndrom (Henneveld *et al.* 1999, OMIM: 267000). Teilweise sind die Ursachen und beteiligten Lozi noch unbekannt bzw. unvollständig und bedürfen weiterer Untersuchungen (Übersicht: Scott *et al.* 2006, Niaudet und Gubler 2006).

1.3.3 Genetik:

Basierend auf den oben genannten Zahlen aus einer Serie epidemiologischer Studien entwickeln Knudson und Strong nach ihrer Studie zum Retinoblastom (Knudson 1971) im darauf folgenden Jahr ein ‚*Two-Hit-Model*‘ für die Entstehung des Wilms-Tumors (Knudson und Strong 1972). Dabei tragen sie der Tatsache Rechnung, dass in familiären und syndromassoziierten WT-Fällen ein vermehrtes Auftreten bilateraler Tumore bei einem früheren Entstehungsalter zu beobachten ist, als bei WT-Patienten mit unilateralen sporadischen Tumoren (s. o.). Dafür postulieren sie eine vorhandene Keimbahnmutation (erster *hit*) in einem Allel des verantwortlichen Gens (*WT1*), die zur heterozygoten Inaktivierung des Tumorsuppressorgens führt. Ihr Vorhandensein in allen Körperzellen erhöht die Wahrscheinlichkeit einer zweiten somatischen Mutation (zweiter *hit*) in der Niere und fördert so die Entstehung multifokaler bzw. bilateraler Tumore. Im Gegensatz dazu sind in Individuen ohne Prädisposition zur Inaktivierung beider Allele zwei unabhängige somatische Mutationen in der selben Zelle oder deren Nachkommen

notwendig. Dieses weitaus unwahrscheinlichere Ereignis begründet sowohl das spätere als auch das unilaterale Auftreten sporadischer Tumore.

Zusätzlich zur Erklärung der Wilms-Tumorentstehung durch das ‚*Two-Hit-Model*‘, das sicherlich die Tumorprädisposition und Initiation im Falle der WT-Genese ausgehend von der Persistenz unreifen Nierenblastems über die 36. Schwangerschaftswoche (SSW) hinaus erklärt, benötigt man ein Mehrschrittmodell, um die verschiedenen Schritte der anschließenden Tumorprogression zu erfassen (Brüning *et al.* 1995, Beckwith 1997). Im Rahmen von Mikrodissektionsexperimenten, bei der verschiedene Tumorareale hinsichtlich genetischer Aberrationen untersucht wurden, konnte teilweise eine Korrelation mit dem jeweiligen Stadium des Tumors beobachtet werden (Park *et al.* 1993 a, Charles *et al.* 1998, Powlesland 2000). Das Auftreten weiterer chromosomaler Aberrationen – neben der Inaktivierung von *WT1* – in Zusammenhang mit der Wilms-Tumorgenese deutet auf die Beteiligung zusätzlicher Tumorsuppressorgene in anderen Lozi hin (Charles *et al.* 1998). Dies entspricht auch der mittlerweile allgemein akzeptierten Einordnung von Krebs als einem mehrstufigen (*multi step*) Prozess, für dessen Entstehung sechs grundlegende physiologische Veränderungen in den Tumorzellen gegeben sein müssen: a) Unabhängigkeit von Wachstumsfaktoren, b) Immunität gegenüber wachstumshemmenden Signalen, c) Apoptose-Resistenz, d) Immortalisierung (unbeschränkte Replikationsfähigkeit), e) Angiogenese-Initiation, f) Metastasierungsfähigkeit (Hanahan und Weinberg 2000). Die Akkumulation genetischer Veränderungen (z. B. größere chromosomale Aberrationen oder Punktmutationen), von denen beim Menschen zwischen vier bis sechs Mutationen in den entsprechenden Schlüsselgenen von Regelkreisen der Zellproliferation und Homöostase zur Erfüllung der oben beschriebenen Voraussetzungen notwendig sind, führt zum Funktionsverlust (*loss of function*) bei rezessiven Tumorsuppressorgenen oder Funktionsgewinn (*gain of function*) bei dominanten Onkogenen und bedingt so durch die Beeinflussung o. g. zellulärer Parameter die Veränderung (maligne Transformation) normaler Zellen zu Tumorzellen (Hahn und Weinberg 2002).

1.3.4 Gene:

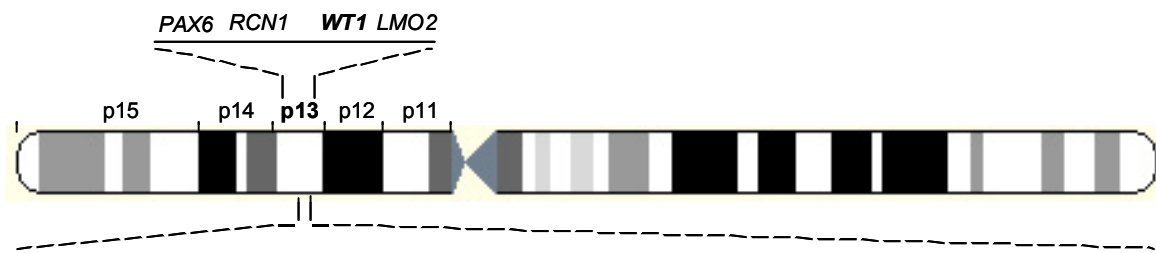
Bisher konnten zwei Gene direkt mit der Entstehung von Wilms-Tumoren in Verbindung gebracht werden. In beiden konnten Mutationen nachgewiesen werden und es gibt Studien, die auf eine Verknüpfung ihrer Funktionen bei der Progression von WT hindeuten.

1990 wurde zunächst das erste **Wilms-Tumorgen (*WT1*)** der chromosomalen Region 11p13 zugeordnet (Rose *et al.* 1990, *OMIM-ID: 607102) und wenig später unabhängig voneinander von drei Gruppen über verschiedene Ansätze kloniert (Call *et al.* 1990,

Gessler *et al.* 1990, Huang *et al.* 1990). Seine Rolle bei der Wilms-Tumorgenese sowie bei der normalen Nierenentwicklung konnte durch Expressions- und Mutationsanalysen schnell verifiziert werden (Haber *et al.* 1990, Bonetta *et al.* 1990, Pritchard-Jones *et al.* 1990, Pelletier *et al.* 1991 a). *WT1*, in einem etwa 50 kb großen Locus gelegen, besteht aus zehn Exons, von denen zwei (Exon 5 und Exon 9) alternativ gespleißt werden (Haber *et al.* 1991, Gessler *et al.* 1992). Es codiert für ein ca. 3,0 kb großes Transkript (s. www.ensembl.org, *WT1* ensembl-ID: ENSG00000184937). Mit seinem prolin- und glutaminreichen N-Terminus, sowie seinen vier C-terminal (in Exon 7-10) gelegenen Cys₂-His₂-Zinkfingern zeigt es typische Merkmale von Transkriptionsfaktoren (Call *et al.* 1990, Rauscher *et al.* 1990). Drei alternative Translationsstartsignale (Haupttranslationsstart AUG, 5'-gelegenes CUG, 3' im Leserahmen gelegenes internes AUG) in der *WT1*-mRNA sorgen für eine große Anzahl möglicher Protein-Isoformen (Bruening *et al.* 1996, Scharnhorst *et al.* 1999). Abhängig vom Translationsstart und der Spleißvariante codiert *WT1* für ein 36-62 kDa großes Protein. Die augenscheinlich physiologisch vier bedeutendsten Protein-Isoformen, ausgehend vom Haupttranslationsstartpunkt (AUG), haben aufgrund der Spleißvariationen eine Größe von 52-54 kDa (429-449 Aminosäuren). Diese Isoformen treten im Gewebe immer in einem konstanten Mengenverhältnis zueinander auf. Eine gewebespezifische Veränderung der RNA-Sequenz (*RNA-Editing*) führt zum Austausch von Leucin-280 zu Prolin und erweitert die Variationsmöglichkeiten noch (Sharma *et al.* 1994, s. Abb. 1.4).

Die beiden alternativen Spleißereignisse betreffen das für 17 Aminosäuren codierende Exon 5 (+/-Exon 5), sowie die Spleißdonorstelle in Exon 9. Dies führt zu einer möglichen Insertion der Aminosäuren Lysin-Threonin-Serin (+/-KTS) zwischen den Zinkfingern 3 und 4 (Haber *et al.* 1991). Bisher konnten zwei dieser Isoformen (+/-KTS-Varianten) eine eindeutige physiologische Funktion zugewiesen werden. Neben seiner Rolle als Transkriptionsfaktor (-KTS-Variante), wobei sowohl aktivierende als auch reprimierende Eigenschaften zu finden sind (Rauscher *et al.* 1990, Wang *et al.* 1993, Cook *et al.* 1996), erfüllt die +KTS-Isoform Aufgaben beim Spleißen von RNA (Larsson *et al.* 1995, Davies *et al.* 1998, Lodomery *et al.* 1999, Markus *et al.* 2006). Dabei hat die Insertion der drei Aminosäuren Lysin-Threonin-Serin eine Veränderung des Abstandes der Zinkfinger 3 und 4 zur Folge und damit direkten Einfluss auf die Bindungsaffinität der entsprechenden *WT1*-Isoform zu DNA bzw. RNA (Laity *et al.* 2000). Beide Isoformen wirken somit abhängig vom Spleißereignis und dem zeitlichen und zellulären Kontext ihrer Expression als Transkriptionsfaktor, transkriptioneller Cofaktor oder post-transkriptioneller Regulator.

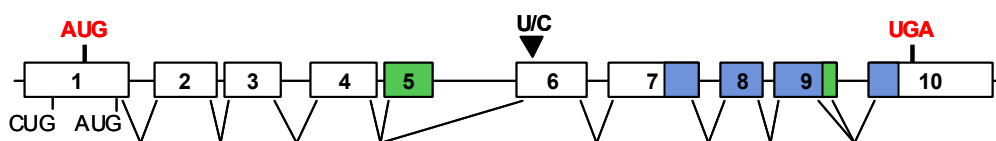
WT1-Region: Chromosom 11p13



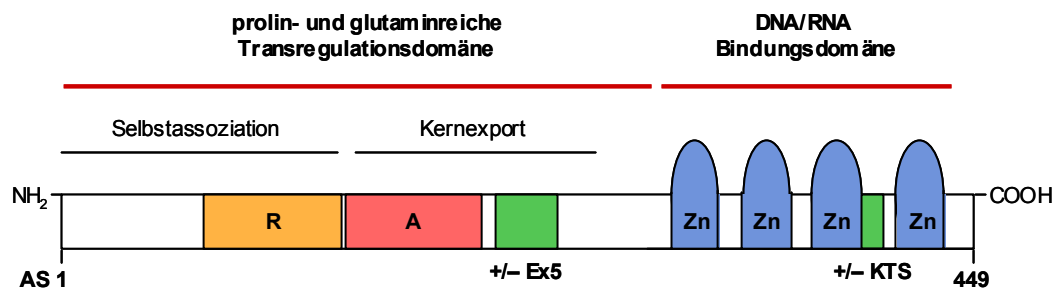
WT1-Lokus: ~ 50 kb



WT1-mRNA: ~ 3 kb Transkript



WT1-Protein: ~ 52-54 kDa



Protein-Isoformen Mengenverhältnis

+	+	8,3
+	-	2,5
-	+	3,8
-	-	1,0

Abbildung 1.4: WT1 – Region, Lokus, Gen, RNA, Protein.

Die schematische Darstellung zeigt die wesentlichen Informationen zur Organisation von WT1. Auf Chromosom 11p13 gelegen, umfasst der genomische Lokus etwa 50 kb. Es codieren 10 Exons für WT1. Alternative Spleißstellen sind grün gefärbt. Das prozessierte Transkript hat eine Größe von ~ 3 kb. Drei alternative Translationsstartpunkte (CUG, AUG, AUG; Haupttranslationsstartpunkt und Stop-Codon: rot), zwei alternative Spleißereignisse (grün) und RNA-Editing (Austausch von Uracil zu Cytosin an Position 839, schwarzer Pfeil) machen 24 Protein-Isoformen möglich. Die Spleißereignisse betreffen zum einen das aus 17 Aminosäuren (AS) bestehende Exon 5 (+/-Ex 5) und zum anderen eine alternative Spleißdonorstelle in Exon 9, was zur Insertion von drei Aminosäuren Lysin-Threonin-Serin (+/-KTS) führt. Das WT1-Protein besteht aus 449 AS mit einem Molekulargewicht zwischen 52-54 kDa. Es weist deutliche Charakteristika eines Transkriptionsfaktors auf. Vier Cys₂-His₂ Zinkfinger am C-terminalen Ende bilden die DNA/RNA-Bindungsdomäne. Der N-Terminus weist einen für Transkriptionsregulationsdomänen hohen Anteil der Aminosäuren Prolin und Glutamin auf. Es konnten neben Bereichen mit reprimierender (orange, R) und aktivierender (rot, A) Funktion, außerdem Regionen zur Selbstassoziation und für den Kernexport des Proteins identifiziert werden. Die vier wichtigsten durch alternatives Spleißen generierten Protein-Isoformen ausgehend vom Haupttranslationsstartpunkt (WT1 +/-Exon 5 und +/-KTS) treten immer in einem konstanten Mengenverhältnis zueinander auf (unten dargestellt).

Für die +/-Exon 5-Varianten dagegen wird eine Bedeutung bei der Transkription bestimmter Zielgene von WT1 in Säugern diskutiert. Dies konnte aber im Tiermodell bisher nicht bestätigt werden. Obwohl WT1 beim Menschen über Exon 5-codierte Sequenzen mit *PAR4* interagiert (Richard *et al.* 2001), ergab die selektive Deletion von Exon 5 in der Maus keinen pathologischen Phänotyp (Natoli *et al.* 2002 a). Bisher eindeutig nachgewiesene Zielgene (Übersicht: Lee *et al.* 2001, Scharnhorst *et al.* 2001) von WT1 als Transkriptionsfaktor sind die bei der Nierenentwicklung exprimierten Gene *Podocalyxin*, *Amphiregulin*, *Sprouty 1* und *Nephrin* (Palmer *et al.* 2001, Lee *et al.* 1999, Gross *et al.* 2003, Wagner *et al.* 2004).

Die genetische Heterogenität von Wilms-Tumoren wird durch zahlreiche weitere Beschreibungen zytogenetischer Veränderungen belegt (Brown und Malik 2001). *WT1*-Mutationen wurden neben syndromassoziierten auch in ~ 15 % der sporadisch auftretenden Wilms-Tumoren identifiziert (Varanasi *et al.* 1994). Darüber hinaus wird vermutet, dass weitere Gene für die Wilms-Tumorgenese verantwortlich sind. Als Kandidaten werden die noch nicht identifizierten Gene *WT2* in der Region 11p15 (Reeve *et al.* 1989, Koufos *et al.* 1989, Satoh *et al.* 2006), *WT3* auf 16q (Maw *et al.* 1992; Austruy *et al.* 1995), die Lozi 7p (Miozzo *et al.* 1996, Löbber *et al.* 1998) und 1p (Grundy *et al.* 1994), sowie für familiären Wilms-Tumor (Ruteshouser *et al.* 2004) die Gene *FWT1* auf 17q (Rahman *et al.* 1996) und *FWT2* auf 19q (McDonald *et al.* 1998) diskutiert.

Das zweite eindeutig mit der Wilms-Tumorerkrankung in Verbindung gebrachte Gen ist das ebenfalls als Transkriptionsfaktor wirkende **beta (β)-Catenin (*CTNNB1*)** (ensembl-ID: ENSG00000168036). Das humane Homolog des *Drosophila*-Segmentpolaritätsgens *Armadillo* wurde von McCrea *et al.* (1991) kloniert und kartiert in die chromosomale Region 3p22 bis p21.3 (Kraus *et al.* 1994, van Hengel *et al.* 1995). Es umfasst 16 Exons und ist einer der intrazellulären Partner von E-Cadherin, das an der Cadherin-vermittelten Zelladhäsion beteiligt ist (Nollet *et al.* 1996). Zusätzlich ist freies β -Catenin im Zytoplasma eine wichtige Komponente der klassischen WNT-Signalkaskade (s. Abb. 1.5; benannt nach dem *Drosophila*-Segmentpolaritätsgen *wingless* und dem murinen Proto-Onkogen *Int-1*; *wingless-type MMTV integration site*) als Übermittler des WNT-Signals in den Zellkern (Wodarz *et al.* 1998, Bejsovec 2005). Normalerweise wird zytoplasmatisches β -Catenin durch einen Komplex bestehend aus Axin, APC (*Adenomatous Polyposis Coli*) und den Kinasen CK1 (Casein Kinase 1) und GSK3 (Glykogen Synthase Kinase 3) phosphoryliert und so der Ubiquitin-vermittelten proteosomalen Degradation zugeführt. Bei nicht aktivierter WNT-Signal-transduktion ist somit kein freies β -Catenin in der Zelle vorhanden. Bindet nun ein Mitglied der WNT-Familie an seine beiden Rezeptorkomponenten Frizzled und LRP (*Low Density Lipoprotein Receptor*), inhibiert

das intrazellulär gelegene Strukturprotein Dishevelled die Aktivität des Komplexes und verhindert damit die Phosphorylierung von β -Catenin. Als Folge akkumuliert β -Catenin, bindet im Kern an Transkriptionsfaktoren der TCF (*T-Cell Factor*)/LEF (*Lymphoid Enhancer Factor*)-Familie und sorgt somit für die Expression entsprechender WNT-Zielgene (Reya und Clevers 2005, Kikuchi *et al.* 2006).

Untersuchungen an vierzig Wilms-Tumorproben ergaben einen Anteil von 15 % mit Mutationen in β -Catenin. Die identifizierten *Missense*-Mutationen bzw. kleineren Deletionen betreffen vor allem die für die Phosphorylierung vorgesehenen Aminosäuren (Koesters *et al.* 1999). Entsprechend führen sie zur Stabilisierung und Akkumulation von β -Catenin und folglich zu einer konstitutiven Expression von WNT-Zielgenen wie *MYC* und *Cyclin D1 (CCND1)*. Eine weitere Studie stützt diese Ergebnisse und findet darüber hinaus eine starke Korrelation von *WT1* und β -Catenin Mutationen in WTs (Maiti *et al.* 2000). Mindestens 75 % der WTs mit *WT1*-Mutationen zeigen aktivierende Mutationen in β -Catenin. Diese Beobachtung deutet auf eine illegitime Aktivierung der WNT-Signalkaskade in der Gruppe der *WT1*-defizienten WTs hin. Die Überexpression einer Vielzahl von Transkriptionsfaktoren und Signalmolekülen könnten den Funktionsverlust von *WT1* in betroffenen Zellen kompensieren, diese der Apoptose entziehen (s. u.) und so die Voraussetzung für die klonale Expansion *WT1*-defizitärer Tumorzellen im Rahmen der WT-Progression ermöglichen (Li *et al.* 2004).

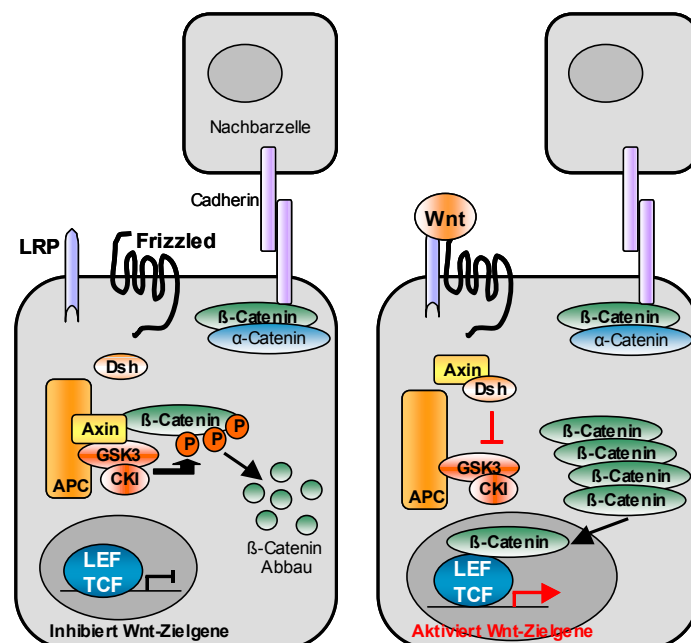


Abbildung 1.5: Kanonische Wnt-Signalkaskade.

Ohne Wnt-Signal (linke Seite) wird β -Catenin in einem Komplex aus Axin, APC, GSK3 und CK1 phosphoryliert und der Ubiquitin-vermittelten proteosomalen Degradation zugeführt. Bei Anwesenheit eines Wnt-Signals (rechte Seite) wird der Degradationskomplex durch Dsh inhibiert, β -Catenin akkumuliert im Zytosol, wandert in den Zellkern und bindet an die Transkriptionsfaktoren LEF/TCF, wodurch Wnt-Zielgene exprimiert werden. (Darstellung bearbeitet nach Reya und Clevers 2005)

1.3.5 Histologie:

Das histologische Erscheinungsbild von Wilms-Tumoren ist eng mit der normal verlaufenden Nierenentwicklung verknüpft. Deshalb wird in diesem Abschnitt neben der Beschreibung von WT ein Hauptaugenmerk auf der Darstellung der Nephrogenese liegen. Histologisch betrachtet sind Nephroblastome, in Analogie zur Genetik, heterogen und werden als triphasisch bezeichnet, da sie sich aus drei Gewebetypen – epithelialen, stromal/mesenchymalen und blastemischen Anteilen – zusammensetzen (s. Abb. 1.6, Harms und Zeidler 1981, Harms und Schmidt 1997).

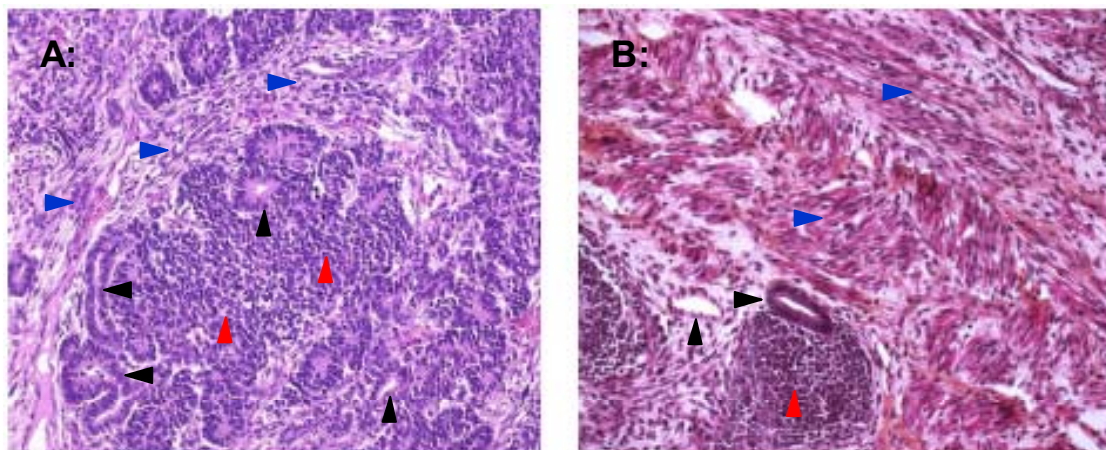


Abbildung 1.6: Histologische Präparate von Wilms-Tumoren.

A: Aufgrund ihrer morphologischen Zusammensetzung werden WTs als triphasisch bezeichnet. Sie enthalten oft, wie in der Darstellung zu sehen ist, blastemische (rote Pfeile), epitheliale (schwarze Pfeile) und stromale (blaue Pfeile) Anteile. **B:** Hier sind die stromalen Bereiche zusätzlich mit Muskelfasern durchsetzt. (Vergrößerung: 40fach, H/E-Färbung). (**Die Abbildungen wurden den am Ende der Einleitung aufgeführten Internetseiten entnommen und bearbeitet.)

Diese unterschiedliche Differenzierung der Tumorzellen deutet auf eine sehr früh in der Entwicklung ausgelöste aberrante Entwicklung der embryonalen metanephrischen Blastemzellen hin. Das bedeutet, der Ursprung von Wilms-Tumoren liegt in einer Störung der wechselseitigen Induktion zwischen dem Epithelgewebe der Ureterknospe und dem metanephrischen Mesenchym während der Entwicklung der bleibenden Niere (Metanephrogenese) (s. Abb. 1.7, Übersichtsartikel: Jacob 1990, Burrow 2000, Dressler 2002, Vainio 2002).

Dabei ist das metanephrische Mesenchym vor dem Einwuchs der Ureterknospe (entspringt dem kaudalen Bereich des Wolff'schen Gangs) einer der frühesten Orte einer schwachen *WT1*-Expression. Diese begrenzt die Position des sich entwickelnden Metanephros und schützt das Nierenblastem vor Apoptose (Kreidberg *et al.* 1993, Rivera und Haber 2005). In der fortschreitenden Nephrogenese wird die stärker werdende *WT1*-Expression beschränkt auf das sich um die Ureterknospe kondensierende Mesenchym, sowie die im weiteren Verlauf entstehenden Komma- und S-förmigen

Vesikel der ablaufenden Epithelialisierungsvorgänge, welche schließlich zur Bildung funktionaler Nierenstrukturen (Nephrene) führen (Pelletier *et al.* 1991 b, Park *et al.* 1993 b, Armstrong *et al.* 1992).

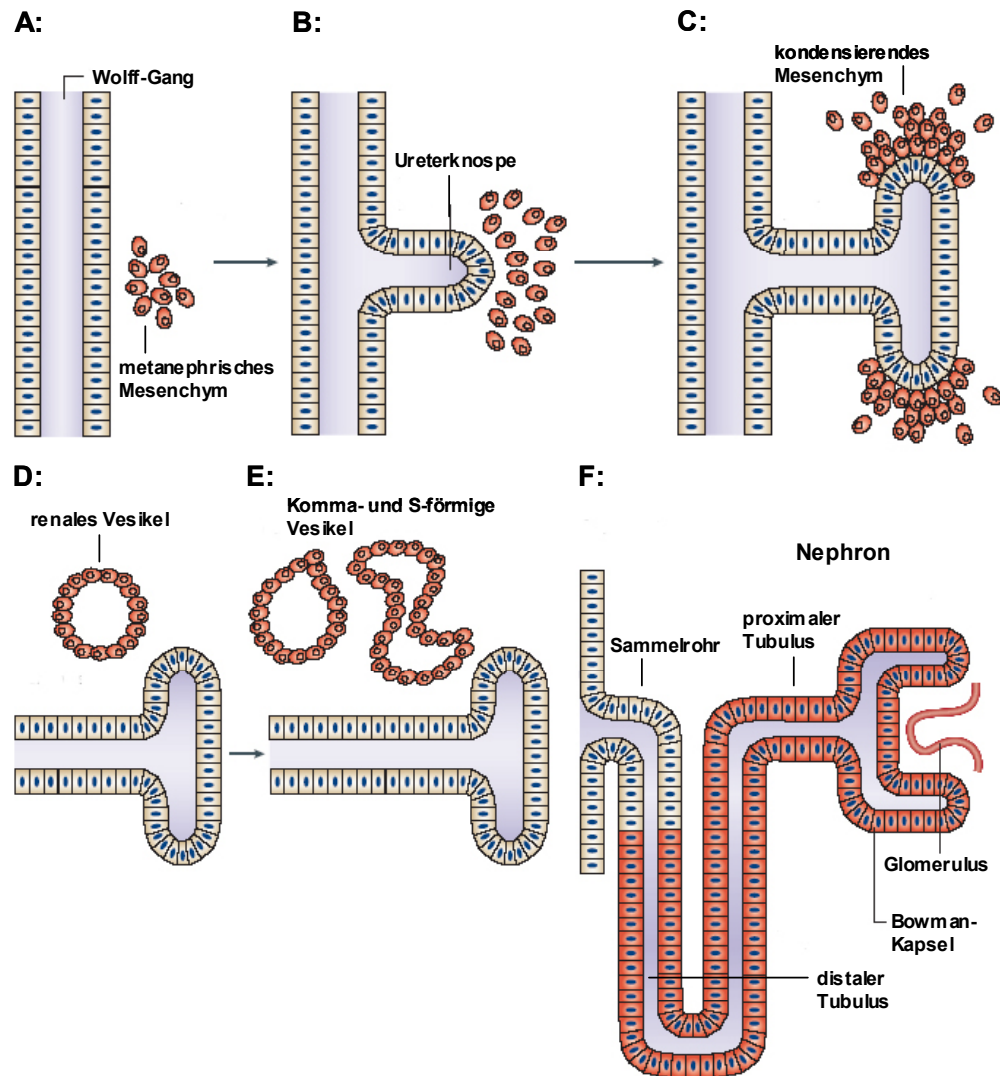


Abbildung 1.7: Metanephrogenese.

A: Das uninduzierte metanephrische Mesenchym (MM, auch metanephrogenes Blastem) ist der früheste Ort einer *WT1*-Expression. Sie markiert die Position des späteren Metanephros und bewahrt funktionell die Blastemzellen vor der Apoptose. **B:** Reziproke Induktionsprozesse zwischen MM und Wolffschem Gang (WG) führen zum Auswachsen der Ureterknospe (UK). **C:** Weitere induktive Wechselwirkungen zwischen UK und induziertem MM haben deren Verzweigung zur Folge. Um die Spitzen der einwachsenden und sich laufend weiter verzweigenden UK kondensieren Mesenchymzellen. **D:** Zellen des kondensierenden Mesenchyms vollziehen den für die Nephrogenese wichtigen Mesenchym-Epithel-Übergang (MET, *Mesenchyme-Epithelial-Transmission*). Als erste epitheliale Strukturen entstehen sogenannte renale Vesikel, aus denen die Nierentubuli hervorgehen. **E:** Mit fortschreitender Differenzierung der Niere vom Mark zur Rinde bilden sich aus renalen Bläschen Komma- und S-förmige Vesikel, aus denen die Nierentubuli hervorgehen. **F:** Zur Schaffung funktionaler Nierenstrukturen – Nephrene, bestehend aus Nierenkörperchen und Nierentubulus – müssen sich die aus dem MM entstandenen Tubuli (rot) mit den Sammelrohren (Derivate der UK, grau) verbinden. Die Nierenkörperchen entstehen durch das Einwachsen eines Gefäßknäuels (Glomerulus) am vorderen (proximalen) Pol des Nephrons durch Bildung der Bowman-Kapsel. Ihr inneres, viscerales Blatt epithelialer Zellen differenziert zu den die Kapillaren umgebenden Podozyten. Kapillarendothelzellen und Podozyten bilden die Barriere für die Ultrafiltration zur Bildung des Primärharns (Abbildung verändert nach Rivera und Haber 2005).

Diese setzen sich in der fertigen Niere (Metanephros) aus dem Nierenkörperchen – bestehend aus Bowman-Kapsel, Glomerulus (Gefäßknäuel), Mesangium – und den

Nierentubuli (proximale, distale Tubuli und Sammelrohre) zusammen. In der adulten Niere findet man eine *WT1*-Expression nur noch in den Podozyten der Glomeruli (s. Abb. 1.8, Pelletier *et al.* 1991 b, Mundlos *et al.* 1993, Rackley *et al.* 1993).

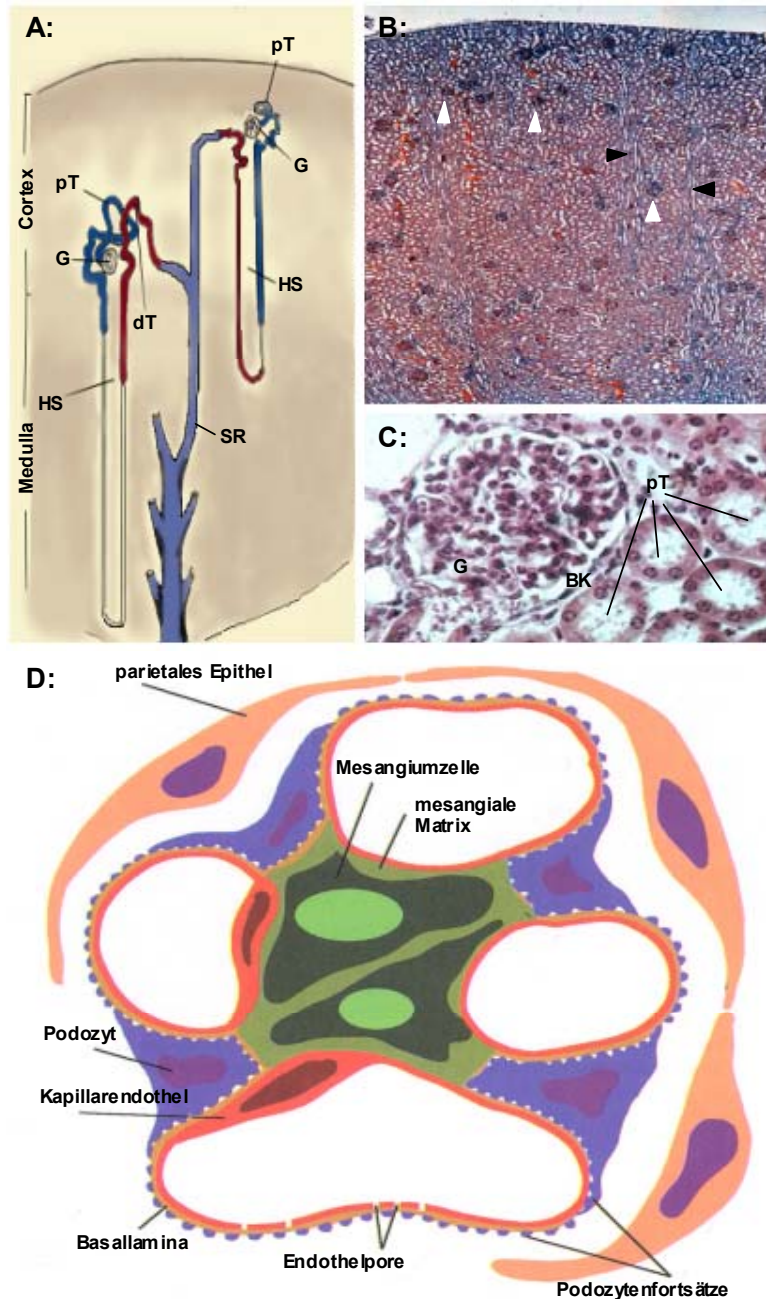


Abbildung 1.8: Strukturen der Niere.

A: Schematische Darstellung der funktionellen Nierenstrukturen nach Abschluss der Metanephrogenese. Gezeigt sind zwei Nephronen mit unterschiedlich langen Schleifen. Die einzelnen Abschnitte sind von proximal nach distal, anfangend beim Nierenkörperchen wie folgt benannt: Glomerulus (G), proximaler Tubulus (pT), Henle-Schleife (HS), distaler Tubulus (dT), Sammelrohr (SR). Die Niere ist in Cortex und Medulla unterteilt.

B: Schnittpräparat einer humanen Niere (40fach). Die weißen Pfeile markieren exemplarisch einige Glomeruli. Die schwarzen Pfeile bezeichnen Sammelrohre (Markstrahlen), die ins Mark zum Nierenbecken ziehen.

C: Nierenkörperchen bestehend aus Glomerulus (G, Gefäßknäuel) und Bowman-Kapsel (BK). Proximale Tubuli (pT), gut zu erkennen am Haarsaum im Inneren sind ebenfalls gekennzeichnet (H/E Färbung, 250fach). (**Die Abbildungen A-C wurden den am Ende der Einleitung aufgeführten Internetseiten entnommen und bearbeitet.)

D: Schematische Darstellung der zellulären Verhältnisse im Glomerulus. Zentral gelegen findet man das Mesangium (grün, mit Mesangiumzellen und mesangialer Matrix) u. a. als Stütze des Kapillarendothels. Die Endothelzellen (rot) schaffen mit ihren Poren und den außen aufsitzenden Podozyten (blau-violett, viscerales Blatt der Bowman-Kapsel) die Voraussetzung zur Herstellung des Primärharns durch Ultrafiltration. Dieser entsteht im Harnraum zwischen den Podozyten und dem parietalen Epithel der Bowman-Kapsel (Abbildung D verändert nach Dressler 2002).

Zusammenfassend lässt sich die Metanephrogenese in drei sukzessiv ablaufende Prozesse unterteilen: 1) Die Etablierung des metanephrischen Mesenchyms aus dem intermediären Mesoderm. 2) Das induzierte Auswachsen der Ureterknospe ausgehend vom Wolffschen Gang mit ihrer anschließenden Verzweigung. 3) Die Transformation des Blastems in epitheliale Zellen und deren Differenzierung in funktionale Nierenstrukturen wie Nierenkörperchen und Nierentubuli. Dabei sind proximale und distale Tubuli Abkömmlinge des metanephrischen Mesenchyms, während die Sammelrohre aus der Ureterknospe hervorgehen.

Aus den oben angesprochenen Induktionsprozessen resultieren – laufen diese nicht regelhaft ab – über die 36. Schwangerschaftswoche (SSW) hinaus Nester persistierender embryonaler Zellen (Nephroblastomatose, *nephrogenic rests*, NR) im differenzierten Nierengewebe (Beckwith *et al.* 1990, Beckwith 1998). Diese NR wurden bei ~ 40 % der WT-Patienten gefunden und ließen sich bei einem Teil davon als Vorläufer von Wilms-Tumoren identifizieren (Beckwith *et al.* 1990, Park *et al.* 1993 a, Fleming 1997, Charles *et al.* 1998). Dabei werden die histologischen Befunde gestützt durch genetische Daten. Gene, die in Wilms-Tumoren hochreguliert sind, werden in der Regel zum Zeitpunkt des Kontaktes zwischen Ureterknospe und metanephrischem Mesenchym exprimiert, also in einer frühen Phase der Nierenentwicklung, wohingegen unterrepräsentierte Gene in WTs eher in späteren Stadien der normalen Nephrogenese eine Rolle spielen (Li *et al.* 2002, Li *et al.* 2005). Anaplastische WTs als besonders therapieresistente Form, sind mit Mutationen in *TP53* assoziiert, was als spätes Ereignis der malignen Transformation gilt (Bardeesy *et al.* 1994, Bardeesy *et al.* 1995).

1.3.6 Expression:

Expressionsstudien an Mäusen sowie an humanem embryonalem und adultem Gewebe zeigen die Lokalisation von *WT1*-mRNA und -Protein u. a. in Bereichen sich differenzierender mesenchymaler Gewebe wie Niere, Milz, Uterus, Ovar und Testis mit mesodermalem Ursprung (Call *et al.* 1990, Pritchard-Jones *et al.* 1990, Pelletier *et al.* 1991 b). *Northern Blot*-Analysen in Mäusen zeigen (abhängig von der Länge der Exposition) eine schwache Expression von *Wt1* auch in Herz, Lunge und Thymus (Buckler *et al.* 1991). Dazu gruppieren sich ergänzend wenige Gewebe mit (neuro-)ektodermaler Herkunft, wie Rumpfmuskulatur, Rückenmark und Gehirn (s. u.). Eine Beteiligung von *WT1* an der Entstehung von Organen aus dem Endoderm, wie Leber, Pankreas, Darm und Harnblase konnte bisher nicht gezeigt werden. Die Expressionsorte im humanen und murinen Organismus sind nahezu identisch, weshalb im folgenden die *Wt1*-spezifische Expression während der Organogenese der Maus exemplarisch aufgezeigt wird (www.informatics.jax.org, MGI-ID: 98968, s. Abb. 1.9). Dabei entsprechen

die murinen Embryonalstadien E9,5 *dpc* (*days post coitum*) bis E15,5 *dpc* dem Entwicklungsstand humaner Embryonen an den Tagen 28 bis 70 (vierte bis zehnte SSW) der Schwangerschaft.

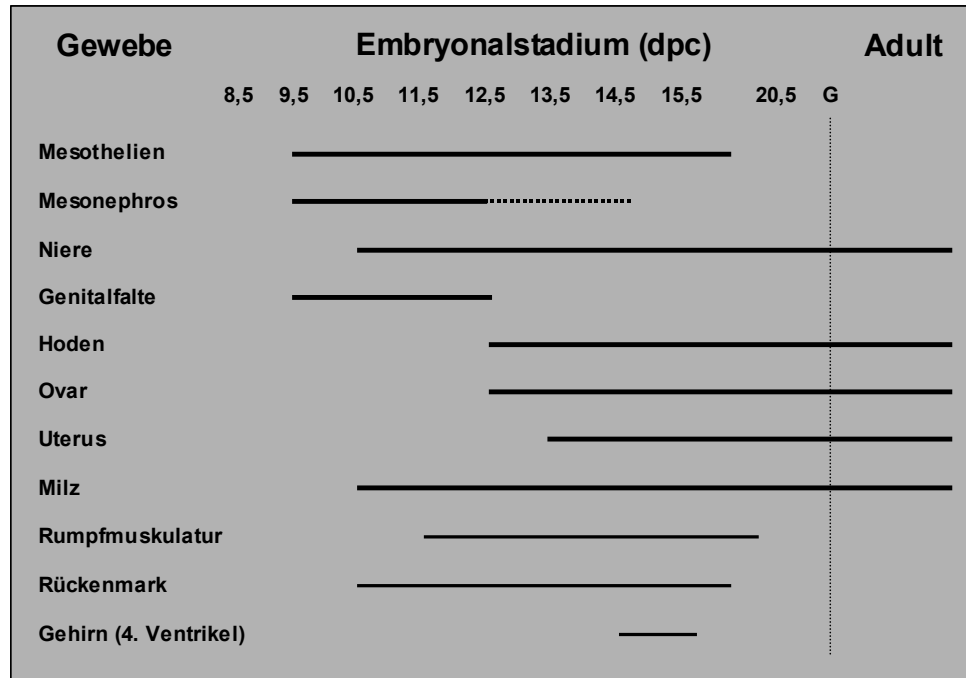


Abbildung 1.9: *Wt1*-Expression in der murinen Embryonalentwicklung.

Dargestellt ist die *Wt1*-Expression in der Embryonalentwicklung der Maus. Die Stadien sind entsprechend dem Text bezeichnet. Der ab E12,5 *dpc* degenerierende Mesonephros zeigt eine abnehmende Expression. Die Leiste der Genitalfalte wird ab E12,5 *dpc* durch die eindeutig identifizierbaren Gonaden ersetzt. Derivate des Ektoderms zeigen eine schwächere *Wt1*-Expression (dünnere Leisten). In Niere, Hoden, Uterus, Ovar und Milz bleibt eine Expression über die Geburt hinaus im adulten Tier erhalten (Abbildung verändert nach Armstrong *et al.* 1992).

Mit Ausnahme von Clipsham *et al.* (2004), die mittels immunhistochemischer Färbemethoden *Wt1* am Tag E4,5 *dpc* im Trophektoderm und im Epiblast von Präimplantationsembryonen zeigen, wurde bislang keine *Wt1*-Expression vor dem Tag E8,5 *dpc* der murinen Ontogenese nachgewiesen. Dieser Punkt markiert den Übergang zwischen dem Blastozystenstadium und der Organogenese. Durch die Gastrulation und Neurulation sind alle drei Keimblätter (Ektoderm, Mesoderm, Endoderm) und das Neuralrohr des Embryos angelegt. Die Entwicklung schreitet cranio-caudalwärts voran.

Am Tag **E9,5 *dpc*** wird die früheste *Wt1*-Expression zunächst in den Mesothelien von Herz, Lunge und Thymus nachgewiesen und setzt sich bis über das Stadium E15,5 *dpc* hinaus in allen mesothelialen Überzügen der Organe des Thorax (Pleura) und Abdomens (Peritoneum) fort. Ebenfalls beginnt zu diesem Zeitpunkt die Expression in der bilateralen Urogenitalfalte (UGF) des Mausembryos. Im Mesonephros als sich differenzierendem Teil

davon hält diese bis Tag E12,5 *dpc* an und nimmt dann mit der Regression des Übergangsorgans stetig ab. Der sich in die Geschlechtsorgane entwickelnde Anteil der UGF zeigt zunächst eine *Wt1*-Expression im Epithel und später dann in den Gonaden selbst (s. u.) (Armstrong *et al.* 1992, Rackley *et al.* 1993). Ab dem Embryonalstadium **E10,5 *dpc*** ist *Wt1* im sich entwickelnden Metanephros nachzuweisen und zwar zunächst im uninduzierten metanephrischen Blastem. Gleichzeitig beginnt die Expression von *Wt1* im Vorläufermesenchym der Milz. Ebenso im Rückenmark, wo die *Wt1*-Expression bis Tag E16,5 *dpc* anhält und sich von cranial nach caudal fortsetzt (Armstrong *et al.* 1992, Rackley *et al.* 1993). Ab Tag **E11,5 *dpc*** und **E12,5 *dpc*** kann *Wt1* im induzierten metanephrischen Mesenchym nachgewiesen werden. In der sich nun entwickelnden bleibenden Niere findet man die Expression im um die Ureterknospe kondensierenden Mesenchym und in den Strukturen der Epithelialisierungsprozesse (Nierenvesikel, Komma- und S-förmigen Vesikel). Die Differenzierung des Metanephros ist ab Tag E16,5 *dpc* weitestgehend abgeschlossen und die *Wt1*-Expression ist spätestens ab dem Stadium E19,5 *dpc* auf die Podozyten der Glomeruli beschränkt. Die Gonaden zeigen keine Expression in den Keimzellen, dafür im Epithel und in den Granulosa-Zellen (Ovar), sowie in der *Tunica albuginea* und den Sertoli-Zellen (Testis). Diese bleibt außer im Ovarialepithel und in der *T. albuginea* auch im adulten Lebewesen bei Maus und Mensch erhalten (Pritchard-Jones *et al.* 1990, Armstrong *et al.* 1992, Rackley *et al.* 1993, Bouma *et al.* 2004), hierzu gibt es allerdings, was das Ovarialepithel betrifft unterschiedliche Angaben (Pelletier *et al.* 1991 b, Mundlos *et al.* 1993). Rackley *et al.* (1993) finden ab diesem Zeitpunkt (bis ~ E16,5 *dpc*) auch eine schwache Expression in verschiedenen Bereichen der sich entwickelnden Rumpfmuskulatur, sowie Moore *et al.* (1998) in Bereichen der Gliedmaßen. Im Embryonalstadium **E13,5 *dpc*** zeigt ebenfalls Rackley *et al.* die Expression von *Wt1* im Stroma des Endometriums im Uterus muriner Embryonen. Dies wird von Pelletier *et al.* 1991 b für die Bereiche des stromalen Anteils des Endometriums und des Myometriums von adulten Tieren bestätigt. Am Tag **E14,5 *dpc*** findet man *Wt1* in den Mesothelien, der Milz, dem Rückenmark, den Gonaden und der Niere, sowie zusätzlich in einer definierten Gehirnregion, dem Dach des vierten Ventrikels (Armstrong *et al.* 1992, Rackley *et al.* 1993). In **adulten Mäusen** ist die *Wt1*-Expression beschränkt auf die Podozyten der Niere, das Myometrium und Teile des Endometriums des Uterus, das Ovarialepithel und die Granulosa-Zellen im Ovar, die Sertoli-Zellen des Hodens und Bereiche der Milz. Darüber hinaus wurde die Expression von *WT1* in einer Population CD34-positiver hämatopoetischer Vorläuferzellen (Blutstammzellen) nachgewiesen (Fraizer *et al.* 1995, Ellison *et al.* 2001). Allerdings ist hier die genaue Funktion und Bedeutung von *WT1*, auch im Hinblick auf die beobachteten starken Expressionsniveaus in verschiedenen Leukämien, die möglicherweise im Kontrast

zu den tumorsupprimierenden Eigenschaften von WT1 stehen, noch weitestgehend ungeklärt. Wobei die *WT1*-Expression vermutlich Ausdruck der Beteiligung unreifer Blutstammzellen an der Krankheitsentstehung ist (Tenen *et al.* 1997, Algar 2002). Eine direkte Rolle von WT1 bei der Induktion akuter myeloischer Leukämie (AML) in transgenen Mäusen konnte kürzlich gezeigt werden (Nishida *et al.* 2006).

Versucht man diesem augenscheinlich breiten Spektrum der *WT1*-Expression eine Struktur zu geben, findet man zunächst eine Beteiligung von WT1 an der Entstehung mesenchymaler Gewebe aus dem intermediären und lateralen Mesoderm. Ein weit schwächeres Expressionsmuster zeigt sich in den wenigen Organen mit (neuro-)ektodermaler Herkunft. WT1 scheint nicht an der Entwicklung endodermaler Strukturen beteiligt zu sein.

Dabei ändert sich die Rolle von WT1 mit den ablaufenden Vorgängen in der Organogenese. Bei der Musterbildung zur Festlegung der Positionen verschiedener Organe erfüllt WT1 eine anti-apoptotische Funktion in den entsprechenden Blastemzellen. Mit den einsetzenden Differenzierungsprozessen ist WT1 in Vorgänge des mesenchymalen-epithelialen Übergangs involviert. Im adulten Organismus persistiert die Expression in hochspezialisierten Zellen (Ultrafiltration: Podozyten, Nährzellen: Sertoli-Zellen und Granulosa-Zellen) der Niere, des Hodens und des Ovars, wobei die Rolle des WT1-Genproduktes in diesen Zellen weitgehend ungeklärt ist (aber eventuell dem Erhalt der Zellhomöostase dient).

Die Pathologie der 1993 generierten *Wt1* k.o.-Mäuse (s. u.) ist ein Abbild des oben beschriebenen *Wt1*-Expressionsmusters. Diese Tiere entwickeln unter anderem keine Nieren und keine Gonaden (Kreidberg *et al.* 1993). Dies weist auf eine Schlüsselrolle von WT1 in der Entwicklung des Urogenitalsystems hin und stellt die direkte Verbindung zu den beim Menschen auftretenden Fehlbildungen in Folge einer Aberration des *WT1*-Gens her (s. Kap. 1.3.2: Syndrome).

1.3.7 **Wt1-Mausmodelle:**

Die Isolation und Charakterisierung des orthologen murinen *Wt1*-Gens durch Buckler *et al.* 1992 auf Chromosom 2 der Maus (s. www.ensembl.org, *Wt1* ensembl-ID: ENSMUSG00000016458) und eine genauere Beschreibung des murinen *Wt1*-Lokus durch Gong *et al.* 2001, führte zur Generierung verschiedener transgener Modelle zur Erforschung der Funktion von *Wt1* im Säugersystem. Mittlerweile sind weit über ein Dutzend *Wt1*-Mausmodelle entstanden, welche die Bedeutung von *Wt1*, seiner Spleiß-Isoformen und der verschiedenen Mutationen in der Embryonalentwicklung und Pathologie aufklären helfen (Discenza und Pelletier 2004). Analysen der von

Kreidberg *et al.* (1993) generierten **konventionellen** *Wt1* k.o.-Maus zeigen die Bedeutung von *Wt1* in der Embryogenese. Dabei weisen heterozygote Tiere (*Wt1*^{+/-}) einen normalen (gesunden) Phänotyp ohne erhöhte Tumorinzidenz auf, wobei auf einem anderen genetischen Hintergrund die Mehrzahl der Mäuse an Glomerulosklerose erkrankt (Menke *et al.* 2003). Weibliche heterozygote *Wt1*^{+/-}-Mäuse eines 129/Sv-Inzuchtstammes sind nicht fertil (Kreidberg *et al.* 1999). Homozygote *Wt1* k.o.-Mäuse (*Wt1*^{-/-}) dagegen sind embryonal letal (Kreidberg *et al.* 1993). Sie sterben ab dem Embryonalstadium E13,5 *dpc* bzw. spätestens kurz nach der Geburt, wiederum abhängig vom genetischen Hintergrund der Tiere (Herzer *et al.* 1999). Ursache dafür sind Fehlsteuerungen bei der Entwicklung des Zwerchfells, der Mesothelien, des Herzens, der Milz und der Lunge, sowie die Störung der Gonadalentwicklung und der Nephrogenese.

In Komplementationsexperimenten mit YAC (*Yeast Artificial Chromosome*)-transgenen Mäusen, die 280 kb bzw. 470 kb des humanen *WT1*-Lokus tragen, gelingt Moore *et al.* (1998 und 1999) ein *Rescue* des letalen *Wt1*^{-/-}-Phänotyps. Trotz allem haben diese Tiere schwerwiegende Nierenfehlbildungen und entsprechende Krankheitserscheinungen. Abhängig vom eingebrachten Konstrukt sterben viele der Tiere zwischen 48 Stunden und 150 Tagen nach der Geburt entweder aufgrund komplett fehlender Nieren (Nierenagenesie) oder – falls doch vorhanden – an Nierenversagen durch diffuse mesangiale Sklerose und Glomerulonephritis. Darüber hinaus zeigt diese Publikation die Expression von *Wt1* bei der Entwicklung des Epikards, der Niere und Nebenniere, sowie des Zwerchfells. Mit demselben Prinzip wird die Schlüsselrolle von *Wt1* bei der Funktion der Podozyten nachgewiesen. Mäuse mit reduziertem *Wt1*-Expressionsniveau erkrankten an Glomerulonephritis und mesangialer Sklerose (Guo *et al.* 2002).

Ein anderes Modell zeigt die Bedeutung der *Wt1* +/-KTS-Spleißformen während der Geschlechts- und Nierenentwicklung. Durch Mutagenese der Spleißdonorstelle in Exon 9 steht den Tieren entweder nur die -KTS-Variante (wie im humanen Frasier-Syndrom) oder die +KTS-Isoform zur Verfügung. Heterozygote *Wt1* -KTS-Mäuse (Verschiebung des -KTS/+KTS-Mengenverhältnisses) sind fertil, sterben aber nach zwei bis drei Monaten an Glomerulosklerose oder mesangialer Sklerose. Homozygote Mäuse (-KTS, Frasier-Mäuse) sind kaum lebensfähig und versterben spätestens 24 Stunden nach der Geburt aufgrund starker Nierenschäden. Diese Tiere zeigen auch Störungen der männlichen Geschlechtsdifferenzierung. Es kommt zur Entwicklung weiblicher Gonaden. Heterozygote *Wt1* +KTS-Mäuse dagegen sind lebensfähig, fertil und entwickeln sich normal. Es scheint, als könnten die +KTS-Formen den Wegfall der -KTS-Varianten zum Teil kompensieren (redundante Funktion). Aber auch hier sterben homozygote, nur die +KTS-Isoform produzierende Mäuse nach 24 Stunden an Nierenversagen (Hammes *et al.* 2001).

Ein das Denys-Drash-Syndrom simulierendes Modell wurde ebenfalls generiert. Die Insertion einer *Neo/Leu2*-Kassette in Exon 9 führt zu einer nach dem dritten Zinkfinger tranktierten *Wt1*-Variante (*Wt1^{tm396}*). Homozygote Tiere mit dieser Mutation konnten nicht hergestellt werden. Heterozygote Mäuse sind lebensfähig, zeigen aber einen vielfältigen Phänotyp, der von sterilen Männchen mit spermienfreien Hoden und unreifen Sertoli-Zellen als Genitalfehlbildungen bis zu Glomerulosklerose und mesangialer Sklerose als Ausdruck einer gestörten Nierenfunktion reicht. In diesem Modell kommt es als einzigem bisher zur Entwicklung eines (!) Wilms-Tumors durch Verlust des Exon 9 (*Exon Skipping*) im zweiten Allel von *Wt1* in einem chimären Tier (Patek *et al.* 1999).

Zuletzt wurde erst kürzlich eine konditionale *Wt1* k.o.-Mauslinie auf Basis des *Cre/loxP*-Systems veröffentlicht. Diese Mäuse tragen die beiden Exons 8 und 9 flankiert von *loxP*-Sequenzen. Die Expression von *Cre-Rekombinase* führt zu deren Exzision und der Ablation der davon kodierten Zinkfinger. Die Folge ist der Verlust der *Wt1*-Funktionalität. Bei einer Induktion durch eine *Amh-Cre*-Mauslinie (exprimiert die *Cre-Rekombinase* spezifisch in Sertoli-Zellen) kommt es zu einer Störung der Testis-Entwicklung. Dies zeigt sich in einer drastischen Verminderung der Bildung von Hodenkanälchen, Sertoli- und Keimzellen und geht mit dem Verlust der *Sry*- und *Sox9*-Expression einher (Gao *et al.* 2006). Dies ist die erste *Wt1*-Mauslinie, die potenziell in der Lage ist mit den richtigen Effektoren einen konditionalen *Wt1-knock out* zu erzeugen und speziell in der Niere zur Aufklärung der Wilms-Tumorgenese beitragen könnte.

Die Phänotypen der hier ausgewählt beschriebenen Mausmodelle sind Ausdruck des sehr komplexen Wirkmechanismus von *Wt1*. Neben seiner Funktion als Tumorsuppressor spielt *Wt1* also eine entscheidende Rolle in der Embryogenese, vor allem in der Urogenitalentwicklung. Die oben beschriebenen Defekte führen dazu, dass bei konventionellen *Wt1^{-/-}* k.o.-Mäusen u. a. keine Nieren gebildet werden und sie somit auch nicht als Modell zur Untersuchung der Wilms-Tumorgenese geeignet sind. Alle weiteren, zum Teil subtileren *Wt1*-Veränderungen führten bisher nicht zu stabilen Mauslinien, die eine systematische Analyse – insbesondere der WT-Genese – erlauben.

1.4 Ziel der Arbeit:

Im Rahmen dieser Arbeit soll ein geeignetes Tiermodell zur Untersuchung der Nierenentwicklung bzw. zur Analyse der Wilms-Tumor-Pathogenese generiert werden. Aufgrund der oben beschriebenen embryonalen Letalität der konventionellen *Wt1* k.o.-Maus soll eine konditionale, reversible *Wt1* k.o.-Maus auf der Basis des Tetrazyklin (*Tet on/off*)-Systems hergestellt werden. Dies sollte es ermöglichen, durch die

regulierbare Expression eines *Wt1*-Transgens (*tgWt1*) die kritischen Phasen der Embryogenese zu überwinden und lebensfähige Tiere zu erhalten. Gezieltes Abschalten des Transgens zu definierten Zeitpunkten in der Embryonalentwicklung kann eine homozygote *Wt1*-Mutation simulieren. Damit wäre die Möglichkeit geschaffen, die Rolle von WT1 sowohl in der Nierenentwicklung als auch in der Wilms-Tumorgenese in einem Tiermodell zu untersuchen. Hierfür müssen zunächst zwei Mauslinien generiert und charakterisiert werden (s. Abb. 1.10).

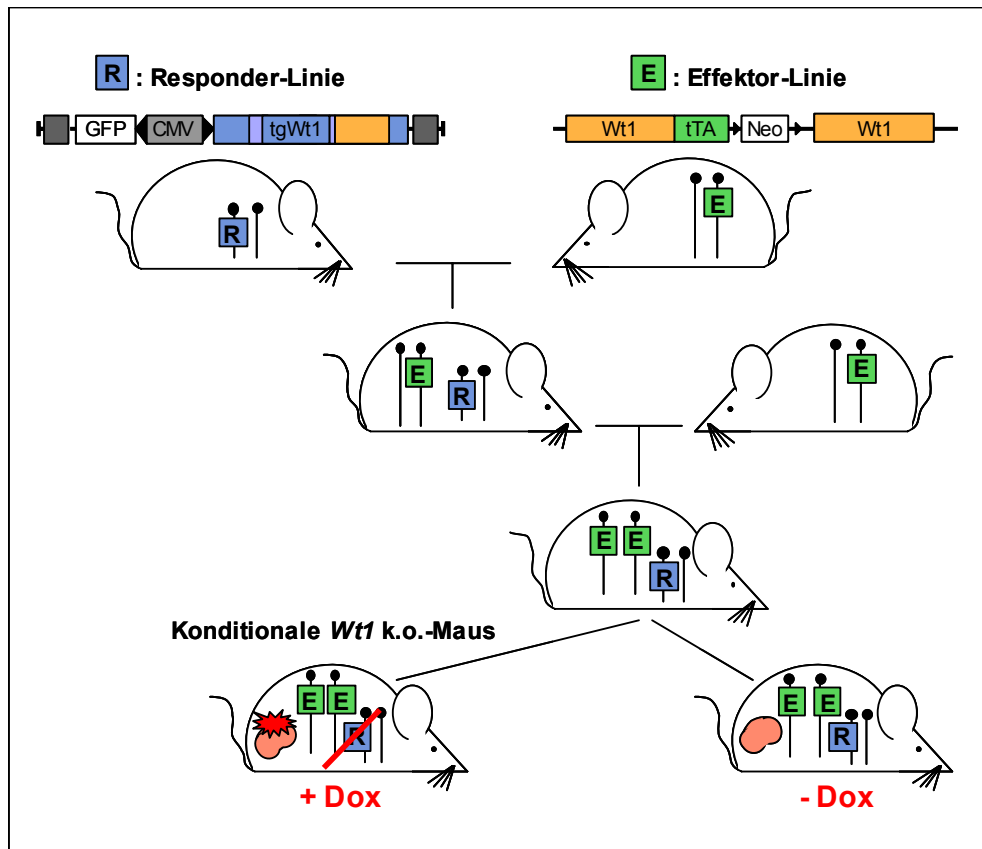


Abbildung 1.10: Herstellung einer konditionalen *Wt1* k.o.-Maus auf Basis des *Tet on/off*-Systems.

Zur Generierung der beiden notwendigen Mauslinien (*Responder*- und *Effektor*-Linie) werden die entsprechenden Konstrukte entweder durch Injektion in Vorkerne befruchteter Oozyten (*Responder*) oder durch Elektroporation embryonaler Stammzellen (*Effektor*) ins Genom integriert. Die entstandenen Linien (transgener *Wt1-Responder* und heterozygoter *Wt1-tTA^{+/-}*-Effektor) werden nach eingehender Charakterisierung so verpaart, bis eine homozygote konditionale *Wt1* k.o.-Maus vorliegt. Die Applikation von Doxyzyklin (+Dox) über das Trinkwasser der Tiere führt zum Abschalten des Transgens. Dies simuliert den Verlust von *Wt1* durch Mutationen in der Niere und sollte einen Wilms-Tumor induzieren.

In der *Effektor*-Linie soll ein tetrazyklinabhängiger Transaktivator (*tTA*) unter die Kontrolle des endogenen *Wt1*-Promotors gebracht werden (*heterozygoter tTA knock in / Wt1 knock out*). Dies soll die *Wt1*-spezifische zeitliche und räumliche Expression des *tTA* bei gleichzeitigem Ausschalten des endogenen *Wt1*-Lokus gewährleisten. Diese *Effektor*-Linie kann über den Ansatz zur Generierung einer

konditionalen *Wt1* *k.o.*-Maus hinaus als Induktor für andere tTA-regulierbare Mauslinien zur Expression relevanter Zielgene in *Wt1*-positiven Geweben oder aber für die regulierbare Deletion interessanter Gene (durch Kreuzung mit geeigneten Mauslinien des *Cre/loxP*-Systems) verwendet werden.

In der *Responder*-Linie soll ein transgenes *Wt1*-Konstrukt (*tgWt1*) der Variante (*musWt1* +Exon 5 und +/-KTS), das dem Organismus alternativ spleißbar die beiden wichtigsten *Wt1*-Proteinisoformen zur Verfügung stellt, tTA-induzierbar exprimiert werden.

Durch entsprechende Verpaarungen der beiden Linien erhält man die homozygote konditionale (Dox-induzierbare), reversible *Wt1* *k.o.*-Maus. Das Abschalten der *tgWt1*-Expression durch Doxzyklingabe (*Tet off*) zu definierten Zeitpunkten simuliert den Verlust von *Wt1* durch Mutationen in der voll entwickelten Niere und sollte so einen Wilms-Tumor induzieren können.

* Informationen können von folgenden Internetseiten bezogen werden:

- www.ncbi.nlm.nih.gov Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) Database
- www.i-hop-net.org Information Hyperlinked Over Proteins
- www.informatics.jax.org Mouse Genome Informatics (MGI)
- www.ensembl.org

** Aufnahmen der Histologie und Pathologie wurden zur besseren Verdeutlichung der Zusammenhänge den folgenden Internetseiten entnommen:

- www.gfmer.ch Geneva Foundation for Education and Research
- www.meddean.luc.edu Loyola University Medical Education Network (L.U.M.E.N)
Histology Lesson Database
- www.iplab.net Interactive Pathology Laboratory
- www.webpathology.com

2. MATERIAL & METHODEN

2.1 Material & Reagenzien

2.1.1 Chemikalien

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

Agar-Agar	Fa. Difco (Heidelberg)
Agarose	Fa. Invitrogen (Karlsruhe)
ATP	Fa. Roche (Mannheim)
DAPI	Fa. Q-Biogene (Heidelberg)
D-Luciferin	Fa. Roche (Mannheim)
EDTA	Fa. Gerbu (Gaiberg)
EGTA	Fa. Gerbu (Gaiberg)
Ethanol	Fa. Riedel-de-Haen (München)
Ethidiumbromid	Fa. Q-Biogene (Heidelberg)
Formaldehyd	Fa. Riedel-de-Haen (München)
Hefeextrakt	Fa. Difco (Heidelberg)
IPTG	Fa. Applichem (Darmstadt)
MOPS	Fa. ICN (Eschwege)
Saccharose	Fa. Biorad (München)
SDS	Fa. Gerbu (Gaiberg)
TEMED	Fa. Amresco (Ohio, USA)
Triton X-100	Fa. Roche (Mannheim)
Trypton	Fa. Difco (Heidelberg)
X-Gal	Fa. Applichem (Darmstadt)

2.1.2 Puffer & Lösungen

Alle Lösungen wurden mit deionisiertem, Millipore-gereinigtem Wasser angesetzt und anschließend autoklaviert oder sterilfiltriert.

Antibiotika & Antimycotika:

Ampicillin

Stammlösung: 100 mg/ml in H₂O
Endkonzentration: 50-100 µg/ml

Doxyzyklin

Stammlösung: 200 µg/ml in PBS
Endkonzentration: 1 µg/ml

Penicilin

Stammlösung: 10.000 U/ml
Endkonzentration: 100 U/ml

Streptomycin

Stammlösung: 10.000 µg/ml
Endkonzentration: 100 µg/ml

Amphotericin B

Stammlösung: 25 µg/ml
Endkonzentration: 0,25 µg/ml

Agarplatten

15 g Agar-Agar
ad 1 l LB-Medium

Chromosomen-Denaturierungslösung

70 % Formamid (deionisiert)
2x SSC

Church-Hybridisierungslösung

1 mM EDTA, pH 8,0
0,5 M NaHPO₄, pH 7,2
7 % SDS
1 % BSA

Church-Wash1

0,5 % BSA
5 % SDS
1 mM EDTA, pH 8,0
40 mM NaHPO₄

Church-Wash2

0,1 % SDS
1 mM EDTA, pH 8,0
40 mM NaHPO₄

DNA-Denaturierungslösung

1,5 M NaCl
0,5 M NaOH

DNA-Ladepuffer

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

DNA-Neutralisierungslösung

0,5 M TrisHCl, pH 7,0
1,5 M NaCl

6x DNA-Probenpuffer

0,25 % Bromphenolblau
0,25 % Xylencyanol
40 % Saccharose

10x DNaseI-Puffer

100 mM MgCl₂
10 mM DTT

FISH-Waschlösung 1

0,4x SSC
0,3 % (v/v) Nonidet P-40

FISH-Waschlösung 2

2 x SSC
0,1 % (v/v) Nonidet P-40

2x FM-Medium

65 % Glycerin
0,1 M MgSO₄
0,025 M TrisHCl, pH 8,0

Fixativ

3 Teile Methanol (abs.)
1 Teil Essigsäure (100%)
frisch angesetzt, -20°C

Hybridisierungspuffer

4x SSC
20 % Dextransulfat

Hypotone Lösung

0,2 % KCl
0,2 % (w/v) tri-Natriumcitrat

Kaliumphosphatpuffer 0,1M, pH 7,8

4,5 ml K₂HPO₄ 1M
0,3 ml KH₂PO₄ 1M
ad 50 ml H₂O bidest

LB-Medium

10 g Trypton
5 g Hefeextrakt
10 g NaCl
ad 1 l H₂O bidest pH 7,5

LUC Assay-Puffer

25 mM Glycyl-Glycin, pH 7,8
15 mM Kaliumphosphat-Puffer, pH 7,8
15 mM MgSO₄
4 mM EGTA
2 mM ATP
1 mM DTT (erst vor Gebrauch zugeben!)

LUC Lyse-Puffer

25 mM Glycyl-Glycin, pH 7,8
15 mM MgSO₄
4 mM EGTA
1 % Triton X-100 (v/v)
1 mM DTT (erst vor Gebrauch zugeben!)

LUC Stock-Puffer

25 mM Glycyl-Glycin, pH 7,8
15 mM MgSO₄
4 mM EGTA
0,2 mM D-Luciferin
1 mM DTT (erst vor Gebrauch zugeben!)

10x MOPS

0,2 M 3-N-Morpholin-Propan-Sulfonsäure
0,05 M Natriumacetat
0,01 M EDTA, pH 7,0

PBS

120 mM NaCl
2,7 mM KCl
10 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4

10x PCR-Puffer

500 mM KCl
100 mM TrisHCl, pH 8,3
15 mM MgCl₂

RNA-Hydrolyselösung

50 mM NaOH
10 mM NaCl

6x RNA-Ladepuffer

0,25 % (w/v) Bromphenolblau
0,25 % (w/v) Xylencyanol
30 % Glycerin

RNA-Neutralisierungslösung

10x SSC
0,2 M TrisHCl, pH 7,4

1,5x RNA-Probenpuffer

61 µl Formaldehyd
150 µl Formamid (deionisiert)
37,5 µl 10x MOPS-Puffer
1,5 µl H₂O

SOB-Medium

20 g Casein
5 g Hefeextrakt
20 mM NaCl
5 mM KCl
5 mM MgCl₂ (nach Autoklavieren steril zugeben)
5 mM MgSO₄ (nach Autoklavieren steril zugeben)

Sondendenaturierungslösung

50 % Formamid (deionisiert)
2x SSC
10 % Dextransulfat

20x SSC-Puffer

3 M NaCl
0,3 M tri-Natriumcitrat, pH 7,0
STETL-Puffer
50 mM Tris pH 8,0
50 mM EDTA
5 % Triton X-100
8 % Saccharose

10x TAE-Puffer

400 mM Tris
1 mM EDTA, pH 8,0

Tail-Lysepuffer

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

50x TAE-Puffer

2M Tris-Acetat
0.05 M EDTA, pH 8.3

10x TBE-Puffer

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

10x TE-Puffer

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

Tfbl-Puffer

30 mM Kaliumacetat
50 mM MnCl₂
100 mM KCl
10 mM CaCl₂
15 % Glycerin (einstellen: pH 5,8 mit Essigsäure)

Tfbll-Puffer

10 mM NaMOPS, pH 7,0
75 mM CaCl₂
10 mM KCl
15 % Glycerin

10x Transferpuffer

144 g Glycin
30 g Tris
ad 1 l Aqua bidest

X-Gal-Lösung

5 mM K₃Fe(CN)₆
5 mM K₄Fe(CN)₆
2mM MgCl₂
1 mg/ml X-Gal (in PBS pH 7,4)
5x Zell-Lysepuffer
62,5 mM EDTA
2,5 % SDS

2.1.3 Enzyme

Alkalische Phosphatase	Fa. Roche (Mannheim)
DNaseI (RNase frei)	Fa. Roche (Mannheim)
Klenow Exo-	Fa. NEB (Frankfurt)
M-MLV Reverse Transkriptase	Fa. Invitrogen (Karlsruhe)
Proteinase K	Fa. Roche (Mannheim)
Restriktionsendonukleasen (alle)	Fa. NEB (Frankfurt)
Ribonuklease Inhibitor	Fa. MBI Fermentas (Leon-Roth)
RNase A	Fa. Sigma (München)
T ₄ -DNA-Ligase hc	Fa. Invitrogen (Karlsruhe)
Taq-Polymerase	Fa. Roche (Mannheim)

2.1.4 Kits

<i>BigDye Sequencing Kit</i> Version 3.1	Fa. Applied Biosystems (Weiterstadt)
<i>EndoFree Plasmid Maxi Kit</i>	Fa. Qiagen (Hilden)
<i>Expand High Fidelity PCR System</i>	Fa. Roche (Mannheim)
<i>Gel Extraction Kit</i>	Fa. Qiagen (Hilden)
<i>M-MLV RT Kit</i>	Fa. Invitrogen (Karlsruhe)
<i>Mutagenese Kit</i>	Fa. Stratagene (Amsterdam)
<i>Nick-Translation Kit</i>	Fa. Vysis (Bergisch-Gladbach)
<i>Nucleobond AX Kit</i>	Fa. Macherey und Nagel (Breitenfurt)
<i>Prime it II Labelling Kit</i>	Fa. Stratagene (Amsterdam)
<i>RNeasy RNA Extraction Kit</i>	Fa. Qiagen (Hilden)
<i>RPM Kit</i>	Fa. Q-Biogene (Heidelberg)

2.1.5 Plasmide & Vektoren

pBI-EGFP	Fa. Clontech (Heidelberg)
pBlueskript II SK (+)	Fa. Stratagene (Heidelberg)
pGem-11Zf (+)	Fa. Promega (Mannheim)
pCR II-TOPO	Fa. Invitrogen (Karlsruhe)
pUHD 172-1 rtTA	Gossen <i>et al.</i> 1995
pUHT 61-1 ^o tTA	Urlinger <i>et al.</i> 2000

2.1.6 Größenstandards

100 bp DNA-Leiter	Fa. NEB (Frankfurt)
λ-DNA/HindIII-Fragments	Fa. Invitrogen (Karlsruhe)
1kb DNA-Leiter	Fa. NEB (Frankfurt)
RNA-ladder	Fa. Invitrogen (Karlsruhe)

2.1.7 BAC-Klone

<i>Mouse BAC Library (Kidney, Brain) No. 731</i> , Roswell Park Cancer Institute RPCI-23	
Hersteller:	Tateno, M., Osoegawa, K., de Jong, P. J.
Vektor:	pBACe3.6 in <i>E. coli</i> DH10B
Klone:	RP23-393G10
	RP23-249O6
	RP23-232D1
	RP23-257O17

2.1.8 Bakterienstämme

E. coli DH5 α

F⁻, *supE44*, *hsdR17*, *recA1*, *DlacU169*, *f80dlacZDM15*, *endA1*, *gyrA96*, (*rk*⁻, *mk*⁺), *thi-1*, *relA1*, *supE44*, *l*⁻

E. coli TOP 10

F⁻, *mcrA*, *D(mrr-hsdRMS-mcrBC)*, *f80dlacZDM15*, *DlacI74*, *deoR*, *recA1*, *araD139*, *D(ara-leu)7697*, *ga/u*, *ga/K*, *rpsL*, *endA1*, *rmpG*

E. coli XL-1Blue (Supercompetent Cells; Fa. Stratagene)

RecA1, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17*, *supE44*, *relA1*, *lac* [*F'*, *proAB*, *lac*^f*ZDM15*, *Tn10*, *Tet*^r]

E. coli XL-1Blue MRF' (Electroporation Competent Cells; Fa. Stratagene)

Δ (*mcrA*) 183, Δ (*mcrCB-hsdSMR-mrr*) 173, *endA1*, *supE44*, *thi-1*, *recA1*, *gyrA96*, *relA1*, *lac* [*F'*, *proAB*, *lac*^f*ZDM15*, *Tn10*, *Tet*^r]

2.1.9 Radioisotope

α (³²P)dCTP (3000 Ci/mmol)

Fa. Amersham (Freiburg)

2.1.10 Verbrauchsmaterialien

Cell Strainer (40 μ m ² Porengröße)	Fa. BD Falcon (Heidelberg)
Deckgläser (versch. Maße)	Fa. IDL (Nidderau)
Elektroporationsküvetten	Fa. Biorad (München)
FACS Rundbodenröhrchen	Fa. Becton Dickinson (Heidelberg)
Hyperfilme	Fa. Amersham (Freiburg)
Kryoröhrchen	Fa. Nalgene (Schwerte)
Kulturflaschen (T25 oder T75)	Fa. Renner (Dannstadt)
Kulturschalen (10 cm)	Fa. Renner (Dannstadt)
Nylonmembran, Hybond N+	Fa. Amersham (Freiburg)
Objektträger 76 x 26 mm	Fa. IDL (Nidderau), Fa. Menzel (Braunschweig)
PCR-Reaktionsgefäße (0,5 ml)	Fa. Peqlab (Erlangen)
Petrischalen (10 cm)	Fa. Greiner (Frickenhausen)
Pipetten (5 ml, 10 ml und 25 ml)	Fa. Greiner (Frickenhausen)
PP-Röhrchen (15 ml und 50 ml)	Fa. Greiner (Frickenhausen)
Reaktionsgefäße (1,5 ml und 2 ml)	Fa. Eppendorf (Hamburg)
Schnappdeckel PP-Röhrchen	Fa. Falcon (Heidelberg)
S&S-Rotrand Sterilfilter (0,22 μ m ²)	Fa. Schleicher und Schuell (Dassel)
Szintillationsröhrchen	Fa. Roth (Karlsruhe)

2.1.11 Histologie

Accustain HE-Färbung	Fa. Sigma (München)
Einbettmedium <i>tissue tek</i>	Fa. Sakura (Heppenheim)
Entellan (Eindeckmedium)	Fa. Merck (München)
Glutaraldehyd	Fa. Sigma (München)
Kernechtrot (Färbelösung)	Fa. Chroma (Waldeck)

2.1.12 Zellkulturmaterialien

Alle Zellkulturgefäße und Zellkulturplatten wurden von der Firma Renner (Dannstadt) bezogen.

DMEM	Fa. Cambrex (Verviers, Belgien)
RPMI-1640	Fa. Gibco BRL (Karlsruhe)
FCS (Tet-frei)	Fa. PAN (Aidenbach)
L-Glutamin	Fa. PAN (Aidenbach)
PBS (-CaCl ₂ , -MgCl ₂)	Fa. Gibco BRL (Karlsruhe)
Penicillin/Streptomycin	Fa. PAN (Aidenbach)
Trypsin/EDTA	Fa. PAN (Aidenbach)

2.1.13 Tiere

Die verwendeten Mäuse stammten entweder aus eigener Zucht oder wurden von der Firma Charles River (Sulzberg) bezogen. Die Haltung der Tiere erfolgte nach den Maßgaben des Deutschen Tierschutzgesetzes. Für die Generierung der transgenen Mauslinien wurden folgende Mausinzuchtstämme und ES-Zelllinien verwendet:

Mäuse:	FVB/N; C57BL/6; 129; DBA
ES-Zellen:	W9.5 [129/Sv. C3 + ^C + ^P] (Szabó und Mann 1994)

Für die Charakterisierung der *Wt1-Responder*- und *Wt1-Effektor*-Tiere wurden uns freundlicherweise folgende Effektor-Mäuse zur Verfügung gestellt:

<i>Fabp-rtTA</i>	Saam <i>et al.</i> 1999
<i>CMV-rtTA</i>	Kistner <i>et al.</i> 1996
<i>LAP-tTA</i>	Kistner <i>et al.</i> 1996, Gallagher <i>et al.</i> 2003
<i>Sycp-Cre</i> (Deleter)	Vidal <i>et al.</i> 1998
<i>TetO_{br}-Luc/Cre</i>	Hasan <i>et al.</i> 2001
<i>TetO_{bi}lacZ/GFP</i>	Krestel <i>et al.</i> 2001
<i>ROSA26-Stop^{fllox}-LacZ</i>	Soriano 1999

2.1.14 Geräte

Agarose-Gelelektrophorese	Easy-Cast Electrophoresis System (versch. Größen); Fa. Owl Scientific (USA)
Bakterieninkubator	Typ B5042; Fa. Heraeus (Hanau)
DNA-Sequenziergerät	ABI Prism™377; Fa. Applied Biosystems (Weiterstadt) Software: DNA-Analysis V2.1.2 Rechner: Power Macintosh 7200/90; Fa. Apple (USA)
Elektroporationsanlage	Gene Pulser; Fa. BioRad (München)
Geldokumentation	E.A.S.Y. System; Fa. Herolab (Wiesloch)
Heizblock	MR 2002; Fa. Heidolph (Schwalbach)

Hybridisierungsöfen	Hybridiser HB-2; Fa. Techne (GB)
Kryostat	1720 Fa. Leica (Wetzlar)
Laborwaage	LC 2201 Fa. Sartorius (Göttingen)
Labor-Feinwaage	BA110 Fa. Sartorius (Göttingen)
Luminometer	Lumat LB-9507; Fa. Berthold (Wildbad)
Magnetrührer	Fa. Ika Labortechnik (Stauffen i. Br.)
Mikroskope	Fluoreszenzmikroskope Typ DM RBA und RXA; Fa. Leica (Wetzlar) Phasenkontrastmikroskop Laborlux S Fa. Leica (Wetzlar) Durchlichtmikroskop BX 50 WI Fa. Olympus (Hamburg)
PCR-Geräte	TC-1 DNA-Thermal Cycler; Fa. Perkin Elmer (Weiterstadt) PTC 200 und PTC 100; Fa. MJ Research (USA) <i>Mastercycler gradient</i> Fa. Eppendorf (Hamburg) <i>Light Cycler 1.5</i> Fa. Roche (Mannheim)
pH-Meter	Fa. Knick (Berlin)
Photometer	Ultrospec III; Fa. Pharmacia (Freiburg)
Schüttelinkubator	Lab-Therm; Fa. Kühner (Schweiz)
Spannungsgeräte	LKB-GPS 200/400; Fa. Pharmacia (Freiburg) 2297 Macrodrive 5; Fa. LKB Bromma (USA)
Sterilbänke	DLF/BSS-6; Fa. Cleanair (Deutschland) LaminAir 1.2 Fa. Holten (Dänemark)
Stratalinker	UV 1800 Fa. Stratagene (Amsterdam)
Szintillationszähler	Liquid Scintillations Counter Wallace-1410; Fa. Pharmacia (Freiburg)
Thermomixer	Comfort 1,5 ml Fa. Eppendorf (Hamburg)
Ultra-Turrax	T25; Fa. Janke und Kunkel (Stauffen)
Vakuumtrockner	Univapo 100H, Refrigerated Aspirator; Fa. Uni-Equip (Martinsried)
Vortex	Fa. Ika Labortechnik (Stauffen i. Br.)
Wasserbäder	2219 Multitemp II; Fa. LKB Bromma (USA) F10; Fa. Julabo (USA)
Zellkulturinkubator	IR 1500 Automatic CO ₂ Inkubator; Fa. Flow Laboratories (USA)

Zentrifugen	Biofuge fresco A; Fa. Heraeus (Hanau) Zentrifuge 5415C; Fa. Eppendorf (Hamburg) Kühlzentrifuge 5804R; Fa. Eppendorf (Hamburg) Kühlzentrifuge 6000D; Fa. Sorvall (Langenselbold)
-------------	--

2.1.15 Oligonukleotidsequenzen

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

Generierung *Wt1-targ2*:

tTA-XhoI-For	5'-CTC GAG CCA CCA TGT CTA GAC TGG ACA AGA GCA AAG-3'
tTA-NotI-Rev	5'-GCG GCC GCA AGC TTG GTC GAG CTG ATA CTT-3'
Tkneo-NotI-For	5'-AGA TGC GGC CGC ATA ACT TCG-3'
Tkneo-NsiI-Rev	5'-ATG CAT AAA CTC TAG ACT CGA GGA ATT-3'
xxx-Nsi 3'hom-FOR	5'-GGT CCA ATG CAT TTC TTA CTC AGC AGC CTT CCA-3'
xxx-Nsi 3'hom-REV	5'-GCA TTG TTC GCA ATG CAT GAA GGA ATG GTT GGG GAA CT-3'

Mutagenese-Primer:

WT muta-FOR	5'-GGA GAA CCG TCC GCA CTC GAG CCG CAC CTC ATG-3'
WT muta-REV	5'-CAG GAG GTG CGG CTC GAG TGC GGA CGG TTC TCC-3'
Muta-3'Wt1-FOR	5'-TTT TTG GAC CAA AAA TTC TGA ATT CTT TGG TCT GGG TGT TTC TGA-3'
Muta-3'Wt1-REV	5'-TCA GAA ACA CCC AGA CCA AAG AAT TCA GAA TTT TTG GTC CAA AAA-3'

Sequenzierung *Wt1-targ2*:

tTA-FOR 1	5'-CCA TGT CTA GAC TGG ACA AGA-3'
tTA-FOR 2	5'-TTT ACA CTG GGC TGC GTA TTG-3'
tTA-FOR 3	5'-GTG AAA TTT GTG ATG CTA TTG-3'
tTA-FOR 4	5'-GGC CTG GAA TGT TTC CAC CCA-3'
tTA-FOR 5	5'-TGT CAA GAC CGA CCT GTC CGG-3'
tTA-FOR 6	5'-TGG CGG ACC GCT ATC AGG ACA T-3'
tTA-REV 1	5'-AGA GTC AAC GCC TGG TGA GGC-3'
tTA-REV 2	5'-GCC AAG CTC TTC AGC AAT ATC-3'
tTA-REV 3	5'-GAC AAC GTC GAG CAG AGC TGC-3'
tTA-REV 4	5'-CCC GAC TGC ATC TGC GTG TTC-3'
tTA-REV 5	5'-GGC GGG CGC TCT GCT CAT GGA-3'
tTA-REV 6	5'-GGC TGG GAG CAT GTC TAA GTC-3'
tTA-REV 7	5'-CGG AAT GAC TTG GCG TTG TTC CGC-3'
SEQ3'muta-FOR	5'-GTC TTC AGT CAA TGC ACG AGT-3'
SEQ3'muta-REV	5'-AAG ACC AGG CAT TCC TGT TCT-3'
tTA/5'-REV	5'-TTC ACG TGC CAG TAC AGG GTA-3'
tTA/Neo-FOR	5'-GTC CCA CCA GGT CAA CAG GCG-3'
Neo/tTA-REV	5'-AAC CAC ACT GCT CGA CAT TGG-3'

Neo/3'-FOR 5'-TGA CGA GTT CTT CTG AGG GGA-3'
 3'/Neo-REV 5'-AGC TGG AAG TTC TTC GGG TCG-3'
 3'/pGem-FOR 5'-CTG CCG CTT CTT CAG GAT ACA G-3'

Kontrolle der homologen Rekombination:

Expa5'Wt1-tII-For 5'-GTT GGT TGC CCA AGT GAA GGT-3'
 Expa5'Wt1-tII-Rev 5'-GAG CGA GTT TCC TTG TCG TC-3'
 Expa3'Wt1-tII-For 5'-GGG TGT TGG GTC GTT TGT T-3'
 Expa3'Wt1-tII-Rev 5'-TCT CTA AAC GAA CCC TTC TCC A-3'
 3'check REV 2 5'-CCT CTC ACC AAT AGA GTG GGA G-3'
 3'check REV 3 5'-GGC CCC ATC ACA AAT GGA CTC-3'
 3'check REV 4 5'-CTG AGC CCA TCT CGA GGA GGG-3'
 3'check REV 5 5'-CCT GAG ACA AGC AGA TTC CTC-3'
 3'hom REV 3,3 5'-GAC GAA TTC CTG AGT GGC CAA TGA TCT CAG-3'

Splinkerette-PCR:

SPLNK-top 5'-CGA ATC GTA ACC GTT CGT ACG AGA ATT CGT ACG AGA
 ATC GCT GTC CTC TCC AAC GAG CCA AGG-3'
 SPLNK-BamHI 5'-GAT CCC TTG GCT CGT TTT TTT TTG CAA AAA-3'
 SPLNK-HindIII 5'-AGC TTC TTG GCT CGT TTT TTT TTG CAA AAA-3'
 SPLNK-0 5'-CGA ATC GTA ACC GTT CGT ACG AGA A-3'
 SPLNK-1 5'-TCG TAC GAG AAT CGC TGT CCT CTC C-3'
 Splnk-C2 For 5'-ATG TAT TGG CGG GTC TTC AG-3'
 Splnk-C2 Rev 5'-TTC TTC TTT TGG GCT GGT TG-3'

Charakterisierung und Genotypisierung der Mäuse:

Fabp/rtTA-F 17.1 5'-CGC CCA GAA GCT AGG TGT AG-3'
 Fabp/rtTA-F 17.1 5'-GCT CCA TCG CGA TGA CTT AG-3'
 Fabp/hGH-F 5'-AGG TGG CCT TTG ACA CCT ACC AGG-3'
 Fabp/hGH-R 5'-TCT GTT TGT TTT CCT CCC TGT TGG-3'
 rtTAi F 5'-GCT GTG GGG CAT TTT ACT TT-3'
 rtTAii R 5'-AGG GCA TCG GTA AAC ATC TG-3'
 tTA-For 61.1 5'-CCA TGT CTA GAC TGG ACA AGA G-3'
 tTA-Rev 61.1 5'-CAT AGA ATC GGT GGT AGG TGT C-3'
 Neo id-F 5'-TGA ATG AAC TGC AGG ACG AG-3'
 Neo id-R 5'-CGA TAC CGT AAA GCA CGA GG-3'^{hE}
 Neo-Cre F1 5'-GGG AAG TAT CAG CTC GAC CA-3'
 mWT1-RT F.2 5'-GGT GGC ACA GTT GTC AGA AA-3'
 pBI-2 (r) 5'-TCA TGA GGG TCC ATG TGT ATA-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'
 EGFP F id 5'-GGA CCA TGT GAT CGC GCT TCT-3'
 EGFP R id 5'-GTT CAT CTG CAC CAC CGG CAA G-3'
 mus Wt1 F 5'-CTT CCG AGG CAT TCA GGA T-3'
 mus Wt1 R 5'-TCT GAT GCA TGT TGT GAT-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'
LUC-1 F	5'-TTT TCC GTC ATC GTC TTT CC-3'
LUC-1 R	5'-TTC TTC GCC AAA AGC ACT CT-3'
hGFP/lacZ-13	5'-GCG GAG AGG GTG AAG GTG ATG-3'
hGFP/lacZ-12	5'-CAG GGC CGT CGC CGA TTG G-3'
Cre 1	5'-CCG GTT ATT CAA CTT GCA CC-3'
Cre 2	5'-CTG CAT TAC CGG TCG ATG CAA-3'
GAPDH-63	5'-CGT CTT CAC CAC CAT GGA GA-3'
GAPDH-64	5'-CGG CCA TCA CGC CAC AGT TT-3'
Wt1-k.o. contr F1	5'-GCT CTG TCA AAT GCG AGT GA-3'
Wt1-k.o. contr R	5'-CAG GTT ACA GCC AAC CTC CT-3'
Wt1 k.i. contr R1	5'-CCC TAA ACC ACA GCA CCA CT-3'

Oligonukleotide zur Generierung der Sonden:

SV40pA F	5'-ACG CTG GTC GAG CTG ATA CT-3'
SV40pA R	5'-ACG CTA TCT GTG CAA GGT CC-3'
β-Globin F id	5'-CTG AGA ACT TCA GGG TGA GTT-3'
β-Globin R id	5'-CAG TGT ATA TCA TTG TAA CC-3'
5'OP-Bgl2-FOR	5'-CTT CCG TCT AGA TGT GAT GGT-3'
5'OP-Bgl2-REV	5'-GTC ACT TGG CAA CCA ACA GC-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'
Eff5/5-F	5'-TGA TGG GAA TAA GCC TCT GC-3'
Eff5/5-R	5'-TGT GTC CCT TGG ATA CCA CA-3'
Eff5/3-F	5'-ACA AAG CCA TTC CCA GAC AG-3'
Eff5/3-R	5'-CCA TGG CAC CAT GTA CTC AG-3'
Wt1 Ex2-FOR	5'-CTT CCC TGC CGC TTC TTC-3'
Wt1 Ex4-REV	5'-CCC TGA AAA TGA TTT AAA CAG GTA-3'

Vektor-Primer :

T3	5'-ATT AAC CCT CAC TAA AGG G-3'
T7	5'-AAT ACG ACT CAC TAT AGG G-3'
Sp6	5'-ATT TAG GTG ACA CTA TAG AAT AC-3'
M13 for	5'-GTA AAA CGA CGG CCA GTG-3'
M13 rev	5'-CAG GAA ACA GCT ATG ACC ATG-3'

Oligonukleotide für RT-PCR:

T16	5'-TTT TTT TTT TTT TTT T-3'
MusAktin A5	5'-GAA GAG CTA TGA GCT GCC TG-3'
MusAktin A3	5'-CCT GCT TGC TGA TCC ACA TC-3'
mWT1-RT F.2	5'-GGT GGC ACA GTT GTC AGA AA-3'
pBI-6 (r)	5'-AGA TGC TCA AGG GGC TTC AT-3'
mWt1-Seq 3	5'-ACC CAG GCT GCA ATA AGA GA-3'
WT1-MF	5'-TCC CGG TCC GAC CAT CTG-3'

2.2 DNA-Standardmethoden

2.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen

Die Gewinnung kleiner Mengen Plasmid-DNA (Mini-Präparation) aus Bakterienkulturen erfolgte je nach benötigtem Reinheitsgrad in der Regel unter Verwendung des *RPM-Kits* (Fa. Q-Biogene, Heidelberg) genau nach Angaben des Herstellers.

Für die Analyse mit Restriktionsendonukleasen wurde ein Protokoll von Sambrook *et al.* 1989 (Mini-Schnellpräparation) angewandt. Dazu wurden 1,5 ml einer Bakterienkultur (ÜN, 3 ml, 37°C, 220 upm) 30 sec zentrifugiert (RT, maximale Geschwindigkeit), der Überstand verworfen und das Zellpellet in 250 µl STETL-Puffer aufgenommen und 1 min gekocht. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (10 min, RT, maximale Geschwindigkeit) wurde das pelletierte Bakterienlysate entfernt und die freigesetzte Plasmid-DNA durch Zugabe von 220 µl Isopropanol, Mischen und Zentrifugation (10 min, RT, maximale Geschwindigkeit) gefällt. Nach einem Waschschriff mit 70 % Ethanol wurde die DNA getrocknet und in 30 µl RNaseA-haltigem (50 µg/ml) Wasser aufgenommen.

Die Isolierung größerer Mengen Plasmid-DNA (Midi- oder Maxi-Präparation), sowie von BAC- und PAC-DNA wurde mit Hilfe des *Nucleobond AX-Kits* (Fa. Macherey und Nagel, Breitenfurt) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Plasmid-DNA wurde nach der Isolierung in einer geeigneten Menge 1/10x TE gelöst.

Plasmid-DNA für die Herstellung von transgenen Mäusen durch die Injektion der DNA in die Vorkerne befruchteter Oozyten bzw. durch die Elektroporation in ES-Zellen wurden immer mit Hilfe des *Endofree Plasmid Maxi Preparation-Kits* der Fa. Qiagen (Hilden) isoliert und nach EtOH-Fällung (s. Kap. 2.2.5) in sterilem H₂O *Aqua ad injectabilia* der Fa. Braun (Melsungen) gelöst.

2.2.2 Isolierung von genomischer DNA aus Zellkulturen

Für die Gewinnung von genomischer DNA aus Zellkulturen (z. B. Mausemryo-Fibroblasten, MEF) in 10 cm Kulturschalen wurden die eukaryotischen Zellen einmal mit PBS gespült, trypsinisiert (250 µl 1x Trypsin/EDTA), anschließend das Zellpellet nach Zentrifugation (2 min, RT, maximale Geschwindigkeit) in 280 µl 1x Zell-Lysepuffer mit 1 mg/ml Proteinase K resuspendiert und für 1 h bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 70 µl NaCl (5 M) und 350 µl Isopropanol wurde die DNA durch Zentrifugation (15 min, RT, maximale Geschwindigkeit) gefällt, mit 70 % Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in 30 µl 1/10x TE gelöst. Für eine analytische PCR wurden 3 µl eingesetzt.

2.2.3 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA erfolgte spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260$ nm, dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren. Bei dieser Wellenlänge entspricht eine optische Dichte von 1 einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ doppelsträngiger DNA bzw. 40 $\mu\text{g/ml}$ RNA. Verunreinigungen durch Proteine können bei 280 nm gemessen werden. Der Quotient aus der OD_{260} und OD_{280} liegt bei reinen DNA-Präparationen bei 1,8 bis 2,0.

Die DNA und RNA wurde üblicherweise 1:100 oder alternativ 1:50 verdünnt und anschließend die Konzentration in einer Quarzglasküvette bei 260 nm gemessen.

2.2.4 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Vor Fällungen (s. Kap. 2.2.5) oder Ligationen (s. Kap. 2.3.4) wurde die DNA zur Aufreinigung durch zweimalige Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)-Extraktion und einmalige Chloroform/Isoamylalkohol (24:1)-Extraktion von Enzymen und anderen Proteinen befreit. Dabei betrug das Volumenverhältnis von DNA-Lösung zu Extraktionslösung 1:1. Die wässrige, DNA-enhaltende Oberphase wurde nach Zentrifugation (5 min, RT, max. Geschwindigkeit) jeweils in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

2.2.5 Fällung von DNA

In der Regel wurde DNA durch Zugabe von 1/10 Volumenteilen 3 M Natriumacetat und 3 Volumenteilen 100 % Ethanol 30 min bei RT (4°C in Ausnahmefällen) und maximaler Geschwindigkeit in der Zentrifuge gefällt. Nach dem Waschen mit 70 % Ethanol und anschließendem Trocknen im Vakuumtrockner, wurde das Pellet in einem geeigneten Volumen 1/10x TE aufgenommen.

PCR-Produkte wurden mit 1 Volumenteil 4 M Ammoniumacetat und 2 Volumenteilen frischem Isopropanol 30 min bei RT und maximaler Geschwindigkeit gefällt. Dabei können die aus der PCR stammenden *Primer* und kleine DNA-Fragmente (< 80 bp) selektiv entfernt werden. Die gefällte DNA wurde dann ebenfalls mit 70 % Ethanol gewaschen und nach einem Trocknungsschritt in einem geeignetem Volumen 1/10x TE aufgenommen.

Für sehr effektive Fällungen wurde die gelöste DNA auf ein Volumen von 200 μl mit 1/4x TE aufgefüllt und nach Zugabe von 3 μl Glykogen, 100 μl 10 M Ammoniumacetat und 900 μl 100 % Ethanol für 20 min (4°C, max. Geschwindigkeit) zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde viermal mit 70 % Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in einer geeigneten Menge destilliertem Wasser gelöst.

2.2.6 Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente können auf Grund ihrer negativen Ladung im elektrischen Feld aufgetrennt werden. Dies geschah in horizontalen Gelelektrophorese-Apparaturen mit Agarose-Gelen, wobei im Normalfall 1x TBE als Puffersystem verwendet wurde. Die Konzentration der Agarose-Gele betrug größenabhängig von den aufzutrennenden DNA-Fragmenten (75 bp bis 20 kb) zwischen 0,8 und 2 %. Die Proben wurden vor der Elektrophorese mit 1/6 Volumen 6x DNA-Probenpuffer versetzt und bei Spannungen von 80 bis 120 V aufgetrennt. Als Molekulargewichtsstandard zur Abschätzung der DNA-Fragmentgrößen wurden 5 bis 10 µl *Hind*III-restringierte λ-DNA (Fa. Invitrogen, Karlsruhe) oder 100 bp-Leiter (Fa. NEB, Frankfurt) aufgetragen. Zur Darstellung der DNA wurden die Gele nach dem Lauf ~ 10 min im Ethidiumbromidbad gefärbt (5 µg/ml) und im Anschluss daran ~ 30 min in Wasser entfärbt. Es folgte die Betrachtung der Gele bei UV-Licht ($\lambda = 312 \text{ nm}$) und die anschließende Dokumentation mit dem E.A.S.Y. Videosystem (Fa. Herolab, Wiesloch).

Maxi-Agarose-Gele zur Auftrennung der restringierten ES-Zell-DNA aus 96-Loch-Mikrotiterplatten für die Analyse der homologen Rekombination hatten eine Konzentration von 0,8 % Agarose in 1x TAE als Puffersystem. Hier wurde noch vor dem Gießen, nach kurzem Abkühlen der Agarose-Lösung, die Ethidiumbromid-Stammlösung direkt ins Gel gegeben (1 µg/ml), um die mechanische Beanspruchung durch die Färbe- und Entfärbvorgänge zu vermeiden. Diese Arbeiten wurden unter dem Abzug durchgeführt. Der Gellauf erfolgte bei 35 V über Nacht (~ 15 h) mit anschließender Dokumentation (s. o.).

2.2.7 Wiedergewinnung von DNA aus Agarose-Gelen

Nach gelelektrophoretischer Auftrennung wurden ausgewählte DNA-Banden unter UV-Licht möglichst schnell, um DNA-Schädigungen zu vermeiden, mit dem Skalpell ausgeschnitten. Die Extraktion und Aufreinigung der DNA wurde mit dem *QIAquick Gel Extraction Kit* (Fa. Qiagen, Hilden) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Konzentrationsbestimmung der isolierten DNA erfolgte photometrisch.

2.2.8 Transfer von DNA auf Filtermembranen

2.2.8.1 Southern Blot

Der Transfer von DNA-Fragmenten auf Nylonmembranen erfolgte nach der von Southern (1975) beschriebenen Methode. Dazu wurden 10 bis 20 µg genomischer DNA mit geeigneten Restriktionsenzymen für 5 h bzw. ÜN verdaut (s. Kapitel 2.3.1) und mittels Phenol/Chloroform- und Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion (s. Kap. 2.2.4) aufgereinigt. Die Auftrennung der entstandenen DNA-Fragmente erfolgte gelelektrophoretisch

auf 0,8 bis 1 % Agarose-Gelen mit 1x TAE als Puffersystem. Nach Beendigung des Gellaufs wurden die Markerbanden mit einem Spatel durchstoßen und die Gele 15 min in 0,25 N HCl depuriniert. Nach zwei weiteren Inkubationsschritten für 30 min in DNA-Denaturierungslösung und 30 min in DNA-Neutralisierungslösung, erfolgte der Transfer der DNA-Fragmente auf eine Nylonmembran (Hybond N+, Fa. Amersham, Freiburg) für 15 bis 48 h in 10x SSC. Das *Blotting* der Fragmente erfolgte dabei durch Kapillarkräfte, wobei ein unidirektionaler Aufbau (Sambrook *et al.* 1989) verwendet wurde. Nach Abschluss des Transfers wurden mit Fettstift die Markerbanden eingezeichnet, die Filtermembran kurz in 2x SSC gewaschen und 30 min luftgetrocknet. Die Fixierung der DNA auf der Membran erfolgte durch Bestrahlung mit UV-Licht (1200kJ) in einem *UV Stratalinker 1800* (Fa. Stratagene, Amsterdam). Zur Darstellung der gesuchten DNA-Fragmente wurde im Anschluss eine Hybridisierung des Filters mit radioaktiv markierten Sonden durchgeführt (s. Kap. 2.7.2).

2.2.8.2 Dot Blot

Im Gegensatz zum oben beschriebenen *Southern Blot* kann mit dem *Dot Blot* genomische DNA ohne Verdau mit Restriktionsenzymen und gelelektrophoretische Auftrennung der Fragmente auf das Vorhandensein eines Transgens untersucht werden. Dazu wurden 15 µl genomischer Mausschwanz-DNA zur Denaturierung 5 min aufgekocht, auf Eis gestellt und 15 µl eiskaltes 20x SSC zugegeben. Als Membran wurde Hybond N+ (Fa. Amersham, Freiburg) verwendet, die vor dem Auftropfen der DNA mit Fettstift beschriftet und kurz in 10x SSC equilibriert wurde. Die Membran wurde auf 3 MM Whatman-Papier gelegt, das DNA/SSC-Gemisch (30 µl) in 5 µl-Schritten aufgetropft und anschließend 5 min getrocknet. Danach folgten Denaturierung (5 min in DNA-Denaturierungslösung) und Neutralisierung (2 min in DNA-Neutralisierungslösung) der DNA auf der Membran. Nach 30-minütigem Trocknen des Filters wurde dieser zweimal mit 1200kJ im *UV Stratalinker 1800* (Fa. Stratagene, Amsterdam) zur Fixierung der DNA bestrahlt.

2.2.9 Sequenzierung von DNA

Die routinemäßig angewendete DNA-Sequenzierung beruht auf der 1977 von Sanger *et al.* beschriebenen Kettenabbruchmethode, die von Lee *et al.* (1992) durch Verwendung fluoreszierender Didesoxynukleotide modifiziert wurde. Die Sequenzierung erfolgte mit dem *BigDye Sequencing Version 3.1 Kits* (Fa. Applied Biosystems, Weiterstadt) in einer linearen PCR-Reaktion mit verschiedenen Programmen je nach verwendeter Matrizen-DNA (s. u.). Für einen 10 µl Sequenzierungsansatz wurden 50 bis 100 ng PCR-Produkt, 1 bis 3 µg Plasmid-DNA bzw. 5 bis 10 µg BAC-DNA als

Matrize eingesetzt. Außerdem enthielt der Sequenzieransatz 10 pmol eines spezifischen *Primers*, 2 µl *BigDye Version 3.1* und 2 µl 5x Sequenzierungspuffer Version 3.1.

Die Produkte der Sequenzierungsreaktion wurden mit einer Natriumacetat/EtOH-Fällung präzipitiert und zweimal mit 70 % EtOH gewaschen. Nach der Vakuumtrocknung wurde die DNA in 2,5 µl Sequenzierladepuffer (Formamid und Blue-D-Puffer im Verhältnis 6:1) gelöst. Die anschließende Polyacrylamid-Gelelektrophorese, die Detektion der Fluoreszenzsignale und deren automatische Auswertung erfolgten genau nach den Angaben des Herstellers mit dem *ABI Prism 377 DNA Sequencer* (Fa. AB Applied Biosystems, Weiterstadt).

Verwendete Sequenzierprogramme:

PCR-Produkte und Plasmide: (30 Zyklen)

1 min 95°C

30 sec 95°C/ 10 sec 50°C/ 4 min 60°C

BAC-DNA: (35 Zyklen)

4 min 95°C

30 sec 95°C/ 5 sec 50°C/ 4 min 60°C

2.2.10 Analyse von DNA-Sequenzen

Die DNA-Sequenzdaten wurden mit der Sequencher 4.1 Software (Fa. Gene Codes Corporation, Inc., USA) computergestützt editiert und ausgewertet. Überlappende Nukleotidsequenzen wurden mittels des Sequencher-Programmes nach festzulegenden Parametern (Übereinstimmungsgrad in Prozent und Mindestüberlappung in Anzahl der Basen) angeordnet. Homologievergleiche mit öffentlichen Datenbanken (nicht redundante Gendatenbank, EST-Datenbank) wurden mit dem Programm BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) vorgenommen (Altschul *et al.* 1997). Dabei wurde der BLASTN-Algorithmus verwendet, bei dem ein Vergleich der Nukleotidsequenzen mit Einträgen von Nukleotidsequenzdatenbanken durchgeführt wird. Das BASIC BLAST Programm ist im Internet zugänglich unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>.

2.3 Klonierung von DNA-Fragmenten

2.3.1 Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Der Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen erfolgte entsprechend den Angaben des jeweiligen Enzymherstellers und unter Benutzung der mitgelieferten oder empfohlenen Puffer. Die eingesetzte Enzymmenge und die Dauer der Restriktion wurde dabei auf die DNA-Quantität abgestimmt. Routinemäßig wurde für analytische Restriktionsansätze in einem Gesamtvolumen von 30 µl eine Menge von 200 ng bis 2 µg Plasmid-DNA (bzw. 5 µl aus Mini-Schnellpräparationen, s. Kap. 2.2.1) eingesetzt.

Präparative Ansätze enthielten in der Regel 2 bis 15 µg Plasmid-DNA in einem Gesamtvolumen von 100 µl. Für den Verdau von 1 µg DNA wurden etwa 5 U Restriktionsenzym zugegeben (max. 10 % des Gesamtvolumens). Die Restriktion erfolgte für mindestens 1 h (höchstens 1 h) bei dem für das Restriktionsenzym notwendigen Temperaturoptimum.

2.3.2 Auffüllen von überhängenden DNA-Enden

Beim Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen können je nach Enzym stumpfe (*blunt end*) oder überhängende (*sticky end*) DNA-Enden entstehen. Für manche Klonierungen ist es nötig, die *sticky ends* eines Fragmentes aufzufüllen, damit dieses z. B. in einen Vektor mit *blunt ends* ligiert werden kann. Dazu wurde zunächst die Restriktionsendonuklease im Verdauansatz (50 µl) 20 min hitzeinaktiviert und im folgenden der Ansatz mit 3 µl dNTPs (10 mM) und 1 µl des Enzyms Klenow Exo- (5 U/µl) für 1 h bei 37°C inkubiert. Im Anschluss folgte die Inaktivierung des Enzyms (20 min bei 65°C). Die mit den entsprechenden dNTPs aufgefüllten stumpfen Enden des Fragments konnten dann nach Aufreinigung durch Gelextraktion (s. Kap 2.2.7) oder Fällung (s. Kap. 2.2.5) in einen Vektor mit *blunt ends* ligiert werden.

2.3.3 Vektorvorbereitung und Dephosphorylierung von Vektorenden

Standardklonierungen (Ligation restringierter DNA-Fragmente in Plasmidvektoren) wurden mit den Vektoren pBlueskript II SK (+) (Fa. Stratagene, Heidelberg), pGem 11Zf (+) (Fa. Promega, Mannheim) sowie dem kommerziellen T-Vektor pCR II-TOPO (Fa. Invitrogen, Karlsruhe) durchgeführt. Alle drei Plasmide erlauben eine blau/weiß-Selektion der transformierten Bakterien. Dabei wurde die Plasmid-DNA (außer bei pCR II-TOPO) mit geeigneten Restriktionsendonukleasen in der Polyklonierungsstelle (MCS, *multiple cloning site*) linearisiert und das gewünschte DNA-Fragment anschließend durch Ligation (s. Kap. 2.3.4) und Transformation in *E. coli* (s. Kap. 2.3.8 und 2.3.9) kloniert.

Bei schrittweisen Klonierungsstrategien bzw. bei der Verwendung des Vektors pBI-EGFP (Fa. Clontech, Heidelberg), wo die Möglichkeit einer blau/weiß-Selektion rekombinanter Bakterien nicht gegeben ist, wurden die Enden der linearisierten Plasmid-DNA vor der Ligation dephosphoryliert, um eine Religation der Vektorenden zu unterbinden. Dies geschah durch die Behandlung der restringierten Plasmid-DNA mit alkalischer Phosphatase (AP), was das enzymatische Entfernen der Phosphatreste zur Folge hat. Hierfür wurden im mitgelieferten Dephosphorylierungspuffer oder direkt im Restriktionsansatz in einem Gesamtvolumen von 20 bis 30 µl, 1 bis 2 µg Plasmid-DNA mit 1 µl alkalischer Phosphatase für 15 min bei 37°C und anschließend für 15 min bei 56°C

inkubiert. Danach wurde die Reaktion für 1 min auf Eis abgekühlt. Nach erneuter Zugabe von 1 µl alkalische Phosphatase wurden die Inkubationsschritte wiederholt. Dann wurde der Reaktionsansatz auf 200 µl mit 1x TE aufgefüllt und die Plasmid-DNA zweimal mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol und einmal mit Chloroform/Isoamylalkohol aufgereinigt und mittels Ethanolfällung präzipitiert. Alternativ erfolgte die Aufreinigung der DNA über ein Agarose-Gel (vgl. Kap. 2.2.6) mit anschließender Extraktion (vgl. Kap. 2.2.7).

Für die Herstellung eigener T-Vektoren zur Klonierung von PCR- bzw. *Expand* PCR-Produkten wurden 3 µg EcoRV-restringierter DNA des Plasmidvektors pBluescript II SK (+) (Fa. Stratagene, USA) nach der Methode von Marchuck *et al.* (1990) mit 25 mM dTTP und 10 U Taq DNA-Polymerase bei 75°C für 2 bis 3 h inkubiert und anschließend über eine Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion aufgereinigt. Der so entstandene T-Vektor enthält ein einzelnes 3'-überhängendes Thymin-Desoxynukleotid und kann sich so besser an die 3'-überhängenden Desoxyadenosine der PCR-Produkte anlagern, was die Klonierungseffizienz wesentlich erhöht.

2.3.4 Ligation

Für die Ligation von DNA-Fragmenten in Plasmidvektoren wurde die Vektor-DNA bei Bedarf einer AP-Behandlung (s. Kap. 2.3.3) unterzogen, dann die beteiligten Produkte (Zielvektor und *Insert*) mittels Gelextraktion (s. Kap. 2.2.7) oder Phenol/Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion (s. Kap. 2.2.4) von Verunreinigungen befreit und mit anschließender Ethanolfällung (s. Kap. 2.2.5) präzipitiert.

Die Ligationsreaktionen wurden in der Regel in einem Gesamtvolumen von 20 µl mit T4 DNA-Ligase (*high concentrated*) der Fa. Invitrogen (Karlsruhe) im mitgelieferten Puffersystem gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Dabei wurde für die Ligation von PCR-Produkten in T-Vektoren (vgl. Kap. 2.2.3) das Protokoll für die Ligation von DNA-Fragmenten mit stumpfen Enden angewendet. Eine Modifikation der angegebenen Ligationsprotokolle wurde in Bezug auf die pro Reaktion eingesetzte Menge an Ligase eingeführt. So wurden für die Ligation von DNA-Fragmenten mit überhängenden Enden 0,5 U und für eine *blunt end*-Ligation 1 U T4 DNA-Ligase verwendet. *Blunt end*-Ligationsreaktionen wurden generell bei 16°C über Nacht, *sticky end*-Ligationen bei 16°C über Nacht oder bei Raumtemperatur für 1 bis 4 h durchgeführt. Vom Ligationsansatz wurden in der Regel 5 bis 10 µl für die Transformation kompetenter *E. coli*-Bakterien des Stammes DH5α bzw. TOP10 (s. Kap. 2.3.8 und 2.3.9) eingesetzt.

2.3.5 Herstellung chemokompetenter Bakterien nach Hanahan

Die Herstellung chemokompetenter Bakterien des Stammes *E. coli* DH5 α erfolgte nach einer modifizierten Methode von Hanahan (1985). Dazu wurden 100 ml LB-Medium mit einer *E. coli* DH5 α ÜN-Kultur (10 ml, 37°C, 220 upm) auf eine OD₅₅₀ von 0,05 beimpft und bis zu einer OD₅₅₀ von 0,5 bei 37°C schüttelnd inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde anschließend zentrifugiert (1200 g, 10 min, 4°C) und das Bakterienpellet in 30 ml eiskaltem TfbI-Puffer resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Bakterien erneut zentrifugiert (800 g, 6 min, 4°C) und das Pellet vorsichtig in 4 ml TfbII-Puffer resuspendiert, als 200 μ l Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zu Verwendung bei -80°C gelagert.

2.3.6 Herstellung elektrokompeter Bakterien

Für die Herstellung elektrokompeter *E. coli*-Bakterien des Stammes TOP10 wurden 25 ml LB-Medium angeimpft und ÜN bei 37°C mit 220 upm geschüttelt. Am folgenden Tag wurden 500 ml LB-Medium mit 5 ml ÜN-Kultur angeimpft und die Zellen bei 37°C und 220 upm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 (etwa 2 bis 3 h) geschüttelt. Mit Erreichen der optimalen OD wurden die Bakterien 30 min auf Eis inkubiert und danach 15 min bei 4°C und 2000 g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 500 ml eiskaltem H₂O *bidest* resuspendiert und erneut für 15 min bei 4°C und 2000 g zentrifugiert. Im Anschluss wurde das Bakterienpellet in 50 ml eiskaltem 10 % Glycerin resuspendiert und nach dem letzten Zentrifugationsschritt (15 min, 4°C, 2000 g) in 2 ml eiskaltem 10 % Glycerin resuspendiert, aliquotiert (100 μ l) und nach Schockfrieren in flüssigem Stickstoff bei -80°C bis zum Gebrauch aufbewahrt.

2.3.7 Errechnen der Transformationskompetenz von Bakterien

Die Kompetenz (*colony forming units (cfu)/ μ g DNA*) der hergestellten Bakterien wurde durch eine Testtransformation mit pUC18 Plasmid-DNA (10 pg/ μ l) ermittelt. Dafür wurde ein Aliquot (100 μ l) der zu testenden Bakterien mit 50 pg Plasmid-DNA transformiert (s. Kap. 2.3.8) und 10 μ l, 20 μ l sowie 50 μ l des Reaktionsansatzes auf LB-Agarplatten (mit 100 μ g/ml Ampicillin, 40 μ g/ml X-Gal und 50 μ g/ml IPTG) ausgestrichen und ÜN im Brutschrank (37°C) inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Platten zum nachbläuen der gewachsenen Klone für 2 h in einen 4°C Kühlschrank gestellt und dann ausgezählt. Für Transformationen wurden nur Bakterien mit einer Kompetenz größer als 1×10^7 verwendet. Die Kompetenz wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Cfu}/\mu\text{g DNA} =$$

gezählte Kolonien x Faktor* DNA für 1 μ g x 1100 μ l Reaktionsansatz / x μ l ausplattierte Menge

(*Bei 50 pg eingesetzter Plasmid-DNA beträgt der Faktor 20.000)

2.3.8 Transformation von Bakterien mittels Hitzeschock

Für Hitzeschock-Transformationen wurden in der Regel 5 bis 10 µl des Ligationsansatzes (s. Kap. 2.3.4) eingesetzt und in einem Schnappdeckelgefäß auf Eis vorgelegt. Es wurde ein Aliquot der kompetenten Bakterien DH5α schonend auf Eis aufgetaut, dann auf die DNA gegeben und durch Schwenken vorsichtig vermischt. Nach einer 30-minütigen Inkubationszeit auf Eis, erfolgte der Hitzeschock bei 42°C für 1 min mit erneuter kurzer Inkubation (1 min) auf Eis. Anschließend wurden 1 ml LB-Medium auf den Reaktionsansatz pipettiert und die Bakterien bei 37°C für 1 h schüttelnd (220 upm) inkubiert. Standardmäßig wurden 10 bis 300 µl des Transformationsansatzes auf LB-Agarplatten (mit 100 µg/ml Ampicillin, 40 µg/ml X-Gal und 50 µg/ml IPTG) ausgestrichen und für 15 bis 20 h bei 37°C im Brutschrank kultiviert.

2.3.9 Transformation von Bakterien mittels Elektroporation

Für die Transformation mittels Elektroporation wurden elektrokompetente Bakterien (100 µl) des Stammes TOP10 auf Eis aufgetaut, mit 2 bis 4 µl Ligationsansatz vorsichtig vermischt (s. o.) und in vorgekühlte, sterile Elektroporationsgefäße (Elektrodenabstand 1 mm; Fa. Biorad, München) überführt. Die Elektroporation erfolgte mit einem Genpulsar bei 2.0 V und 25 µFD (Fa. Biorad, München). Danach wurden die Bakterien sofort in 1 ml SOB- oder LB-Medium aufgenommen, in ein 15 ml Schnappdeckelgefäß überführt und 45 min bei 37°C geschüttelt (220 upm). Je Transformationsansatz wurden 10 bis 300 µl auf LB_{AMP}-Agarplatten (mit 100 µg/ml Ampicillin, 40 µg/ml X-Gal und 50 µg/ml IPTG) ausgestrichen und ÜN im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

2.3.10 Selektion und Analyse transformierter Bakterien

Potenziell positive Kolonien (2 bis 10 bei blau/weiß-Selektion) wurden in 3 ml ampicillinhaltiges LB-Medium (100 µg/ml Ampicillin) überimpft und ÜN bei 37°C im Schüttler (220 upm) inkubiert. Die Charakterisierung der Plasmidintegrate erfolgte nach DNA-Isolation (s. Kap. 2.2.1) durch Restriktionsverdau oder durch spezifische PCR-Reaktionen (s. Kap. 2.6.1).

War eine blau/weiß-Selektion nicht möglich, wurden die Klone nach einer Methode von Beuken *et al.* (1998), die sich das unterschiedliche Laufverhalten von chromosomaler DNA, RNA und Plasmiden verschiedener Größe in Agarose-Gelen zu Nutze macht, vorcharakterisiert. Hierfür wurden 150 µl der ÜN-Kultur in 1,5 ml-Eppendorfreaktionsgefäße überführt und 20 sec bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Das entstandene Bakterienpellet wurde mit 30 µl 6x Blaumarker und 15 µl Phenolchloroform versetzt und 1 min gevortext. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (5 min, RT, maximale Geschwindigkeit) konnten 10 µl des Überstandes auf einem 0,8 % Agarose-Gel

analysiert werden, wobei chromosomale DNA, RNA und Plasmide unterschieden werden und so Klone mit Plasmiden tendenziell richtiger Größe identifiziert werden konnten. Diese wurden dann einer näheren Analyse mittels Restriktionsverdau und PCR unterzogen.

2.3.11 Herstellung von Bakterien-Dauerkulturen (Glycerinkulturen)

Für die Herstellung von Dauerkulturen wurden 500 µl der entsprechenden Bakteriensuspension (in LB-Medium) mit 500 µl 2x FM-Medium vermischt und in einem Kryoröhrchen (Fa. Nalgene, USA) bei -80°C eingefroren.

2.4 Splinkerette-Methode

Die *Splinkerette*-Methode (Devon *et al.* 1995) erlaubt die Amplifikation von unbekanntem DNA-Sequenzen zwischen einer bekannten Sequenz (bzw. einem bekannten *Primer*) und einer nahe des Bruchpunktes gelegenen Erkennungssequenz einer bestimmten Restriktionsendonuklease. Dabei werden die entsprechend konzipierten *Splinkerettes* (s. Abb. 2.1) an Fragmente restringierter genomischer DNA ligiert und mittels PCR die zwischen dem *Splink-Primer* und dem bekannten *Primer* gelegenen Sequenzen amplifiziert. Diese können so einer weiteren Analyse mittels Sequenzierung (s. Kap. 2.2.9) zugänglich gemacht werden. Die Struktur der *Splinkerettes* unterbindet die Amplifikation von Artefakten bzw. falscher Ligate durch die eingebaute *hairpin*-Struktur. Der eingesetzte *Splink-Primer*, mit der selben Sequenz wie der *Splinkerette*-Strang, kann erst als *Primer* zur Amplifikation wirksam werden, wenn ausgehend vom bekannten Fragment-Ende (s. Abb. 2.1, grün dargestellt) bereits ein Strang amplifiziert wurde und dieser dann als Matrize dient.

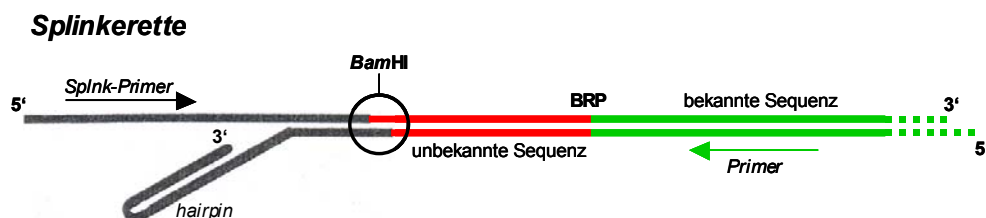


Abbildung 2.1: Splinkerette-PCR

Nach einem Restriktionsverdau genomischer DNA mit einer Restriktions-endonuklease (in diesem Fall *Bam*HI), von der man weiß, dass sie erst wieder im nach dem Bruchpunkt gelegenen unbekanntem Sequenzbereich schneidet, werden an alle entstandenen Fragmente sog. *Splinkerettes* ligiert. Diese haben ein dem verwendeten Enzym entsprechendes überhängendes Ende für die Ligation und eine *hairpin*-Region, die eine Amplifikation ausgehend vom *Splink-Primer* zunächst verhindert. Bei der im Anschluss durchgeführten PCR erfolgt die Amplifikation vom *Primer* der bekannten Sequenz aus über die Ligationsstelle hinaus in die *Splinkerette*. Dieser Strang dient dann dem *Splink-Primer* als Matrize für die weiteren Amplifikationsschritte. Das entstandene PCR-Produkt kann sequenziert werden und die unbekannte Sequenz nach dem BRP wird zugänglich. Die Etablierung einer weiteren PCR auf Basis der neugewonnenen Sequenzinformation unabhängig von den beiden Primern für die SPLNK-Fragmente kann das erzielte Ergebnis verifizieren und das Vorliegen von Artefakten kontrollieren.

Zunächst wurden 5 µg genomischer DNA aus Mausschwanzbiopsien (s. Kap. 2.11.2) mit der Endonuklease *Bam*HI restringiert (s. Kap. 2.3.1) und das Enzym danach hitzeinaktiviert (10 min, 65°C). Gleichzeitig wurden die benötigten *Splinkerettes* durch ein Annealing (erhitzen auf 90°C für 2 min und abkühlen bei RT für 20 min) der beiden Komponenten SPLNK-top und SPLNK-BamHI hergestellt, indem in einem Gesamtvolumen von 20 µl (Tris pH 7,4, 5 mM MgCl₂) SPLNK-top und SPLNK-BamHI (je 150 µg/ml) gemischt wurden.

Die Ligation erfolgte bei 15°C ÜN in einem Reaktionsansatz (Gesamtvolumen: 20 µl) mit 1 µl T4 DNA-Ligase, 6 µl *Splinkerette*-Mix (s. o.), 2 µl *Bam*HI-restringierter DNA und 2 µl 10x Ligasepuffer. Danach wurden 2 µl des Ligationsansatzes in eine Standard-PCR (s. Kap. 2.6.1; *Primer*: SPLNK-0/SEQ3'muta-FOR) eingesetzt. Für eine im Anschluss daran durchgeführte intern gelegene PCR (*nested*-PCR; *Primer*: SPLNK-1/SEQ3'muta-FOR) wurden 1 µl des ersten PCR-Ansatzes eingesetzt. Die Auftrennung der Fragmente erfolgte auf einem 1 % Agarose-Gel (s. Kap. 2.2.6), woraus das entstandene Produkt extrahiert (s. Kap. 2.2.7) und in einen T-Vektor kloniert wurde (s. Kap. 2.3.4).

2.5 RNA-Standardmethoden

2.5.1 Isolierung von RNA aus Geweben

Die zu analysierenden Mausgewebe wurden zügig präpariert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt. Für die RNA-Extraktion wurden die Gewebe in 1 ml Trizol (je 50 bis 100 mg Gewebe) in 15 ml Schnappdeckelröhrchen überführt und ~ 30 sec mit einem Ultra-Turrax T25 (Fa. Janke und Kunkel, Stauffen) homogenisiert. Nach 10-minütiger Zentrifugation (12000 rcf, 4°C) wurden die Überstände in ein neues 2 ml Eppendorfgefäß überführt, mit 200 µl Chloroform versetzt, 15 sec mit der Hand geschüttelt und 10 min bei RT inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (15 min, 12000 rcf, 4°C) erfolgte die Fällung der RNA (Oberphase erneut in ein frisches 2 ml Gefäß überführen) durch Mischen (15 sec) der oberen, wässrigen Phase mit 500 µl Isopropanol. Nach wiederholter Inkubation (10 min) bei RT wurde die RNA durch Zentrifugation (12000 rcf, 10 min, 4°C) präzipitiert. Die gefällte RNA wurde mit 1 ml 70 % Ethanol gewaschen, bei 37°C getrocknet und in entsprechenden Mengen (70 bis 140 µl) Rnase-freiem H₂O 10 min bei 60°C durch Schütteln gelöst bevor sie bis zum weiteren Gebrauch bei -80°C gelagert wurde.

2.5.2 Isolierung von RNA aus Zellkulturen

Für die Isolierung von RNA aus eukaryotischen Zellen (u. a. aus Mausembryo-Fibroblasten-Kulturen) wurde in der Regel eine 10 cm-Kulturschale pro Ansatz verwendet. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen trypsinisiert, in 5 ml Zellkulturmedium aufgenommen und durch Zentrifugation (350 rcf, RT, 10 min) pelletiert. Der Überstand wurde vollständig abgenommen und die Zellen in 600 µl RLT-Puffer nach den Vorgaben des QIAGEN *RNeasy Mini Kit* (Fa. Qiagen, Hilden) aufgenommen. Die weitere Aufreinigung der RNA erfolgte genau nach den Angaben des Herstellers. Nach der Aufreinigung wurde die RNA mit RNase-freiem Wasser eluiert und bis zu ihrer Verwendung bei -80°C gelagert. Die Konzentrationsbestimmung der isolierten RNA erfolgte photometrisch (vgl. Kap. 2.2.3).

2.5.3 Entfernung genomischer DNA aus RNA-Präparationen

Zur Entfernung genomischer DNA wurde die isolierte RNA einem DNaseI-Verdau unterzogen (Sambrook *et al.* 1989). Zu diesem Zweck wurde die RNA (max. 150 µg Gesamt-RNA) in einem Gesamtvolumen von 100 µl (1x TE, 10 mM MgCl_2 , 0,1 M DTT, 40 U Rnase-Inhibitor) mit 100 bis 150 U Rnase-freier DNaseI (Fa. Boehringer, Mannheim) für 2 h bei 37°C inkubiert. Die anschließende Aufreinigung erfolgte nach dem *RNeasy protocol for RNA clean-up* genau nach Angaben des Herstellers (Fa. Qiagen, Hilden). Die RNA wurde mit einer geeigneten Menge RNase-freiem Wasser eluiert und die RNA-Konzentration photometrisch bestimmt (vgl. Kap. 2.2.3). Im Anschluß wurde die RNA-Integrität mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft (vgl. Kap. 2.2.6).

2.5.4 Transfer von RNA auf Filtermembranen (*Northern Blot*)

Für die Analyse der Genexpression auf RNA-Ebene erfolgte der Transfer der präparierten RNA mittels *Northern Blot* (Alwine *et al.* 1977, Thomas 1980) auf eine Nylonmembran. Hierfür wurden 10 bis 20 µg Gesamt-RNA (isoliert aus Zellkultur oder Gewebe; vgl. Kap. 2.5.1 und 2.5.2) vakuumgetrocknet und in 10 µl 3x RNA-Ladepuffer gelöst. Nach Zugabe von 20 µl 1,5x RNA-Probenpuffer und einer 10-minütigen Inkubation bei 65°C wurden die Proben auf Eis abgekühlt und 1 µl einer 1:5-verdünnten Ethidiumbromid-Stammlösung (10 mg/ml) zugesetzt. Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte über ein 1 % Agarose-Gel mit 6,5 % Formaldehyd (angestetzt mit 1x MOPS, Laufpuffer: 1x MOPS) bei 80 bis 100 V für 4 bis 6 h. Als Molekulargewichtsstandard wurde die *RNA-ladder* der Fa. Invitrogen (Karlsruhe) verwendet. Nach erfolgter Auftrennung wurde das Gel in RNA-Hydrolyselösung inkubiert (40 min) und anschließend in RNA-Neutralisierungslösung überführt (2x 20 min). Der Transfer der RNA auf eine Hybond N+ Filtermembran (Fa. Amersham, Braunschweig) erfolgte für 24 bis 72 h mit

10x SSC als Transferpuffer nach der von Mason *et al.* 1993 beschriebenen Methode. Die Fixierung der RNA an die Membran erfolgte durch zweimalige Bestrahlung (1200 kJ) im UV Stratalinker 1800 (Fa. Stratagene, Amsterdam).

2.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)-Techniken

2.6.1 Standard-PCR

Die enzymatische Amplifikation von DNA-Fragmenten wurde nach der Methode von Saiki *et al.* (1988) für die ‚*polymerase chain reaction*‘ (PCR) durchgeführt. Hierbei lagern sich nach der Denaturierung der DNA-Doppelstränge (Schritt 1) zwei synthetisch hergestellte Oligonukleotide (*Primer*) in einer *Annealing*-Phase (Schritt 2) an die Matrizen-DNA an. An diese *Primer* werden durch das hitzestabile Enzym *Taq*-Polymerase des Bakteriums *Thermophilus aquaticus* die zur Matrizen-DNA komplementären Nukleotide angeheftet und so in einer Elongationsphase (Schritt 3) ein neuer Strang synthetisiert. Die angegebenen Schritte werden mehrmals wiederholt (Zyklen), wodurch die neusynthetisierten DNA-Fragmente als Vorlage im nächsten Zyklus dienen und es so zu einer exponentiellen Vervielfältigung der ursprünglich eingesetzten Matrizen-DNA (*template*) kommt.

Das Standardprogramm sowie der Standardreaktionsansatz, die in der Regel für die PCRs in dieser Arbeit verwendet wurden, sahen wie folgt aus (s. u.). Dabei variierten Zyklenzahl und Annealingtemperatur je nach verwendeten Oligonukleotiden und Matrizen-DNA. Im Anschluss an die PCR wurden 5 bis 10 µl der amplifizierten DNA auf 0,8 bis 2 % Agarose-Gelen überprüft und dokumentiert:

PCR-Programm:

- 1) 3 min 94°C
- 2) 1 min 94°C
- 3) 1 min 58-65°C
- 4) 1 min 72°C
- 5) Wiederholung 2) bis 4) für 18-35 Zyklen
- 6) 7 min 72°C
- 7) *store* 15°C

PCR-Reaktionsansatz:

5 µl 10x PCR-Puffer
 5 µl dNTPs (je 1,25 mM)
 1 µl *Taq*-Polymerase (1 Unit/µl)
 2 µl 5'-*Primer* (20 pmol/µl)
 2 µl 3'-*Primer* (20 pmol/µl)
 1-2 µl DNA (10-500 ng)
 ad. 50 µl H₂O bidest

2.6.2 Expand-PCR

Für die Amplifikation großer DNA-Produkte (bis 5 kb aus genomischer DNA) eignet sich das *Expand High Fidelity PCR System* der Fa. Roche, Mannheim. Die Durchführung erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers mit der Ausnahme, dass alle Reagenzien in einem Reaktionsansatz zusammengefügt wurden. Die PCR-Produkte wurden vor der

Weiterverarbeitung auf 0,8 % Agarose-Gelen überprüft und dokumentiert. Expand-PCR-Programm und -Reaktionsansatz sind im Folgenden dargestellt:

Expand-Programm:

- 1) 2 min 94°C
- 2) 15 sec 94°C
- 3) 30 sec 60°C
- 4) 2 min 68°C
- 5) Wiederholung 2) bis 4) für 10 Zyklen
- 6) 15 sec 94°C
- 7) 30 sec 60°C
- 8) 2 min 68°C
- 9) Wiederholung 6) bis 8) für 20 Zyklen (mit 5 sec Verlängerung je Zyklus)
- 10) 7 min 72°C
- 11) store 15°C

Expand-Reaktionsansatz:

- 5 µl *Expand*-Puffer + MgCl₂
- 8 µl dNTPs (je 1,25 mM)
- 0,75 µl Taq-Polymerase (1 Unit/µl)
- 1 µl 5'-*Primer* (0,4 pmol/µl)
- 1 µl 3'-*Primer* (0,4 pmol/µl)
- 2 µl DNA (~ 500 ng)
- ad. 50 µl H₂O bidest

2.6.3 *In vitro*-Mutagenese

Für die gezielte Mutagenese von DNA-Fragmenten in Plasmiden wurde das Mutagenese-Kit der Fa. Stratagene (Heidelberg) verwendet. Die Reaktion wurde gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Hierfür wurden in einem Gesamtvolumen von 50 µl mit etwa 150 ng des zu mutagenisierenden Plasmids eine PCR-Reaktion angesetzt, bei der durch die Verwendung von 33mer Oligonukleotiden (*Mutagenese-Primer*, entsprechend synthetisiert) die gewünschte Mutation *in vitro* eingeführt wurde. Durch einen direkt im Anschluss (im PCR-Reaktionsansatz) durchgeführten *DpnI*-Restriktionsverdau wurde das ursprüngliche Matrizen-Plasmid restringiert, während das durch die PCR entstandene mutagenisierte Plasmid erhalten blieb. Es wurden 2 µl des Mutagenese-PCR-Restriktionsansatzes für eine Hitzeschock-Transformation (s. Kap. 2.3.8) mit kommerziellen XL-1 Blue *Supercompetent Cells* der Fa. Stratagene (Heidelberg) eingesetzt. Es wurde die komplette Bakteriensuspension auf LB_{Amp}-Agarplatten ausgestrichen (inkubiert ÜN, 37°C) und potenziell positive Klone (ÜN-Kultur, 37°C, 225 rpm) nach Durchführung einer Plasmid-Mini-Präparation mittels Restriktionsverdau (s. Kap. 2.3.1) und Sequenzierung (s. Kap. 2.2.9) verifiziert. Mutagenese-Programm und Reaktionsansatz sind im folgenden aufgelistet:

PCR-Programm:

- 1) 30 sec 95°C
- 2) 30 sec 95°C
- 3) 1 min 55°C
- 4) 14 min 68°C (Elongation richtet sich nach Plasmidgröße)
- 5) Wiederholung 2) bis 4) für 18 Zyklen
- 6) store 4°C

PCR-Reaktionsansatz:

- 5 µl 10x Reaktionspuffer
- 1 µl dNTP-Mix (je 1,25 mM)
- 1 µl Pfu-Polymerase (1 Unit/µl)
- 1,25 µl *muta-Primer* (10 pmol/µl)
- 1,25 µl *muta-Primer* (10 pmol/µl)
- 1,5 µl DMSO
- 1-2 µl DNA (~ 150 ng)
- ad. 50 µl H₂O bidest

2.6.4 Reverse Transkriptions (RT)

Nach Isolation, DNase-Verdau und Aufreinigung (s. Kap. 2.5.1 bis 2.5.3) von Gesamt-RNA aus Zellen oder Geweben wurde die Konzentration photometrisch bestimmt und je Ansatz zur reversen Transkription nach Möglichkeit 4 µg RNA zu einem Gesamtvolumen von 15,9 µl mit RNase-freiem H₂O aufgefüllt. Nach 10-minütiger Denaturierung der RNA bei 70°C wurden die Proben 1 min auf Eis gestellt bevor 22,5 µl cDNA-Synthesemix zugegeben und die Erststrangsynthese für 90 min bei 37°C durchgeführt wurde. Die Inaktivierung der M-MLV Reversen Transkriptase erfolgte durch eine abschließende Inkubation des Reaktionsansatzes für 10 min bei 95°C.

cDNA-Synthesemix:

- 8,0 µl 5x *first strand buffer* (Fa. Invitrogen, Karlsruhe)
- 5,0 µl Oligo (dT)₁₆ (50 µM)
- 3,6 µl dNTPs (10 mM je dNTP)
- 2,0 µl RNase Inhibitor (20 U/µl; Fa. MBI Fermentas, Leon-Roth)
- 4,0 µl DTT (0,1 M; Fa. Invitrogen, Karlsruhe)
- 1,5 µl M-MLV Reverse Transkriptase (200 U/µl; Fa. Invitrogen, Karlsruhe)

Zur Herstellung von Negativkontrollen wurde generell pro revers transkribierter RNA ein Ansatz ohne Enzym (Volumen durch RNase-freies Wasser ersetzt) erstellt und bei gleichen Bedingungen inkubiert.

2.6.5 Quantitative *real time*-PCR

Die Bestimmung des genetischen Status (Hemi- bzw. Homozygotie) des integrierten Transgens in den generierten *Responder*-Mauslinien wurde am *Light Cycler* (Fa. Roche, Mannheim) mit Hilfe des *Light Cycler Fast Start DNA Master SYBR Green I Kits* (Fa. Roche, Mannheim) durchgeführt. Die präparierte DNA aus Schwanzbiopsien (s. Kap. 2.11.2) wurde nach der photometrischen Quantifizierung (s. Kap. 2.2.3) zunächst auf eine Konzentration von 50 ng/µl eingestellt und dann 1:50 in H₂O bidest für den Einsatz im *Light Cycler* verdünnt. Für die Erstellung einer linearen Regression der *crossing points* wurde eine Kontroll-DNA (heterozygotes Tier) zusätzlich 1:20 und 1:100 verdünnt eingesetzt. Die PCR-Reaktion wurde in einem Gesamtvolumen von 10 µl, bestehend aus 1 µl verdünnter DNA (1 ng/µl), 1x *SYBR Green PCR Master Mix*, 0,2 µl der jeweiligen Oligonukleotide (20 µM) und 3 mM MgCl₂ in *Light Cycler* Kapillaren (Fa. Roche, Mannheim) durchgeführt. Die Konditionen für die verschiedenen bei der quantitativen PCR eingesetzten Oligonukleotiden waren wie folgt:

Transgen: (Primer: mWt1-LC-F2/R2)

- 10 min 95°C
- 2 sec 95°C/ 5 sec 61°C/ 12 sec 72°C
- (40 Zyklen)

Wildtyp-Lokus: (Primer: mWt1-k.o. contr F1/R)

- 10 min 95°C
- 2 sec 95°C/ 5 sec 65°C/ 10 sec 72°C
- (40 Zyklen)

Die relative Quantifizierung der Transgen-DNA zur Bestimmung des genetischen Status wurde mit Hilfe der *Roche Molecular Biochemicals Light Cycler Software* (V. 3.5) durchgeführt. Dabei wurde die unbekannte Kopienzahl des Transgens der Proben-tiere in Relation zur Kopienzahl einer heterozygoten Maus (Referenz) berechnet. Der Abgleich wurde mit einer Amplifikation des *Wt1*-Wildtyp-Lokus vorgenommen.

2.7 Hybridisierungstechniken auf Filtermembranen

2.7.1 Radioaktive Markierung von Sonden

Alle in dieser Arbeit für die Hybridisierungen der Filtermembranen verwendeten Sonden wurden mittels PCR generiert, durch Agarose-Gelelektrophorese aufgereinigt und anschließend extrahiert (vgl. Kap. 2.2.6 und 2.2.7). Die radioaktive Markierung der Sonden erfolgte mit dem *Prime it II-Kit* (Fa. Stratagene, Amsterdam) gemäß den Angaben des Herstellers. Dazu wurden 50 ng des 100 bis 500 bp DNA-Fragmentes und 10 µl *Random 9mer Primer (Prime it II-Kit)* zu einem Volumen von 34 µl mit H₂O aufgefüllt und 5 min hitzedenaturiert. Nach kurzer Inkubation auf Eis erfolgte die Zugabe von 10 µl dCTP-Puffer (*Prime it II-Kit*), 5 µl bzw. 50 µCi [α -³²P] dCTP und 1 µl Enzym Klenow Exo- (*Prime it II-Kit*). Nach 30-minütiger Inkubation des Ansatzes bei 37°C wurde die Reaktion mit 2 µl Stop-Mix (*Prime it II-Kit*) beendet und der Ansatz für 2 min auf Eis inkubiert. Das Entfernen nicht eingebauter Nukleotide erfolgte mit *Microspin G50 Columns* (Fa. Amersham, Freiburg) nach Angaben des Herstellers. Nach Abschluss der Markierung wurden 2 µl des Eluats in 10 ml Szintillationsflüssigkeit (Fa. Roth, Karlsruhe) im Szintillationszähler (Fa. Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim) gemessen. Die Sonden wurden für den Gebrauch 5 min durch Aufkochen denaturiert, kurz auf Eis inkubiert und die entsprechenden Mengen für die Hybridisierung eingesetzt.

2.7.2 DNA/DNA-Hybridisierung (*Southern-Hybridisierung*)

Für die Hybridisierung der Filter mit radioaktiv markierten DNA-Sonden (s. Kap. 2.7.1) wurde die Membran zunächst für mindestens 4 h in *ExpressHyb*-Lösung (1 ml/cm²; Fa. Clontech, Heidelberg) bei 60°C prähybridisiert. Die Hybridisierung erfolgte ÜN bei 60°C in frischer *ExpressHyb*-Lösung (1 ml/cm²) mit 1 bis 2x 10⁶ cpm/ml radioaktiv markierter Sonde, die zuvor 5 min hitzedenaturiert wurde. Nach Beendigung der Hybridisierung wurden die Filter 45 min mit *WASH1* (2x SSC, 0,05 % SDS) bei RT mit mehrmaligem Wechseln der Waschlösung und 2x 10 min bei 50°C mit *WASH2* (0,1x SSC, 0,1 % SDS) gewaschen.

Zur Signaldetektion wurde die noch feuchte Membran in Haushaltsfolie gewickelt und in einer mit Verstärkerfolie ausgekleideten Kassette (Quantall, Cronex-Kassette, Fa. DuPont, USA) für 4 h bis zu 8 Tage bei -80°C autoradiografiert (X-Omat AR, Fa. Kodak, USA oder RPN 9, Fa. Amersham, Braunschweig). Sollte eine erneute Hybridisierung durchgeführt werden, wurde die Membran nach Anfertigung einer Autoradiografie für 15 bis 30 min in 90 bis 100°C heißer 0,5 % SDS-Lösung (w/v) von der Sonde gereinigt. Die Aufbewahrung der Filter erfolgte in Haushaltsfolie verpackt bei -20°C .

2.7.3 **Dot Blot-Hybridisierung**

Für die Detektion des Transgens in Maus-DNA auf *Dot Blots* wurden die Filter mindestens 4 h bei 65°C in *Church*-Hybridisierungslösung ($0,1\text{ ml/cm}^2$ Membran) prähybridisiert und im Anschluss ÜN bei 65°C mit der entsprechenden radioaktiv markierten DNA-Sonde (s. Kap. 2.7.1) in *Church*-Hybridisierungslösung ($0,1\text{ ml/cm}^2$ Membran) hybridisiert. Am folgenden Tag erfolgte das Waschen der Filter durch zweimaliges kurzes Spülen mit *Church*-Wash1- und viermaliges Waschen mit *Church*-Wash2-Puffer. Die Signaldetektion durch Autoradiographie sowie die Reinigung der Filter von der hybridisierten Sonde erfolgte wie in Kapitel 2.7.2 beschrieben. Bis zum weiteren Gebrauch wurden die Filter in Haushaltesfolie gewickelt bei -20°C aufbewahrt.

2.7.4 **DNA/RNA-Hybridisierung (Northern-Hybridisierung)**

Die Prähybridisierung von RNA-Filtern erfolgte in 10 ml *ExpressHyb*-Lösung (Fa. Clontech, Heidelberg) für 1 bis 4 h bei 65°C . Zur Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten DNA-Sonde (s. Kap. 2.7.1) wurde diese hitzedenaturiert und 2 min auf Eis abgekühlt. Im Anschluss daran wurde die Sonde mit 5 bis 10 ml frischem, vorgewärmtem *ExpressHyb* (Fa. Clontech, Heidelberg) gemischt (Endkonzentration der Sonde: 1 bis 2×10^6 cpm/ml) und zusammen mit dem RNA-Filter für 2 bis 3 h unter ständiger Rotation bei 65°C inkubiert ($1\text{ ml ExpressHyb-Lösung/cm}^2$ Filtermembran). Das Waschen der Filter erfolgte genau nach den Angaben des Herstellers für *ExpressHyb*-Lösung (Fa. Clontech, Heidelberg). Weitere Behandlungen wurden bereits in Kapitel 2.7.2 beschrieben.

2.8 **Arbeiten mit Proteinen**

2.8.1 **Luziferase-Assay**

Zum Nachweis der regulierbaren Aktivität von Luziferase wurden Versuchstiere des Genotyps *Wt1-tTA/tetO_bLuziferase/Cre-Rekombinase* getötet und die Organe operativ entnommen, kurz in kühlem 1x PBS ($-\text{CaCl}_2$, $-\text{MgCl}_2$) gespült und in 1 ml LUC Lyse-

Puffer im Schnappdeckel PP-Röhrchen ~ 1 min homogenisiert. Danach wurden die Proben zur Unterstützung der Zell-Lyse in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Nach dem Auftauen wurden die Zellfragmente bei 4°C für 5 min mit maximaler Geschwindigkeit abzentrifugiert und der proteinhaltige Überstand in ein 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Die Protein-Lysate wurden bis zur Weiter-verarbeitung bei -20°C gelagert.

Die Messung der Luziferase-Aktivität erfolgte mit 20 µl des Protein-Lysates nach Zugabe von 360 µl LUC Assay-Puffer und LUC Stock-Puffer (mit 0,2 mM Luziferin) für 10 sec bei einer Wellenlänge von 560 nm im Luminometer.

Die Quantifizierung der Proteingesamtmenge zum Abgleich der gemessenen Luziferase-Aktivität wurde mit dem Biorad Protein Assay (Fa. Biorad, München) gemäß der Angaben des Herstellers durchgeführt. Dazu wurde 5 µl Proteinextrakt mit 795 µl H₂O und 200 µl Biorad Protein Assay-Reagenz durch Vortexen gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Der durch die Reaktion des Biorad Protein Assay-Reagenz mit dem Protein entstandene Farbumschlag wurde bei 595 nm im Photometer gemessen. Als Referenz diente eine H₂O-Kontrolle ohne Proteinextrakt. Die jeweiligen Proteinkonzentrationen wurden mit Hilfe einer zuvor erstellten BSA-Eichkurve, bei der definierte Mengen BSA mit dem Biorad Protein Assay-Reagenz gemessen worden waren, bestimmt.

2.9 Zellbiologische Arbeiten

2.9.1 Verwendete Zellen

Alle in dieser Arbeit dokumentierten Versuche wurden mit Mausembryo-Fibroblasten (MEF) durchgeführt. Die Präparation der MEF erfolgte wie unter Kapitel 2.11.4 beschrieben.

2.9.2 Kultivierung von Zellen

Die Kultivierung der verwendeten Säugerzellen erfolgte in T-Flaschen bzw. in 10 cm Kulturschalen bei 37°C und 5 % CO₂ in wassergesättigter Atmosphäre im Zellkulturinkubator (Fa. Heraeus, Hanau). Als Nährmedium diente DMEM-Medium (Fa. Cambrex, Verviers; Belgien), das mit 10 % Tetrazyklin-freiem fetalem Kälberserum (FCS), 2 mM L-Glutamin, Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 µg/ml) (alles Fa. PAN, Aidenbach) ergänzt wurde. Zur Passagierung wurden die Zellen nach Erreichen von etwa 80 % Konfluenz mit PBS gewaschen, mit Trypsin/EDTA (Fa. PAN, Aidenbach) von den Zellkulturflaschenböden abgelöst und im Verhältnis 1:3 bis 1:10 verdünnt und erneut in frischem DMEM ausplattiert.

2.9.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Sollten Zellen über längere Zeit gelagert werden, wurden sie zunächst mit PBS gespült, trypsinisiert und nach dem Ablösen für 10 min bei 350 rcf (RT) abzentrifugiert und in 1 ml DMEM-Vollmedium (10 % FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 2 mM L-Glutamin) mit 10 % DMSO aufgenommen. Die Zellsuspension wurde anschließend in Kryoröhrchen (Fa. Nalgene, USA) überführt, danach zunächst für 2 Tage bei -70°C und anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren und dort aufbewahrt.

Zum Auftauen wurden die Zellen in den Kryoröhrchen 10 min bei 37°C inkubiert und im Anschluss in der fünffachen Menge DMEM-Vollmedium aufgenommen. Nach einem Zentrifugationsschritt (10 min, 350 rcf, RT), zum Entfernen von DMSO-Resten, wurden die Zellen in 10 ml DMEM-Vollmedium resuspendiert und in den entsprechenden Zellkulturgefäßen ausplattiert.

2.9.4 Transiente Transfektion

Die transiente Transfektion von MEF wurde mit dem *Fugene 6 Transfection Reagent* (Fa. Roche, Mannheim) in ~ 80 % bewachsenen 10 cm Zellkulturschalen durchgeführt. Die MEF wurden mit 10 bis 20 µg Plasmid-DNA (pUHD 172-1 rtTA) transfiziert. Die DNA wurde dabei vorgelegt und 15 min in einem Gemisch aus 18 µl Fugene und 82 µl DMEM-Medium (ohne Zusätze) bei RT inkubiert. Die Komplexe aus Plasmid und Transfektionsreagenz wurden dann tropfenweise auf die Zellen (in 10 ml DMEM-Vollmedium) pipettiert. Nach 4 h wurde ohne Wechsel des Mediums die zweitägige Inkubation mit Doxzyklin (1 µg/ml) gestartet. Die Analyse der Induzierbarkeit erfolgte einerseits auf RNA-Ebene mittels RT-PCR (s. Kap. 2.6.4) und andererseits unter dem Fluoreszenzmikroskop (Leica DM RBA Fluoreszenz-Mikroskop) zum Nachweis der Expression von *enhanced green fluorescent protein* (EGFP).

2.10 Zytogenetische Methoden

2.10.1 Präparation von Metaphase-Chromosomen aus der murinen Milz

Nach der Tötung der Tiere durch zervikale Dislokation wurde die Milz operativ entnommen und in RPMI 1640-Medium (ohne FCS) gespült. Es erfolgte die mechanische Zerkleinerung zunächst in einer 10 cm Petrischale mit dem Skalpell, dann das Milzgewebe zur gründlicheren Vereinzelnung der Zellen durch einen *cell strainer* (40 µm² Porengröße) gerieben. Die durch die Membran passagierten Lymphozyten wurden abgespült und in eine T75-Kulturflasche mit 20 ml RPMI 1640-Medium mit 10 % Tetrazyklin-freiem fetalem Kälberserum (FCS), 2 mM L-Glutamin, Penicillin (100 U/ml),

Streptomycin (100 µg/ml), 30 µl Concavalin A (5 µg/µl), 25 µl Lipopolysaccharid (LPS) und 0,5 % β-Mercaptoethanol überführt. Die Inkubation erfolgte für 48 h im Zellkulturschrank bei 37°C und 5 % CO₂. Nach ~ 24 h wurden 20 µl Methotrexate (2,5 mg/ml) zur Hemmung der Thymidinkinaseaktivität in den Zellen zugegeben und die Inkubation für die restlichen Zeit fortgesetzt. Danach wurde dem Medium 250 µl Colcemid (10 µg/ml) als Inhibitor der Mikrotubuli-Synthese zur Anreicherung von Metaphasen zugesetzt und die Kultur für weitere 30 min inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und bei 350 rcf für 10 min pelletiert, der Überstand abgenommen (etwa 500 µl Rest lassen) und das Zellpellet darin vorsichtig resuspendiert. Nach Zugabe von 10 ml vorgewärmter hypotoner Lösung und einer 20 minütigen Inkubation bei 37°C wurde unter vorsichtigem Schütteln 10 ml eiskaltes Fixativ (Methanol/Eisessig 3:1) tropfenweise zugegeben, die Zellen bei 350 rcf für 10 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden zur weiteren Aufreinigung weitere zweimal mit 10 ml Fixativ fixiert und sedimentiert. Das Pellet wurde schließlich in wenigen Millilitern kaltem Fixativ aufgenommen und die Zellsuspension bis zum Anfertigen der Tropfpräparate bei -20°C aufbewahrt.

2.10.2 Chromosomen-Spreitung

Die hypoton behandelten, fixierten Zellen wurden zur Anfertigung der Metaphasen-Spreiten mit einer Pasteurpipette aus einer Höhe von 20 bis 30 cm auf durch Methanol-Reinigung entfettete, gut gewaschene Objektträger getropft. Durch den Aufprall zerplatzen die Zellmembranen und die Chromosomen der in Metaphase arretierten Zellen werden freigesetzt und spreiten sich auf. Im Phasenkontrastmikroskop wurde nach Fertigstellung des ersten Präparates überprüft, ob die Kern-/Metaphase-Dichte und Auftropfhöhe stimmen, bevor weitere Objektträger hergestellt wurden. Die Metaphase-Chromosomen sollten sich nach Möglichkeit nicht überlagern. Bei Eignung der Präparate für die Hybridisierung wurde die Position der Chromosomenspreitung auf der Rückseite der Objektträger mit einem Diamantschreiber markiert. Die Präparate konnten dann bei 4°C in 70% Ethanol für mehrere Monate aufbewahrt werden.

2.10.3 Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierung (FISH)

2.10.3.1 DNA Fluoreszenz-Markierung (Nick-Translation)

Zur nicht radioaktiven Markierung von DNA wurde das Nick-Translations Kit der Firma Vysis verwendet. Bei der Nick-Translation (Macgregor und Mizuno 1976) wird doppelsträngige DNA unter Zuhilfenahme der Dnase I sowie der *E. coli*-Polymerase I markiert: Die Dnase I fügt statistisch verteilt Einzelstrangbrüche, sog. 'nicks' in den DNA-Doppelstrang ein. Es entstehen also offene Phosphodiesterbrücken, die Ansatzpunkt für

die 5'/3'-Exonukleaseaktivität der Pol I darstellen. Vom 5'-Ende her werden nun sukzessive Nukleotide abgebaut, es entsteht versetzt einzelsträngige DNA. Diese Stränge dienen der Polymerasefunktion der Pol I als Substrat und die Lücke wird vom 3'-OH-Ende her geschlossen. Geschieht dies unter Anwesenheit markierter Nukleotide (z.B. Fluorochrom-gekoppelt), so wird die DNA gleichmäßig markiert. Es wurden direkt markierte Nukleotide (Fa. Amersham, Freiburg) mit folgenden Fluorophoren für die Markierung der Sonden eingesetzt:

Cy3 (Anregung: 550 nm/Emission 570 nm)

Cy3,5 (581 nm/596 nm)

Spektrum grün (494 nm/520 nm)

Markierungsansatz:

X µl DNA (1-3 µg)

mit H₂O bidest auf 19,6 µl auffüllen

+ 5 µl 10x Nick-Translationspuffer (Vysis)

+ 10 µl dNTP-Mix (je 0,1 mM dATP, dGTP und dCTP (bzw. dTTP)

+ 3,3 µl 0,1 mM dTTP (bzw. dCTP)

+ 2,1 µl 1 mM markiertes dUTP (bzw. dCTP)

+ 10 µl Enzymmischung (DNase I/DNA Pol I) (Vysis)

1-2h bei 16°C bei Dunkelheit inkubieren

Hitzeinaktivierung bei 68°C für 10 min

Abkühlung der markierten Sonde auf Eis

2.10.3.2 Hybridisierung

Die bei 4°C in 70 % Ethanol gelagerten Chromosomen-Präparate wurden luftgetrocknet und danach für exakt 2 min bei 72°C im Denaturierungsbad (70 % Formamid/2x SSC, pH 7.0) inkubiert (Messung der Temperatur innerhalb der Denaturierungs-Küvette). Es wurden nie mehr als drei Objektträger gleichzeitig denaturiert, um ein Absinken der Temperatur der Chromosomen-Denaturierungs-Lösung zu vermeiden. Nach Verstreichen der Zeit schloss sich die Entwässerung der Präparate in einer aufsteigenden, eiskalten Ethanolreihe (70 %, 90 %, 100 %, jeweils 5 min) an. Die Trocknung der Präparate erfolgte im Anschluss bei RT.

Die Fluoreszenz-markierten DNA-Sonden (vgl. Kap. 2.10.3.1) wurden nach gemeinsamer Fällung mit einem 50-fachen Überschuß unmarkierter, muriner c₀t1-DNA und Trocknung in deionisiertem Formamid gelöst und bei 37°C 30 min geschüttelt. Nach Lösung des Pellets wurde das gleiche Volumen 4x SSC/20% Dextransulfat (Hybridisierungslösung) zupipettiert und erneut für 30 min bei gleicher Temperatur geschüttelt. Nach vollständiger Lösung erfolgte die Sondendenaturierung.

Hierzu wurde die markierte Sonde für 5 min auf 76°C aufgeheizt und anschließend prähybridisiert (30 min, 37°C). Nach Verstreichen der Prähybridisierungszeit der DNA-Sonden wurden diese auf zuvor denaturierte und auf 37°C vortemperierte Chromosomenpräparate pipettiert. Auf jeden OT wurden in Abhängigkeit der

Deckglasfläche 8,5 bis 15 µl Sonden-DNA aufgetragen. Nach Abdecken der Präparate mit Deckgläsern werden diese mit Fixogum abgedichtet und in einer feuchten Kammer bei 37°C für 24 bis 48 h im Brutschrank gelagert.

2.10.3.3 Waschschritte

Zum Abbruch der Hybridisierung wurden die Objektträger dem Brutschrank entnommen und die Deckgläschen entfernt. Durch die folgenden Waschschritte wurden unspezifisch hybridisierte Sequenzen von der chromosomalen DNA beseitigt. Hybridisierungen homologer Sequenzen werden dagegen in weit geringerem Umfang gelöst. Zunächst erfolgte das Waschen der Objektträger für 2 min bei 74°C in 0,4x SSC/0,3 % NP-40. Direkt im Anschluß wurden die Objektträger für 45 sec bei Raumtemperatur in 2x SSC/0,1 % NP-40 überführt. Bei allen Schritten war darauf zu achten, dass die Objekte nicht trockenfallen, da ein Eintrocknen der Chromosomen in einer starken Granulierung des Fluoreszenzsignals resultiert. Die vollständig prozessierten und abgetrockneten Präparate wurden schließlich mit DAPI/Antifade (Q-Biogene) zur Gegenfärbung des Chromatins überschichtet und mit Deckgläschen eingedeckt.

2.10.3.4 Auswertung der Hybridisierung mit digitaler Bildverarbeitung

Die Bilderfassung erfolgte mit einer hochauflösenden, gekühlten CCD (*'charge coupled device'*)-Kamera Sensys (PHOTOMETRICS, Tucson, Arizona). Kamera und Leica DMRXA-Mikroskop wurden gesteuert von der Leica Q-FISH Software Version Y2.3.1.beta (Leica, Cambridge, England), die in einer Windows-Umgebung auf einem Standard PC installiert ist. Das Leica DMRXA RF8-Mikroskop ist mit einem automatischen Filterrad ausgestattet, sodass für jedes eingesetzte Fluorochrom ein separater Anregungs- und Emissionsfilter sowie Strahlteiler zur Verfügung steht. Die Bilderfassung erfolgte demzufolge sequenziell für jedes einzelne Fluorochrom. Die Bildanalyse war in die Leica Q-FISH Software eingebunden. Erst durch eine im Rechner abgelegte Farbkode-Tabelle wurde eine Zuordnung der Farbwerte zu den in Graustufen abgelegten Einzelfluoreszenzen möglich.

2.11 Arbeiten mit Mäusen

2.11.1 Durchführung

Alle Arbeiten mit Mäusen wurden nach Maßgabe des Tierschutzgesetzes durchgeführt. Die Haltung der Tiere erfolgte in der ZVTE (Zentrale Versuchstier-

einrichtung der Universität Mainz) nach den vorgegebenen Standards. Im Rahmen dieser Arbeit waren Tierversuche nach BGB I., S. 1319-1330, erforderlich. Diese Versuche wurden unter dem Aktenzeichen 1.5 17707/011-24 (beim Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz, Genehmigungsdirektion Süd) in den dafür eingerichteten Räumen durchgeführt.

Alle direkten Arbeiten zur Herstellung der transgenen Tiere wie ES-Zell-Kultivierung und Selektion, Elektroporation, Blastozysten-Injektion und Oozyten-Injektion wurden von Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. E. Bockamp (Institut für Toxikologie, Universität Mainz) durchgeführt.

2.11.2 Isolierung genomischer DNA aus Mausschwanz-Biopsien

Zur Gewinnung von genomischer DNA, u. a. für die Genotypisierung der Mäuse, wurde den mindestens drei Wochen alten Tieren etwa 0,3 bis 0,5 cm der Schwanzspitze mit einer Schere biopsiert und das Gewebe in 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäße überführt. Die Biopsien wurden bis zur DNA-Extraktion bei -20°C aufbewahrt oder gleich in 750 μl *Tail*-Lysepuffer mit Proteinase K (100 bis 600 $\mu\text{g}/\text{ml}$) aufgenommen und ÜN bei 54°C verdaut. Am folgenden Tag wurde jedem Ansatz 250 ml 4M NaCl zugegeben, dann kurz gevortext und im Anschluss 10 bis 30 min bei RT und maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. 750 μl des Überstandes wurden in ein neues 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäße überführt und die DNA nach Zugabe des gleichen Volumens frischem Isopropanol (750 μl) durch Zentrifugation (~ 10 min) bei RT und maximaler Geschwindigkeit gefällt. Die DNA-Pellets wurden nach zweimaligem Waschen mit 70 % Ethanol getrocknet und in 400 μl 1/10x TE durch Inkubation für ~ 1 h im Thermomixer bei 50°C gelöst. Die präparierte DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei 4°C oder -20°C aufbewahrt. Für eine Standard-PCR zur Genotypisierung der Mäuse wurde 1 μl der DNA-Lösung eingesetzt. DNA-Proben für die Analyse durch quantitative *real time*-PCR im *Light Cycler* wurden stets bei 4°C gelagert.

2.11.3 Altersbestimmung pränataler Mausembryonen

Um Embryonen eines bestimmten Entwicklungsstadiums zu erhalten, wurden zeitlich überwachte Verpaarungen (*timed matings*) angesetzt. Dabei wird der Begattungszeitpunkt von neu zusammengeführten Tieren bei einem standardisierten 12 stündigen Tag/Nachtzyklus, aufgrund der Nachtaktivität der Tiere, für 24.00 Uhr angenommen. Mausembrionen sondern bei der Kopulation ein Koagulationssekret ab, das die Vagina des Weibchens durch einen sogenannten *plug* für etwa 10 h verschliesst. Sondiert man die Weibchen am nächsten Morgen auf solch einen vaginalen Pfropf, wird der Zeitpunkt bei einem vorhandenen *plug* für das Entwicklungsstadium (E) der Embryonen mit Tag 0,5 *dpc*

(*days post coitum*) festgesetzt. Der Erfolg für eine Schwangerschaft bei C57BL/6 liegt bei ungefähr 85 %. Der Stamm hat eine Tragezeit von etwa 21 Tagen und eine durchschnittliche Wurfgröße mit 7 Nachkommen. Schwangere Weibchen wurden zum entsprechenden Zeitpunkt eines benötigten Embryonalstadiums durch zervikale Dislokation abgetötet und die Embryonen operativ entnommen.

2.11.4 Präparation von Mausembryo-Fibroblasten (MEF)

Die Präparation der Mausembryo-Fibroblasten erfolgte am Tag 12,5-14,5 *dpc* (*days post coitum*) nach der Paarung (Kontrolle anhand des Vaginalpfropfes bei den weiblichen Tieren, s. Kap. 2.11.3). Die trächtigen Tiere wurden getötet, kurz in Ethanol getaucht und die Embryonen in PBS überführt. Pro Embryo wurde bei der Präparation eine neue Petrischale verwendet. Zunächst wurden Kopf, Extremitäten und Innereien mit sterilem Präparierbesteck von den Embryonen entfernt, dann erfolgte die mechanische Zerkleinerung. Das Gewebe wurde in 1 bis 2 ml 1x Trypsin/EDTA (T/E) aufgenommen, mit dem Skalpell zerteilt und schließlich durch eine 10 ml-Spritze mit Braun Sterican-Kanüle (0,9 x 40 mm) in 15 ml PP-Röhrchen gepresst. Die Gewebestücke in der T/E-Lösung wurden kurz gevortext und zur Freisetzung der Zellen aus dem Gewebeverband 10 min bei 37°C im Zellkulturschrank rotierend inkubiert. Nach wiederholtem Vortexen und einem weiteren 10-minütigen Inkubationsschritt wurden 5 ml DMEM-Vollmedium zugegeben, zur Vereinzelung der Zellen mehrmals auf und ab pipettiert und die Gewebereste abzentrifugiert (10 min, 350 rcf, RT). Die Überstände mit den MEF wurden in 10 cm-Zellkulturschalen in DMEM-Vollmedium ausplattiert.

2.11.5 Analyse muriner embryonaler Stamzellen (ES-Zellen)

Die Analyse der homologen Rekombination in transformierten und selektionierten murinen ES-Zellen wurde im 96-Loch-Mikrotiterplatten-Format durchgeführt. Mit Hilfe einer Vakuumpumpe wurde das Kulturmedium entfernt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Der Proteinase K-Verdau zum Aufschluss der Zellen erfolgte ÜN in einer feuchten Kammer bei 54°C nachdem auf jeden Zellklon 50 µl 1x Zell-Lysepuffer mit 1 mg/ml Proteinase K gegeben wurde. Am nächsten Morgen wurde zur Fällung der DNA jeder Ansatz mit 100 µl eiskaltem 100 % Ethanol (-20°C) überschichtet und für 1,5 h bei RT inkubiert. Durch vorsichtiges Umdrehen der Platte auf Saugpapier wurde der Alkohol entfernt, während die ES-Zell-DNA am Boden der Reaktionsgefäße haften blieb. Dieser Vorgang wurde zum Waschen der DNA dreimal mit jeweils 100 µl 75 % Ethanol wiederholt. Im Anschluss wurde die DNA bei RT für ~ 15 min getrocknet.

Die Restriktion der ES-Zell-DNA mit geeigneten Endonukleasen (vgl. Kap. 2.3.1) wurde im selben 96er-Format durchgeführt. Pro ES-Zellklon wurden 50 U des jeweiligen

Enzyms für den Verdau, ÜN bei 37°C in einer feuchten Kammer, eingesetzt. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte durch Agarose-Gelelektrophorese mit 1x TAE als Puffersystem (s. Kap. 2.2.6). Nach dem Transfer der restringierten, aufgetrennten ES-Zell-DNA auf eine Filtermembran mittels *Southern Blot* (s. Kap. 2.2.8.1) wurden homolog rekombinierte Klone durch die Hybridisierung der Filter mit radioaktiv markierten Sonden (s. Kap. 2.7.1 und 2.7.2) identifiziert und für die Injektion in Blastozysten ausgewählt.

2.12 Histologische Methoden

2.12.1 Gefrierschnitte (Kryodünnschnitte)

Die operativ entnommenen Organe für die Herstellung von Kryodünnschnitten wurden kurz in kühlem PBS gespült und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Proben bei -80°C aufbewahrt. Die für die Analysen herangezogenen Organe wurden dann mit Einbettmedium (*tissue tek*, Fa. Sakura, Heppenheim) fixiert und aufgeblickt. Es wurden 12 µm dicke Serienschnitte bei -25°C im Kryotom angefertigt, auf beschichtete Objektträger (Super Frost +, Fa. Menzel) aufgezogen und bei -20°C aufbewahrt.

2.12.2 X-Gal-Färbung

Die künstliche Substanz X-Gal wird zur qualitativen Bestimmung der Aktivität der β-Galactosidase (codiert durch das *lacZ*-Gen) benutzt. Dabei hydrolysiert das Enzym β-Galactosidase das chromogene Substrat X-Gal zu Galaktose und 5-Brom-4-chlor-Indoxyl. Das 5-Brom-4-chlor-Indoxyl wird durch Luftsauerstoff zum blauen Farbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-Indigo oxidiert.

Für die X-Gal-Färbung (Rubera *et al.* 2001) auf Kryodünnschnitten wurden die Objektträger (OT) mit den Präparaten aus der Lagerung bei -20°C entnommen und zunächst luftgetrocknet. Die Fixierung erfolgte bei RT für 10 min in 0,5 % Glutaraldehyd. Danach wurde zweimal mit PBS gespült und durch Inkubation ÜN in X-Gal-Lösung gefärbt. Am nächsten Morgen wurde erneut 2x mit PBS und 1x mit H₂O bidest gespült. Im Anschluss wurde eine Färbung der Kerne zur besseren Darstellung der Gewebestrukturen durchgeführt (s. Kap. 2.12.3)

2.12.3 Kernechtrot-Färbung

Die Färbung der Kerne mit Kernechtrot wurde nach den Angaben des Herstellers Fa. Chroma (Waldeck) durchgeführt. Dafür wurden die Präparate für 30 sec in Kernechtrot/Aluminiumsulfat getaucht und danach in H₂O bidest gewaschen. Nach

Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe jeweils 5 min (50 %, 70 %, 2x 96 %, 3x 100 %, 3x Xylol) wurden die Präparate mit Entellan (Fa. Merck) eingedeckelt.

2.12.4 H/E-Färbung

Mittels Hämatoxylin/Eosin (HE)-Färbung gemäß der Angaben des Herstellers (Accustain/HE-Färbung, Fa. Sigma) wurden die Zellkerne und das Bindegewebe der Objekte angefärbt. Die Blaufärbung der Kerne erfolgte für 3 min in Hämatoxylin, wobei dieses durch Oxidation in den eigentlichen Farbstoff Hämatein überführt wird. Das Bindegewebe wurde für 3 bis 5 min mit Eosin orangerot angefärbt. Anschließend wurden die Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und nach dem Xylolschritt mit Entellan (Fa. Merck, München) eingedeckelt.

3. ERGEBNISSE

Der Einsatz konditionaler transgener Mausmodelle mit der Möglichkeit der steuerbaren Expression eines Zielgens gewinnt in der Tumorforschung immer mehr an Bedeutung. Sie sind mittlerweile ein unerlässliches Werkzeug zur Erforschung der Mechanismen bei der Entstehung und Progression bis hin zur Metastasierung von Tumoren. Das in der vorliegenden Arbeit verwendete *Tet on/off*-System bietet hierbei mehrere Vorteile im Vergleich zu anderen induzierbaren Systemen. Erstens: Während wichtiger Abschnitte der Entwicklung steht dem Organismus das essenzielle Genprodukt zur Verfügung und ermöglicht so überhaupt erst die Generierung eines Modells für die entsprechende Krankheit. Zweitens: Je nach Wahl der Steuerelemente kann das zu untersuchende Gen nun zu definierten Zeitpunkten und in definierten Geweben ab- bzw. angeschaltet werden. Auf diese Weise können Ereignisse wie *loss of function*-Mutationen, die möglicherweise zur Tumorentstehung führen simuliert werden und somit frühe Mechanismen der Tumorentstehung erforscht werden. Die weiteren darauf folgenden Schritte der Tumorentwicklung können ebenso sukzessive untersucht werden. Drittens: Die Reversibilität dieses Systems bietet die Möglichkeit zusätzliche Informationen über entscheidende Zeitpunkte zu gewinnen, an denen unter Umständen eine Remission von Tumoren noch möglich ist.

Die Schlüsselrolle von WT1 in der Nephrogenese wurde bereits in der Einleitung erläutert. Verschiedene Mausmodelle konnten Bedeutung und Funktion von Wt1 in der Embryonalentwicklung und in der Krankheitsentstehung zusehends aufklären. Allerdings gibt es darunter kein brauchbares Wilms' Tumor-Mausmodell. Konventionelle *Wt1* k.o.-Mäuse sind embryonal letal und entwickeln u. a. keine Nieren. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit versucht ein konditionales, reversibles Modell der Wilms' Tumorgenese auf der Basis des *Tet on/off*-Systems zu entwickeln. Die folgende Abbildung (s. Abb. 3.1) verdeutlicht noch einmal die Strategie zur Herstellung einer konditionalen *Wt1* k.o.-Maus. Hierzu sollten zwei Mauslinien generiert werden (s. Kap 1.4: Ziel der Arbeit). Zum einen eine *Responder*-Mauslinie, die ein stringent tTA/Dox-regulierbares *Wt1*-Transgen (*tgWt1*) im Genom trägt, das die Fähigkeit besitzt den Verlust von endogenem Wt1 in kritischen Phasen der Embryonalentwicklung und damit auch in der Nephrogenese zu kompensieren. Zum anderen eine Effektor-Linie, bei der ein tetrazyklinabhängiger Transaktivator (*tTA*) unter die Kontrolle des *Wt1*-Promotors gebracht wird, um eine genaue Wt1-spezifische, zeitliche und räumliche Expression des Transgens zu gewährleisten. Die Kreuzung beider Linien ergibt eine induzierbare reversible *Wt1* k.o.-Maus als mögliches WT-Modell.

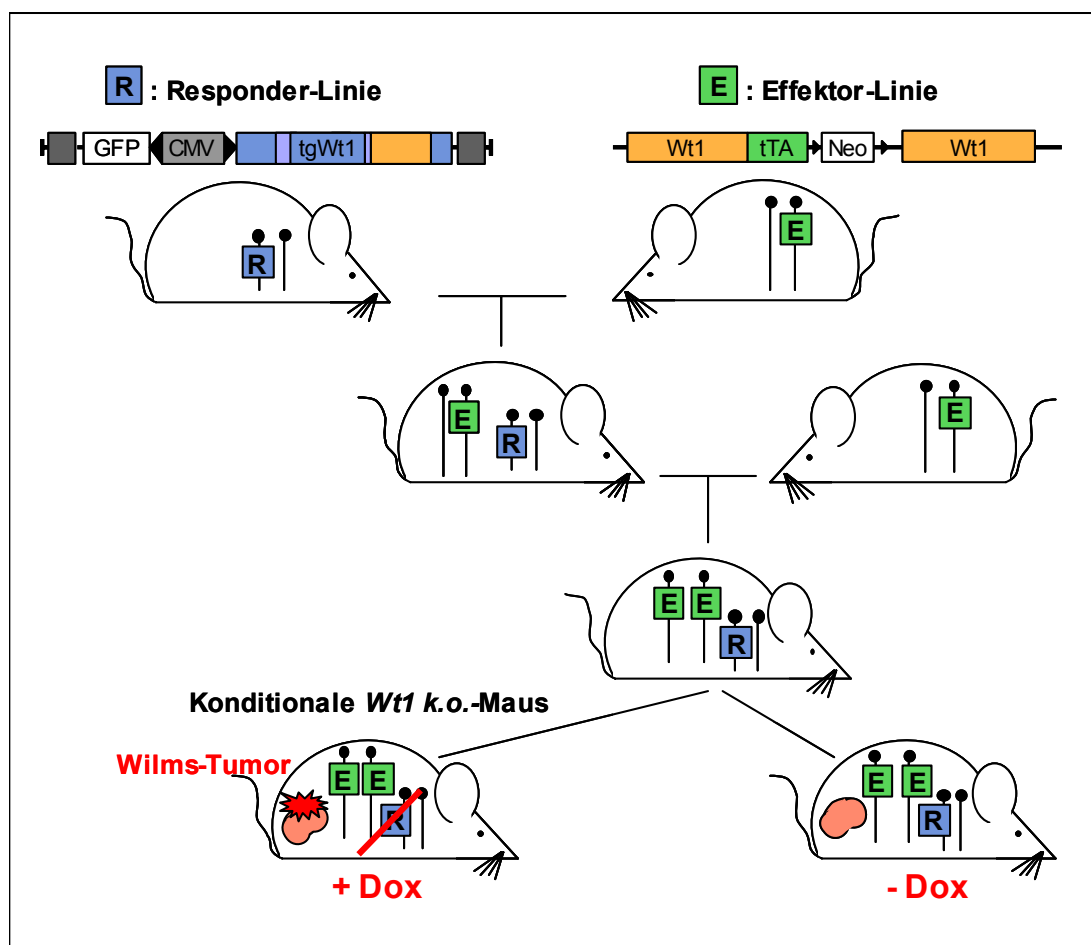


Abbildung 3.1: Strategie zur Generierung einer konditionalen *Wt1* k.o.-Maus.

Nach ihrer Generierung werden Effektor-Mäuse (*Wt1-tTA*; E) und Responder-Mäuse (*tgWt1*; R) so verpaart, dass die Expression des Transgens bei gleichzeitigem *knock out* des endogenen *Wt1*-Lokus, Doxyzyklin-abhängig (+/-Dox) gesteuert werden kann. Konditionale *Wt1* k.o.-Mäuse sollten sich ohne Dox normal entwickeln. Die Doxyzyklin-Applikation bewirkt das Abschalten des Transgens, simuliert so eine *Wt1* null-Mutation und sollte damit einen Wilms' Tumor in der Niere induzieren.

3.1 Responder-Mäuse (*Wt1-Resp*)

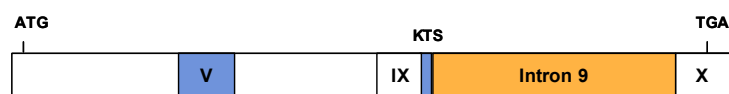
3.1.1 Herstellung der Responder-Konstrukte

Als ursprünglicher Träger des konditional und reversibel exprimierbaren *Wt1*-Transgens (*tgWt1*) wurde das Expressionsplasmid pBI-EGFP der Firma Clontech gewählt. Dieser Vektor verfügt über einen bidirektionalen CMV-Minimalpromotor, der ein tetrazyklinresponsives Element (TRE) enthält, das aus sieben Kopien der 42 bp großen Tetrazyklinoperator (*TetO*)-Sequenz besteht. An diese kann ein tetrazyklinabhängiger Transaktivator (tTA) binden und die Transkription der entsprechenden Zielgene initiieren. Die Applikation von Doxyzyklin (Dox, ein Tetrazyklin-Analogen) blockiert den tTA und verhindert diese Expression. Verwendet man hingegen einen reversen tetrazyklin-abhängigen Transaktivator (rtTA) als Effektor, benötigt dieser die Anwesenheit von Dox

zur Bindung an die *TetO*-Sequenz des Promotors (reverse Eigenschaften, s. auch Abb. 1.2). Der integrierte bidirektionale Promotor steuert auf der einen Seite die Expression von fluoreszierendem *enhanced green fluorescent protein (EGFP)* als Induktionsmarker, wohingegen auf der anderen Seite eine beliebige cDNA in das Plasmid eingebracht werden kann.

Um ein *Wt1*-Transgen zu generieren, das den Ausfall von endogenem *Wt1* in der Embryonalentwicklung kompensieren kann, musste gewährleistet sein, dass nach der Expression alle *Wt1*-Proteinisoformen von physiologischer Relevanz dem Organismus zur Verfügung stehen. Bezugnehmend auf eine Veröffentlichung von Bruening *et al.* 1992, in der die Spleißbarkeit eines künstlich in COS-1 Zellen eingebrachten *Wt1*-Konstruktes gezeigt wird, wurde die uns freundlicherweise von Prof. Dr. J. Pelletier (McGill Cancer Center, Montreal/Kanada) zur Verfügung gestellte murine *Wt1* cDNA der Form plus Exon 5, ohne die drei AS Lysin, Threonin und Serin (*mWt1*^{+Ex5; -KTS}, NCBI Accession #: NM_144783) entsprechend modifiziert. Dafür wurde die linearisiert vorliegende, von *Sau3AI*-Restriktionsschnittstellen flankierte cDNA zunächst in einen *Bam*HI-restringierten pBluescript SK II (+/-) (pBSK)-Vektor der Firma Stratagene eingefügt. Aus dem so entstandenen Plasmid wurden 3'-gelegene Teile von Exon 9 und das komplette Exon 10 mit Hilfe einer kombinierten *Rsr*II/*Hind*III-Restriktion entfernt und durch die entsprechenden genomischen Sequenzen von *Wt1* Exon 9/Intron 9/Exon 10, die auch die alternative Spleißdonorstelle für die +/-KTS-Formen enthalten, ersetzt. Dieses Fragment wurde durch eine *Expand*-PCR auf genomischer muriner ES-DNA der Linie 129 amplifiziert und in einen T-Vektor (pBSK-T, hergestellt von Dr. C. Spangenberg) ligiert, über die o. g. *Rsr*II/*Hind*III-Schnittstellen wieder entnommen und in das entsprechend vorbereitete Plasmid pBSK-*mWt1*^{-Ex9; -Ex10} eingefügt.

1) cDNA *mWt1*^{+Ex5; +/-KTS}:



2) Responder-Konstrukt p*Wt1*-Resp2:



3) Responder-Konstrukt p*Wt1*-Resp1:



Abbildung 3.2: Herstellung der Responder-Konstrukte.

1) Chimäre cDNA *mWt1*^{+Ex5; +/-KTS}. Die beiden alternativen Spleißereignisse (+/- Exon 5; +/-KTS) sind blau, das eingefügte Intron 9 orange unterlegt.

2) Zeigt schematisch die Klonierung der hergestellten *Wt1* cDNA in den Vektor pBI-EGFP.

3) Alle funktional relevanten Komponenten werden in den Vektor pINS eingebracht und durch die beiden Isolatoren flankiert.

(*mWt1*^{+Ex5; +/-KTS}): cDNA des *Wt1*-Gens mit Exon 5 und Intron 9; (*TetOCMV*): bidirektionaler CMV-Minimalpromotor mit sieben *TetO*-Wiederholungen; (*EGFP*): cDNA des *enhanced green fluorescent protein*-Gens; (*INS*): Isolatorsequenzen (engl.: *Insulator*).

Die daraus resultierende ‚chimäre‘ cDNA $mWt1^{+Ex5; +/-KTS}$ (enthält Intron 9) wurde mit den Restriktionsendonukleasen *ClaI* und *SpeI* aus dem pBSK-Vektor isoliert und nach Auffüllen der überhängenden Enden in den oben beschriebenen mit *PvuII*-linearisierten Vektor pBI-EGFP eingefügt. Die korrekte Orientierung der cDNA wurde mittels Restriktionsverdau (*XbaI*) und einer Sequenzierung mit geeigneten Oligonukleotiden (BI-EGFP L/R) verifiziert. Das so generierte *Wt1-Responder*-Plasmid pBI-EGFP/ $mWt1^{+Ex5; +/-KTS}$ trägt die Bezeichnung **pWt1-Resp2** (s. Abb. 3.2 und 3.3).

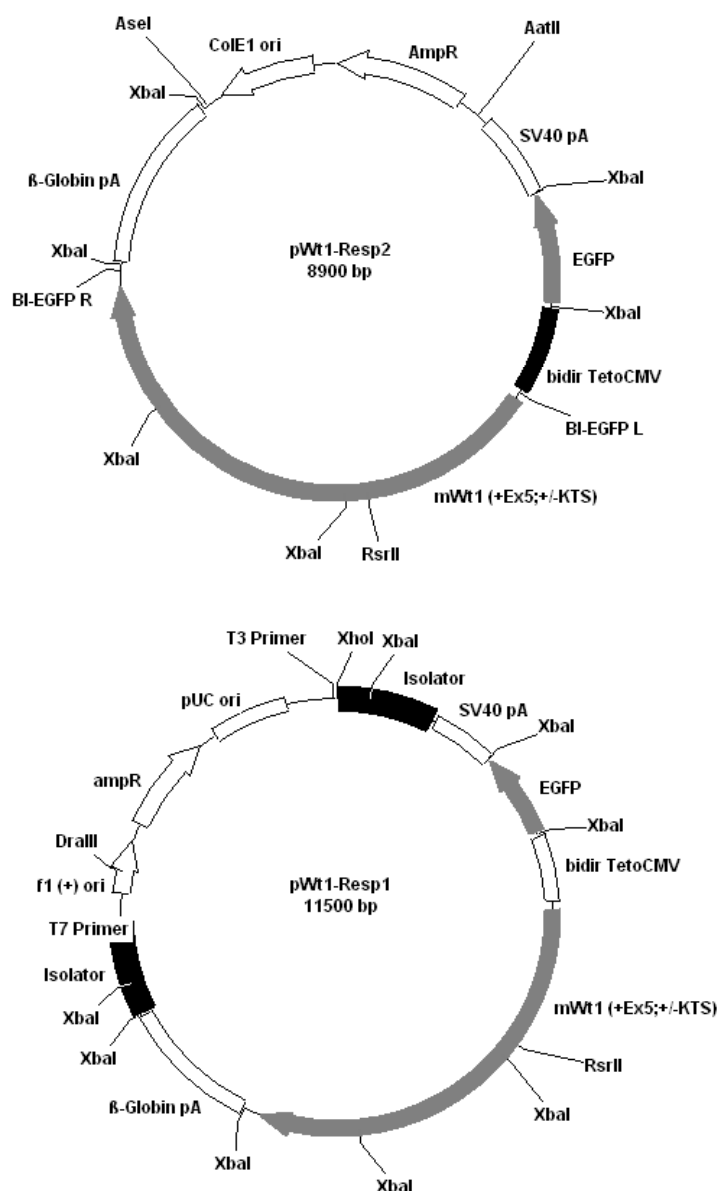


Abbildung 3.3: Expressionsplasmide pWt1-Resp2 und pWt1-Resp1.

Eingezeichnet sind alle Komponenten der Plasmide, sowie die verwendeten Restriktionsschnittstellen zur Klonierung, Verifizierung und Linearisierung. Die chimäre cDNA $mWt1^{+Ex5; +/-KTS}$ hat eine Größe von 3,55 kb, wobei 2,2 kb auf das Intron 9 entfallen. Zur Injektion in befruchtete Mausoozyten wurde *pWt1-Resp2* mit den Enzymen *AseI/AatII* und *pWt1-Resp1* mit *DraIII/XhoI* linearisiert.

(bidir. *TetOCMV*): CMV-Minimalpromotor mit sieben *TetO*-Wiederholungen; (β -Globin pA und SV40 pA): Polyadenylierungssignal aus SV40- und β -Globin-Gen; (EGFP): cDNA des *enhanced green fluorescent protein* Gens, $mWt1(+Ex5; +/-KTS)$: cDNA des *Wt1*-Gens mit Exon 5 und Intron 9. Insertsequenzierung: *pWt1-Resp2* mit den Primern BI-EGFP L/R, *pWt1-Resp1* mit T3/T7-Primern.

Um die Folgen von Positionseffekten bei der ungerichteten Integration des *tgWt1* ins Genom der Zielzelle zu vermeiden, wurden die für die Expression des *Responders* wichtigen Komponenten in einen weiteren Vektor eingefügt. Hierfür wurde das Plasmid *pBI-EGFP/mWt1^{+Ex5; +/-KTS}* mit einem *Asel/AatII*-Verdau linearisiert und erneut nach Auffüllen der überhängenden Enden in den mit *SmaI* geöffneten Vektor *pINS* ligiert. Dieser Vektor wurde im Rahmen der Doktorarbeit von Herrn Dr. M. Maringer (AG Dr. E. Bockamp, Universität Mainz) generiert und uns freundlicherweise zur Herstellung unserer *Responder*-Konstrukte zur Verfügung gestellt. Grundlage des Vektors *pINS* ist das Plasmid *pBlueskript II KS (+)* der Firma Stratagene, in das flankierend zur *Multiple Cloning Site* (MCS) zwei Matrix-Anheftungsregionen (MAR) aus dem menschlichen *β -Globin*-Gen eingefügt wurden (Fleenor *et al.* 1993, Fukumura *et al.* 1998). Diese als Isolatoren (*engl.: Insulator*) fungierenden Sequenzen schützen das Transgen vor der Aktivität von *Enhancer*- und/oder *Silencer*-Elementen in der Nähe des Integrationsortes (Pikaart *et al.* 1998, Bell *et al.* 1999 und 2001) und sichern so eine stringente Regulation des Transgens durch den Effektor. Der so entstandene Vektor *pINSpBI-EGFP/mWt1^{+Ex5; +/-KTS}* wurde als ***pWt1-Resp1*** bezeichnet (s. Abb. 3.2 und 3.3) und ebenfalls durch Restriktions-verdau mit dem Enzym *XbaI* und eine entsprechende Sequenzierung (T3/T7-Primer) verifiziert.

3.1.2 Generierung transgener *Responder*-Mäuse

Zur Herstellung der transgenen *Responder*-Linien wurde von den beiden Konstrukten *pWt1-Resp1* und *pWt1-Resp2* 150 μ g Plasmid-DNA linearisiert. Hierfür wurden für das Plasmid *pWt1-Resp1* die Restriktionsenzyme *DraIII/XhoI* und für *pWt1-Resp2* *AatII/Asel* verwendet (s. Abb. 3.3). Im Anschluss wurden die Fragmente durch Gelextraktion und Fällung für die Oozyteninjektion bereit gestellt. Die entsprechenden Techniken der Pronukleusinjektion in den paternalen Vorkern der befruchteten Mausoozyten, die Hormonbehandlung der Ammenmütter, sowie das Überführen der Zygoten in die scheinsschwangeren Ammenmütter wurde in der Arbeitsgruppe von Dr. E. Bockamp (Institut für Toxikologie, Universität Mainz) von Dr. L. Eshkind und Frau S. Ohngemach durchgeführt. Den Nachkommen der Ammenmütter wurden nach vier Wochen Schwanzbiopsien entnommen und daraus die DNA zur Analyse präpariert. Potenzielle *Founder*-Tiere, d. h. solche mit integriertem Transgen, wurden zunächst über PCR und *Southern Blot* identifiziert. Die weiteren Nachkommen wurden später dann mittels PCR bzw. über Dot-Blot genotypisiert (s. Abb. 3.4).

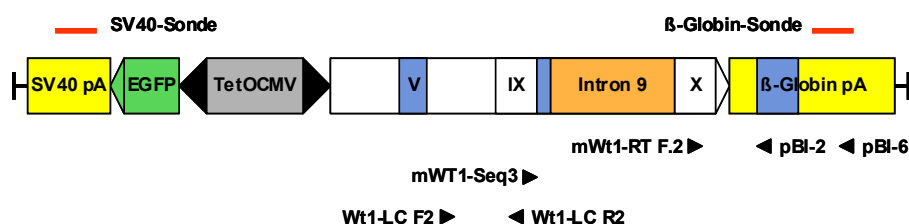


Abbildung 3.4: Analyse der *Responder*-Linien.

Dargestellt sind die Positionen der Sonden und Primer innerhalb des *Responder*-Konstruktes, die zur Genotypisierung und Charakterisierung der daraus generierten *Responder*-Linien eingesetzt wurden. Die radioaktiv markierten Sonden (SV40- und β -Globin) wurden zur Detektion transgener Tiere in *Southern*- und Dot-Blot verwendet. Die Primerkombinationen mWt1-RT F2/pBI-2 und mWt1-RT F2/pBI-6 dienten der Genotypisierung transgener Mäuse mittels PCR und dem Nachweis der aus dem Transgen resultierenden tg*Wt1*-RNA durch RT-PCR. Zur Analyse der Funktionalität der eingebrachten cDNA wurden die Primer mWT1-Seq3/pBI-6 benutzt, mit denen das alternative Spleißen des Exon 9 mittels RT-PCR auf RNA-Ebene gezeigt werden sollte. Die Primer Wt1-LC F2/R2 wurden bei der Genotypisierung durch PCR und der quantitativen PCR im *Light Cycler* zur Identifizierung homozygot transgener Tiere eingesetzt. In der β -Globin pA-Kassette wurde das integrierte Intron 2 (560 bp) hellblau/transparent dargestellt. Bei Transkription der transgenen RNA wird es gespleißt, so dass man bei Verwendung der Primer mWt1-RT F2/pBI-6 in der PCR zwischen DNA- und RNA-Produkten unterscheiden kann.

3.1.3 Identifizierung transgener *Founder*-Tiere

Durch die Pronukleusinjektionen mit den linearisierten Konstrukten wurden von der Arbeitsgruppe Dr. E. Bockamp insgesamt 74 potenziell transgene Tiere generiert. Es wurden für die Linie ***Wt1-Resp1*** 42 (Maus #1-#42) und für die Linie ***Wt1-Resp2*** 32 (#43-#74) Mäuse analysiert. Zunächst wurden alle extrahierten DNAs mittels PCR mit den Oligonukleotiden mWT1-RT F2 und pBI-2 auf die Integration des Transgens untersucht. Dabei wurde die Lage des reversen Primers pBI-2 (ebenso wie pBI-6) im 5'-Bereich der β -Globin-PolyA-Kassette gewählt, um eine Amplifikation des endogenen *Wt1*-Gens zu vermeiden (s. Abb. 3.4). Die in Abbildung 3.5 dargestellten Gele zeigen beispielhaft die Ergebnisse solcher Genotypisierungs-PCRs zur Identifizierung transgenpositiver Mäuse, sowie deren erster Filialgeneration.

Schwanzbiopsie-DNAs wurden mit *Xba*I restringiert, um durch *Southern Blot*-Analysen die PCR-Ergebnisse zu verifizieren und mögliche falsch-positive Tiere zu detektieren. Die Hybridisierung der Filtermembran erfolgte mit einer radioaktiv markierten Sonde (generiert mit den Primern β -glo id F/ β -glo id R), die spezifisch an die β -Globin-Kassette des Transgens bindet. Bei entsprechend vollständigem Verdau sollte ein Produkt von etwa 1,2 kb Größe zu sehen sein. Positive Signale unterschiedlicher Größe sind entweder durch einen partiellen Verdau der DNA oder aber auf die Art der Integration des Transgens ins Genom zurückzuführen. Hierbei könnte die äußerste *Xba*I-Schnittstelle des Konstruktes verloren gegangen und durch die nächstgelegene genomische ersetzt worden sein. So würde ein größeres Restriktionsfragment entstehen. Die Abbildung 3.6 zeigt exemplarisch einige Ergebnisse der Analysen zur Genotypisierung im *Southern Blot*.

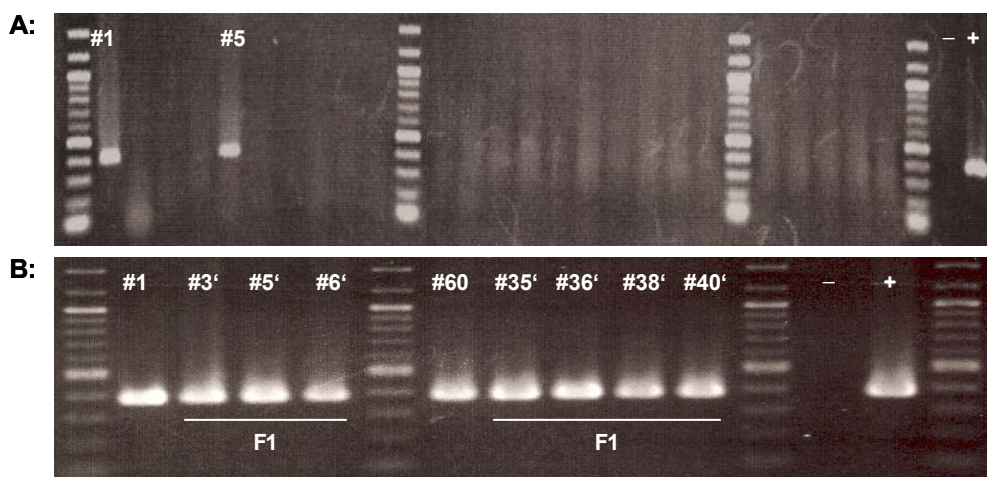


Abbildung 3.5: PCR-Genotypisierung transgener Founder und deren Nachkommen.

A: Gezeigt ist die Identifizierung potenzieller *Founder*-Tiere für *pWt1-Resp1*. **B:** Zu sehen ist die erfolgreiche Genotypisierung der *Founder* #1 (für die *Responder*-Mauslinie) *Wt1-Resp1*, *Founder* #60 für die Linie *Wt1-Resp2*, sowie zusätzlich eine Auswahl ihrer Nachkommen.

Primer: mWt1-RT F2/pBI-2; Produktgröße: 390 bp; (+): Positivkontrolle *pWt1-Resp1* Plasmid; (-): Negativkontrolle H_2O ; (*): markiert F1-Mäuse; Größenstandard: 100bp-Leiter.

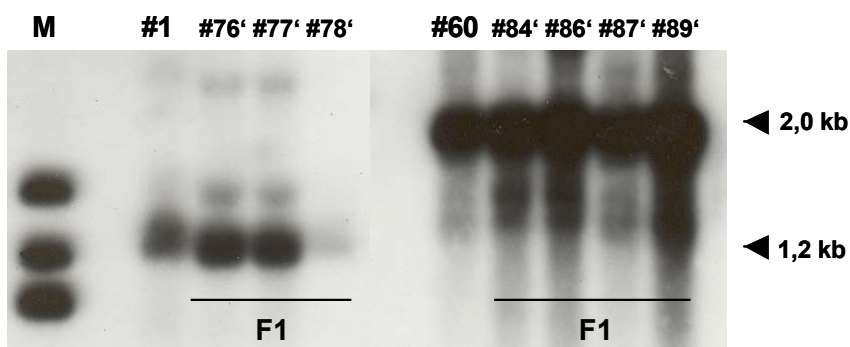


Abbildung 3.6: Southern Blot Genotypisierung der Mauslinien *Wt1-Resp1* und *Wt1-Resp2*.

Die *Xba*I-restringierte DNA der *Founder*-Tiere #1 und #60 für die *Responder*-Linien *Wt1-Resp1* (links) und *Wt1-Resp2* (rechts), sowie deren Nachkommen (F1) wurde nach dem *Southern Blot* mit einer spezifischen Sonde für die β -Globin-PolyA-Kassette der *Responder*-Konstrukte markiert und im Autoradiogramm nachgewiesen. Erwartet wurde ein 1,2 kb großes Fragment, wie bei den Tieren der Linie *Wt1-Resp1* links in der Abbildung. Ursachen für abweichende Produktgrößen (#60 und F1, rechts) sind möglicherweise eine unvollständige Restriktion der DNA oder die Art der Integration des Transgens ins Genom, die beim Konstrukt *pWt1-Resp2* (ohne Isolatoren) die erwartete Größe verändert.

Sonde: β -Globin-PolyA, (M): Größenstandard 100bp-Leiter.

3.1.4 Etablierung und Zucht der *Responder*-Linien

Aus den o. g. 74 potenziell transgenen Tieren konnten lediglich zwei positive Mäuse identifiziert werden. Entsprechend des injizierten Konstruktes wurden die Linien als ***Wt1-Resp1***, entstanden aus der Maus #1 und ***Wt1-Resp2***, hervorgegangen aus dem Tier #60 bezeichnet. Zur Etablierung der transgenen Linien wurden die *Founder* mit Wildtyp-Mäusen der Stämme FVB/N bzw. C57BL/6 verpaart. Die Nachkommen wurden zunächst

wieder über PCR und *Southern Blot*, später dann durch PCR und *Dot Blot* genotypisiert (s. Abb. 3.7).

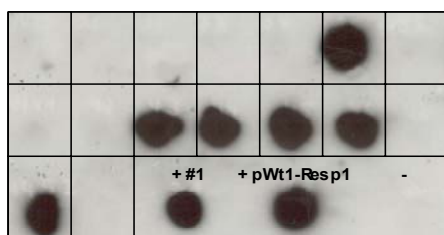


Abbildung 3.7: Dot Blot zur Identifizierung transgener Nachkommen.

Darstellung eines Autoradiogramms zur Genotypisierung transgener Nachkommen. Es wurden 5-10 µg DNA je Tier aufgetropft und mit einer β -Globin-spezifischen, radioaktiv markierten Sonde hybridisiert. Als Kontrollen wurden neben der extrahierten DNA der Transgenen #1 (+) auch Plasmid-DNA (+ pWt1-Resp1) und H₂O (-) eingesetzt.

Beide Linien wurden anschließend mittels Embryotransfer in die SPF-Haltung der ZVTE (Zentrale Versuchstiereinrichtung) der Universität Mainz unter Leitung von Dr. K. Reifenberg überführt und zur Generierung von Inzuchtstämmen über zehn Generationen mit C57BL/6-Wildtyp-Mäusen gekreuzt (sog. Rückkreuzung oder *Backcross*). Die Genotypisierung der Tiere erfolgte in unserem Labor mittels PCR (Oligonukleotide: mWt1-RT F.2/pBI-6 bzw. Wt1-LC F2/Wt1-LC R2). Nach dem zehnten *Backcross* (BC) wurden hemizygoten Tiere in einem *Intercross* (IntC) zur Herstellung homozygoter *Responder*-Linien verpaart. Die DNAs der potenziell homozygoten Nachkommen SPF#574-#586 wurden durch quantitative *real time*-PCR im *Light Cycler* identifiziert und durch einen sog. *Outcross* mit Balb/c-Mäusen verifiziert. Alle Nachkommen des als Beispiel aufgeführten Bockes SPF#578♂ waren positiv für das Transgen, was den homozygoten Status dieses Tieres bestätigte (s Abb. 3.8).

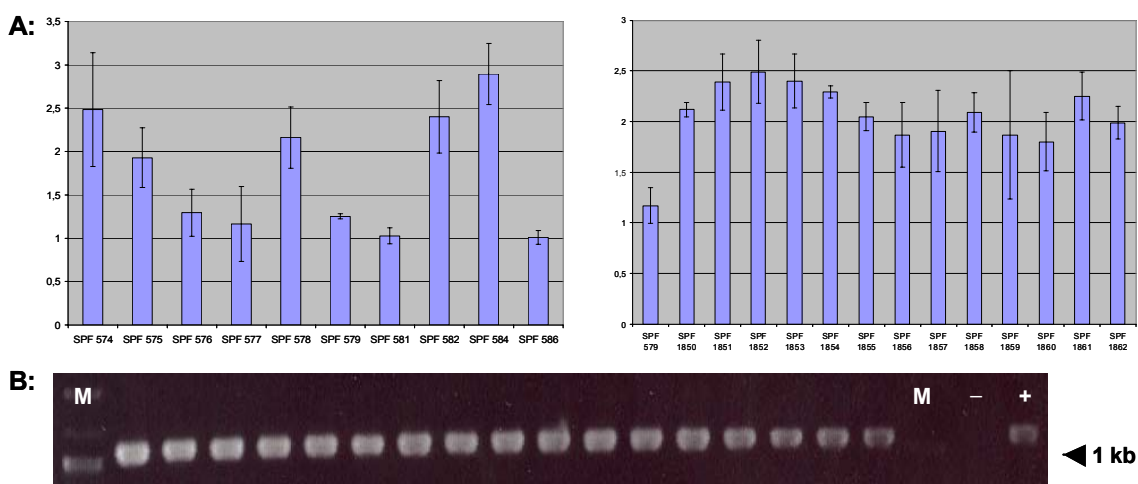


Abb. 3.8: ZVTE-Homozygotenzucht von *Wt1-Resp1*.

A: Nach dem ersten *Intercross* wurden die potenziell homozygoten Tiere durch RT-PCR im *Light Cycler* detektiert (3.7 A links, Primer: Wt1-LC F2/Wt1-LC R2). Eine Expressionsstärke um 2 findet sich bei homozygoten Tieren. **B:** Zusätzlich wurden diese durch einen *Outcross* mit Balb/c-Mäusen verifiziert (3.7 B). Exemplarisch dargestellt ist hier die PCR-Genotypisierung von Nachkommen der Verpaarung SPF#578♂ x Balb/c♀ (Primer: mWt1-RT F.2/pBI-6; Produktgröße: 1020 bp, Größenstandard: M (Marker) 100bp-Leiter). Die Analyse der ersten homozygoten Nachkommen der Verpaarung SPF#578♂ x SPF#584♀ ist in 3.7 A rechts zu sehen (Kontrolle: SPF#579 hemizygot).

Zur Etablierung von homozygoten *Responder*-Linien wurden zeitgleich die als homozygot identifizierten Mäuse (z. B. SPF#578 x SPF#584) zum ersten *Incross* (IC) angesetzt. Allerdings konnten hier bisher allein aus diesem Zuchtkäfig nur zweimal Nachkommen erhalten werden. Die homozygoten transgenen Mäuse zeigen eine schlechte gesundheitliche Konstitution, die anscheinend mit früher Sterilität bzw. mit direkter Infertilität einhergeht. Auch weitere Zuchtpaare haben bisher keine Nachkommen geboren.

3.1.5 Charakterisierung der Linien *Wt1-Resp1* und *Wt1-Resp2*

Die Charakterisierung der *Responder*-Linien erfolgte in mehreren Schritten. Zunächst wurde mittels RT-PCR überprüft, ob eine basale ungewollte Expression (*Leakage*) des Transgens in den Tieren nachzuweisen ist. Anschließend sollte die Regulierbarkeit des *tgWt1* in Mausembryo-Fibroblasten (MEF) gezeigt werden, um Hinweise zur Induzierbarkeit zu erlangen. Im letzten Versuchsabschnitt wurden die *Wt1-Responder*-Mäuse mit vorhandenen Effektor-Mäusen verpaart und die Dox-abhängige Expression des Transgens im Gewebe nachgewiesen.

3.1.5.1 Überprüfung der basalen Expression des *Wt1*-Transgens

Bei der Charakterisierung der *Responder*-Linien *Wt1-Resp1* und *Wt1-Resp2* wurde zunächst mit der Überprüfung einer basalen Expression des *tgWt1* in Abwesenheit des Transaktivators (tTA) begonnen. Durch die ungerichtete Integration des Konstruktes ins Genom bei der Pronukleusinjektion besteht die Möglichkeit einer ungewollten Expression des Transgens, hervorgerufen durch vorhandene *Enhancer*-Elemente am Integrationsort. Ein solcher sog. *Leakage*-Effekt mit einer unkontrollierbaren ständigen Expression von transgenem *Wt1* ohne eine tTA- bzw. Dox-abhängige Induzierbarkeit würde die *Responder*-Linien unbrauchbar machen. Diese mögliche basale Expression sollte mittels RT-PCR überprüft werden.

Hierfür wurde aus den drei ausgewählten Organen Leber (L), Darm (D), Niere (N) von einfach transgenen *Wt1-Resp1* und *Wt1-Resp2* Mäusen RNA gewonnen und mittels reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Die anschließende PCR zur Detektion einer konstitutiven *tgWt1*-Expression wurde mit spezifischen Primern (mWt1-RT F2/pBI-6, s. Abb. 3.4) durchgeführt, so dass eine Amplifikation von endogener *Wt1*-RNA vermieden wird. In Abbildung 3.9 sind die Ergebnisse der RT-PCR Untersuchungen der *Responder*-Linien *Wt1-Resp1* und *Wt1-Resp2* dargestellt.

Die Untersuchung der Organe Leber, Darm, Niere ergab, dass beide *Responder*-Linien keine Expression des Transgens in Abwesenheit des Transaktivators zeigen. Bei einer basalen Expression von *tgWt1* wäre eine Produktgröße von 460 bp (RNA) zu erwarten gewesen. Diese ist weder bei der Linie *Wt1-Resp1*, noch bei *Wt1-Resp2* nachzuweisen. Im Fall der Linie *Wt1-Resp2* wurden die vorhandenen Produkte (~ 1 kb) als genomische Verunreinigung interpretiert, da sie auch (allerdings sehr viel schwächer) in der -RT Kontrolle entstehen und die Größe des Amplifikats der als PCR-Kontrolle eingesetzten Maus-DNA aufweisen.

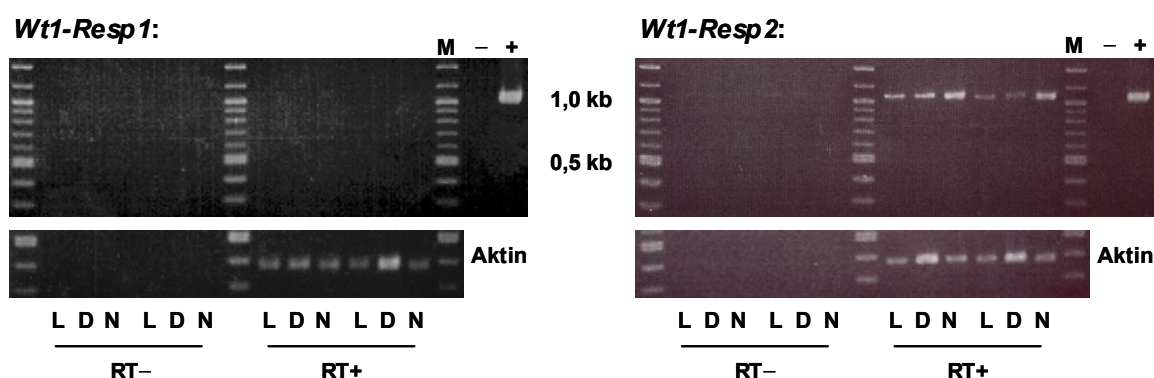


Abbildung 3.9: RT-PCR zur Untersuchung der basalen Expression von transgenem *Wt1* in den *Responder*-Linien *Wt1-Resp1* und *Wt1-Resp2*.

Je zwei Tieren pro *Responder*-Linie wurden die Gewebe Leber (L), Darm (D) und Niere (N) entnommen und die mögliche *tgWt1*-Expression mit RT-PCRs untersucht (Primer: mWt1-RT F2/pBI-6, 35 Amplifikationszyklen). Beide Mauslinien zeigen keine *tgWt1*-Expression (Produktgröße: 460 bp). Als Kontrolle für die eingesetzten cDNA-Mengen diente eine Aktin-spezifische RT-PCR (Oligonukleotide: musAktin A3/A5, 18 Amplifikationszyklen). Die Ansätze der Linie *Wt1-Resp2* zeigen ein Produkt der Größe 1020 bp, das vermutlich auf Grund einer Verunreinigung mit genomischer DNA nach unvollständigem DNase-Verdau zustande kommt.

(RT+): Ansätze mit reverser Transkriptase; (RT-): Ansätze ohne reverse Transkriptase; (+): Maus-DNA der entsprechenden Linie als Positivkontrolle; (-): H₂O; (M): Größenstandard 100bp-Marker.

3.1.5.2 Untersuchung der Induzierbarkeit in MEF-Assays

Um erste Anhaltspunkte zur Induzierbarkeit der *Responder*-Linien zu erhalten, wurde die Dox-regulierte Expression des *Wt1*-Transgens mittels RT-PCR im Assay mit Mausembryo-Fibroblasten (MEF) untersucht. Hierfür wurden beide Linien mit entsprechenden *CMV-rtTA* Effektor-Mäusen gepaart (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. H. Bujard, ZMBH Heidelberg; s. Kistner *et al.* 1996). Diese tragen den ubiquitär in allen Geweben exprimierten reversen tetrazyklinabhängigen Transaktivator (*rtTA*) unter der Kontrolle eines *CMV*-Minimalpromotors. Die Applikation von Doxyzyklin sollte also eine Expression des Transgens gewährleisten. Schwangeren *Wt1-Resp1* Mäusen wurden Embryonen (E) am Tag 12,5 *dpc* (*days post coitum*) entnommen und daraus MEF gewonnen. Nach der Genotypisierung wurden die MEF eines doppelt transgenen Embryos (*CMV-rtTA/Wt1-Resp1* #E9) zwei Tage mit und ohne

Dox (1 µg/ml) inkubiert. Anschließend wurde die Expression des *tgWt1* anhand von RT-PCRs auf RNA-Ebene überprüft (s. Abb. 3.10).

CMV-rtTA/*Wt1-Resp1*:

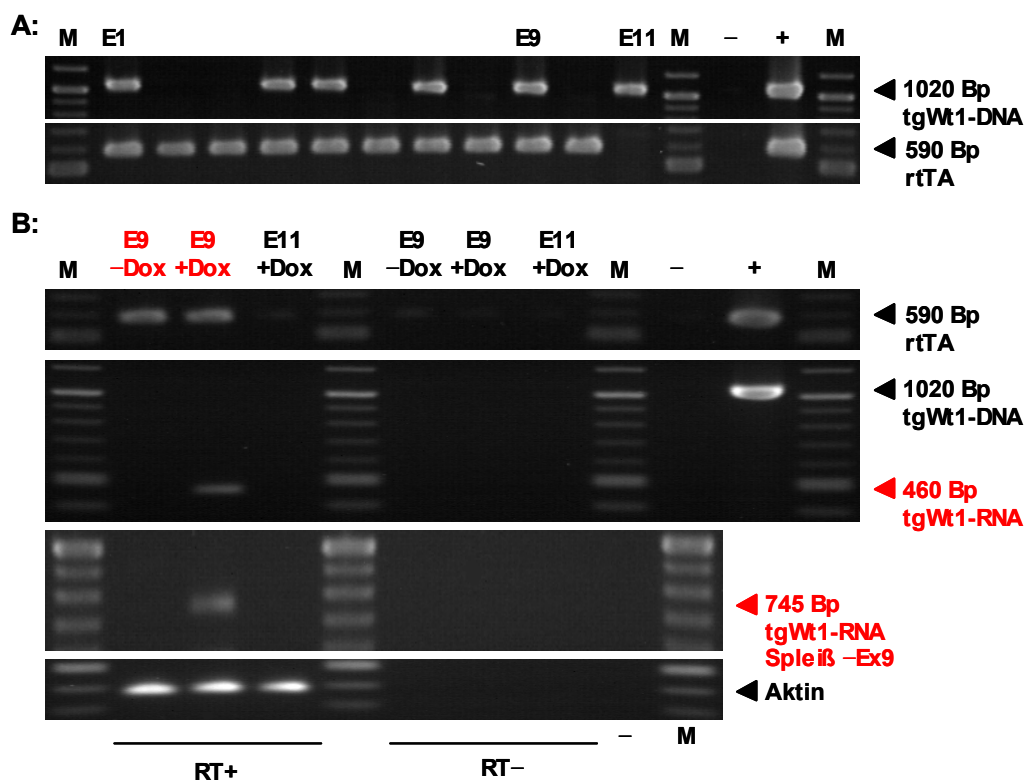
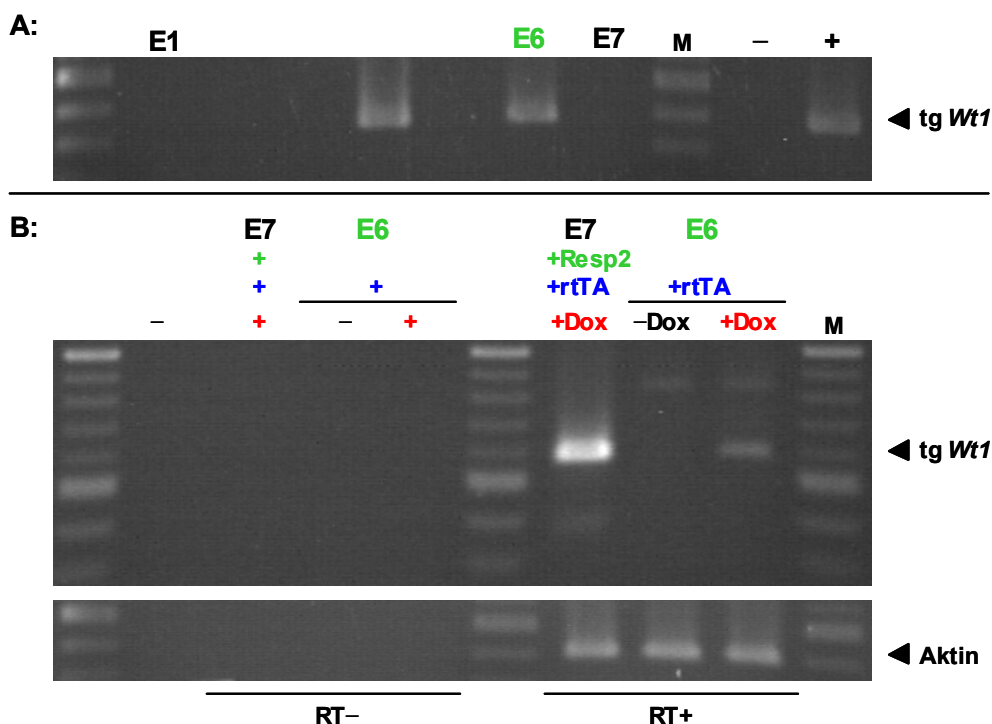


Abbildung 3.10: MEF-Assay RT-PCR von *CMV-rtTA/Wt1-Resp1* Embryonen.

A: PCR-Genotypisierung der MEF aus den Embryonen E1-E11 Tag 12,5 *dpc* zur Identifizierung doppelt transgener Fibroblastenkulturen. Das *Wt1*-Transgen wurde mit den Oligonukleotiden mWt1-RT F2/pBI-6 (1020 bp) nachgewiesen. Das *rtTA*-Produkt (590 bp) wurde mit den Primern *rtTAi*/ii amplifiziert. Als Positivkontrolle (+) wurde die entsprechende DNA der Elterntiere eingesetzt. **B:** RT-PCR der dtg MEF-Ansätze von E9 +/-Dox. Als Negativ- und Leakage-Kontrolle diente die MEF-Kultur des stg E11/+Dox. Nachgewiesen wurde zunächst die *rtTA* cDNA (590 bp, *rtTAi*/ii). Darunter ist das Produkt für die *tgWt1* cDNA (460 bp, mWt1-RT F2/pBI-6) ausschließlich im E9/+Dox-Ansatz zu sehen. Ergänzend hierzu wurde zum Nachweis des alternativen Spleißens von Exon 9 eine PCR mit den Oligonukleotiden mWt1-Seq3/pBI-6 (745 bp) durchgeführt und das resultierende Produkt sequenziert (s. Abb. 3.11). Als Kontrolle für die eingesetzten cDNA-Mengen diente eine Aktin-spezifische RT-PCR (Oligonukleotide: musAktin A3/A5, 18 Amplifikationszyklen). (-): H₂O/Negativkontrolle; (M): Größenstandard 100bp-Marker; (RT+): Ansätze mit reverse Transkriptase; (RT-): Ansätze ohne reverse Transkriptase; Standardamplifikationszyklen: 35.

Die Ergebnisse zeigen eine stringente Induzierbarkeit der Linie *Wt1-Resp1* im MEF-Assay. Ausschließlich im Versuchsansatz mit Doxyzyklin exprimieren die doppelt transgenen (dtg) MEF (#E9) das *Wt1*-Transgen (Produktgröße: 460 bp). Eine weitere unter Verwendung der Primer mWT1-Seq 3/pBI-6 durchgeführte PCR (Produktgröße: 745 bp) erbrachte durch anschließende Sequenzierung des Produktes den Nachweis des alternativen Spleißens von Exon 9 des verwendeten *Wt1-Responder*-Konstruktes. Im Elektropherogramm wird die Verwendung der alternativen Spleißendonorstelle zur Generierung der +KTS bzw. -KTS *Wt1*-Isoformen deutlich (s. Abb. 3.11). Dies bestätigt eindeutig die Funktionalität der als Transgen injizierten chimären cDNA *mWt1*^{+Ex5, +/-KTS}.

Wt1-Resp2:**Abbildung 3.12: Ergebnisse des MEF-Assay der Mauslinie *Wt1-Resp2*.**

A: PCR-Genotypisierung der MEF-Kulturen E1-E7 aus der Verpaarung *Wt1-Resp2* x C57BL/6. Die positiven Kulturen (E4, E6) wurden mit *tgWt1*-spezifischen Oligonukleotiden (mWt1-RT F2/pBI-2, Produktgröße 380 bp) identifiziert. **B:** Die *Wt1-Resp2*-positive MEF-Kultur E6 wurde nach transienter Transfektion (*rtTA* 172-1) ohne und mit Dox (+/-Dox) kultiviert. Die RT-PCR mit *tgWt1*-spezifischen Oligonukleotiden (Wt1-MF/pBI-6, Produktgröße: 580 bp, 40 Zyklen) zeigt eine eindeutige Induktion des Transgens in der +Dox-Kultur. Zur Kontrolle wurde die *tgWt1*-negative Kultur E7 mit *rtTA* 172-1 und *pWt1-Resp2* co-transfiziert und ebenfalls unter Dox kultiviert. Die Pfeile indizieren die Produkte für *tgWt1* und Aktin. Als Kontrolle für die eingesetzten cDNA-Mengen diente eine Aktin-spezifische RT-PCR (Oligonukleotide: musAktin A3/A5, 18 Amplifikationszyklen).

(-): H₂O/Negativkontrolle; (M): Größenstandard 100bp-Marker; (RT+): Ansätze mit reverser Transkriptase; (RT-): Ansätze ohne reverse Transkriptase.

Zusätzlich zum Nachweis der Expression des Transgens auf RNA-Ebene wurde versucht, die Induzierbarkeit durch Fluoreszenzmikroskopie sichtbar zu machen. Die Verwendung von *EGFP* als Induktionsmarker in Dox-regulierbaren Fibroblasten ist in der Darstellung 3.13 abgebildet.

Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der MEF-Assay-Kulturen von *Wt1-Resp2* dokumentieren eine starke Fluoreszenz einzelner Zellen in den co-transfizierten Kontrollansätzen. Nur hier scheint die hervorgerufene Expressionsstärke von *EGFP* hoch genug zu sein, um optisch nachgewiesen zu werden. Wahrscheinlich ist die Menge des vom Transgenlokus exprimierten *EGFP* nicht ausreichend, um fluoreszenzmikroskopisch erfasst zu werden. Zur Darstellung der Dox-abhängigen Induktion mit *EGFP* als Induktionsmarker, scheint der MEF-Assay mit transienter Transfektion der Kulturen ungeeignet.

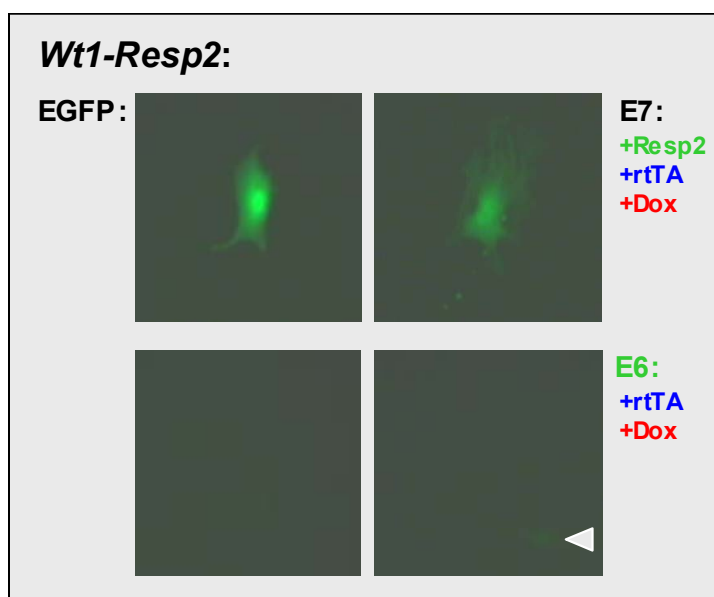


Abbildung 3.13: Fluoreszenzmikroskopie transient transfizierter MEF-Kulturen von *Wt1-Resp2*.

Die Aufnahmen dokumentieren *EGFP*-exprimierende Fibroblasten im Kontrollansatz (E7). Die mit *pWt1-Resp2* und *rtTA 172-1* co-transfizierten MEF zeigen eine Expression des *EGFP*-Induktionsmarkers aus dem *Responder*-Plasmid. Im Versuchsansatz (E6, MEF *Wt1-Resp2* positiv) mit *rtTA*-Transfektion und Dox-Induktion kann nur eine sehr schwache Expression (weißer Pfeil, mglw. Hintergrund) nachgewiesen werden.

3.1.5.3 Untersuchung der Induzierbarkeit der Linie *Wt1-Resp1* mit Effektor-Mäusen

Durch die Verbreitung der Anwendung des Tet-Systems im Mausmodell sind inzwischen verschiedene Effektor-Mäuse zur Beantwortung der unterschiedlichsten Fragestellungen generiert worden, so dass für eine Vielzahl von Geweben Effektor-Tiere (s. <http://www.zmg.uni-mainz.de/tetmouse/index.htm>) zur Verfügung stehen. Diese Tiere bieten die Möglichkeit, die eigenen *Responder* auf ihre Funktionalität *in vivo* zu testen. Je nach Verwendung von tTA oder rtTA als Effektor lässt sich die Induzierbarkeit durch Applikation (tTA) bzw. Entzug (rtTA) von Dox (s. Abb. 1.2) in den jeweils für die eingesetzten Promotoren spezifischen Geweben überprüfen. Für die Charakterisierung standen uns drei verschiedene Effektor-Mauslinien zur Verfügung. In Tabelle 3.1 sind die eingesetzten Linien systematisch aufgelistet und beschrieben. Die angegebenen Ursprungsplasmide (z. B. pUHG 17-1) informieren über die Generation der Effektoren und sind unbedingt als Sequenzgrundlage bei der PCR-Genotypisierung zu beachten (s. Urlinger *et al.* 2000)

Zur Verpaarung mit der Linie *Wt1-Resp1* und der folgenden Analyse wurden die bereits erwähnten *CMV-rtTA* Mäuse verwendet, die den *rtTA* unter der Kontrolle eines *CMV*-Promotors ubiquitär exprimieren. Zwei weitere Linien wurden ebenfalls mit den *Wt1-Resp1* Mäusen verpaart. *Fabp-rtTA* Tiere exprimieren den Transaktivator unter Kontrolle

eines modifizierten, aus der Ratte stammenden *fatty acid binding protein*-Promotors in verschiedenen Regionen des Darmes, mit Ausnahme des Duodenums (Saam *et al.* 1999). Des Weiteren wurden *LAP-tTA* Mäuse verwendet, die unter der Kontrolle des *LAP*-Promotors der Ratte [Promotor des *liver enriched activator protein* (C/EBP β)-Transkriptionsfaktors in der Leber] den *tTA* exprimieren (Kistner *et al.* 1996).

LINIE	PROMOTOR	GEWEBE	EFFEKTOR	PUBLIKATION
<i>CMV-rtTA</i>	CMV Cytomegalievirus	ubiquitär	rtTA pUHG 17-1	Kistner <i>et al.</i> 1996
<i>Fabp-rtTA</i>	<i>Fabpl</i> ^{4xat-132} (fatty acid binding protein)	Darm Blase	rtTA pUHG 17-1	Saam <i>et al.</i> 1999
<i>LAP-tTA</i>	rLAP (liver enriched activator protein)	Leber Niere	tTA pUHG 15-1	Kistner <i>et al.</i> 1996 Gallagher <i>et al.</i> 2003

Tabelle 3.1: Effektor-Mäuse.

Aufgelistet sind die für die Charakterisierung der *Responder*-Linie *Wt1-Resp1* verwendeten Effektor-Mauslinien mit ihren Promotoren bzw. der verwendeten Transkriptionseinheit, den integrierten Effektoren und ihrer Gewebespezifität. Neben der Art des Effektors tTA/rtTA sind auch die Ursprungsplasmide angegeben, die Auskunft über die Effektor-Generation geben.

In Zusammenarbeit mit den Arbeitsgruppen Sahin/Türeci und Bockamp (beide Universität Mainz) wurden, zur Kontrolle der in der Literatur beschriebenen Expressionsorte der Transgene, die Expressionsstärken in den Organen der in unseren Arbeitsgruppen vorhandenen und eingesetzten Effektor-Mauslinien durch quantitative *real time* PCRs überprüft. Hierzu wurde RNA aus Leber, Thymus, Niere, Milz, Knochenmark, Gehirn, Duodenum und Kolon der Effektor-Mäuse präpariert, revers transkribiert und im *Taq Man* (Fa. ABI) quantifiziert. Die Ergebnisse der Linien *CMV-rtTA*, *Fabp-rtTA* und *LAP-tTA* sind in Abbildung 3.14 zu sehen.

Nach der Verpaarung der *Responder*-Linie *Wt1-Resp1* mit den unten aufgeführten Effektor-Mauslinien wurden die Nachkommen mittels PCR und Dot Blot genotypisiert. Doppelt transgenen Tieren (Effektor/*Wt1-Resp1*) wurde daraufhin zwei Wochen lang Dox im Trinkwasser appliziert (4 mg/ml Dox, 5 % Sucrose). Anschließend wurden die Gewebe Leber (L), Darm (D) und Niere (N) entnommen, daraus RNA extrahiert und diese in RT-PCR Experimenten auf eine induzierbare transgene *Wt1*-Expression untersucht. Als Kontrolle dienten doppelt transgene Tiere, denen kein Dox verabreicht wurde.

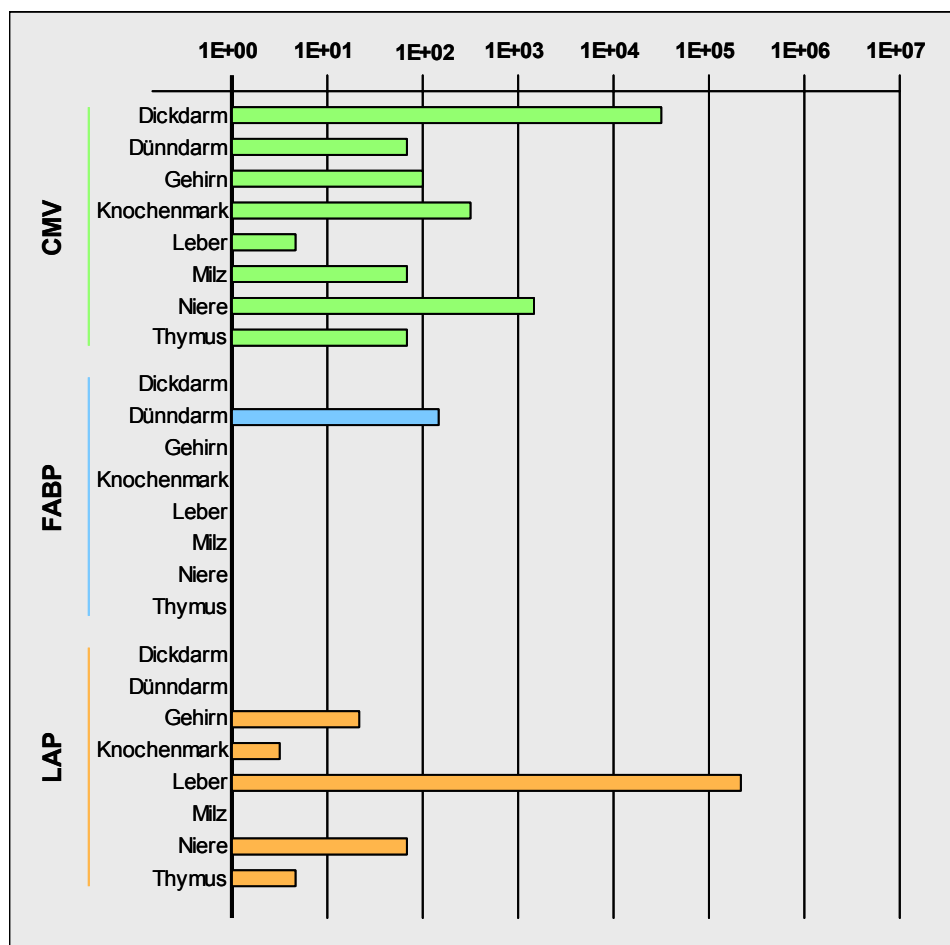


Abbildung 3.14: Expressionsstärken der (rt)TA-Transgene in den Effektor-Mäusen.

Die Expressionsstärken der Transaktivatoren in den untersuchten Geweben sind logarithmisch dargestellt. Die *CMV-rtTA* Effektor-Linie exprimiert den *rtTA* ubiquitär, aber in sehr unterschiedlichen Stärken. Die *Fabp-rtTA* Mäuse zeigen im Gegensatz zur Publikation (Dünndarm und Kolon), ausschließlich eine Expression im Dünndarm. Die Quantifizierung der Expression im Gewebe aus *LAP-tTA* Tieren ergab eine sehr starke Expression des *tTA* in der Leber und zusätzlich eine schwächere in den Organen Niere und Gehirn, Knochenmark und Thymus.

In Abbildung 3.15 und 3.16 sind die Ergebnisse der Untersuchungen von Tieren der Verpaarungen mit *CMV-rtTA* und *LAP-tTA* Mäusen dargestellt. Die Versuche mit den *Fabp-rtTA* Effektor-Tieren wurden nach mehreren vergeblichen Anläufen und nicht reproduzierbaren Ergebnissen auch im Hinblick auf die Expressionsunterschiede zwischen unseren Experimenten (s. Abb. 3.14) und der sie charakterisierenden Publikation wieder eingestellt.

In den Versuchen der *CMV-rtTA/Wt1-Resp1* Verpaarungen konnte zunächst die *rtTA*-Expression in den Geweben unabhängig von der Dox-Applikation gezeigt werden (s. Abb. 3.15). Dagegen konnte eine Induzierbarkeit, trotz anderer Erwartungen aus den Vorversuchen für den ubiquitär wirkenden *CMV*-Promotor, für das *tgWt1* nur in der Niere der Tiere nachgewiesen werden. Leber und Darm zeigen keine Produkte. Die schwächere

Bande im -Dox-Ansatz der Niere deutet eine möglicherweise nicht stringente Regulierbarkeit der *tgWt1*-Expression an.

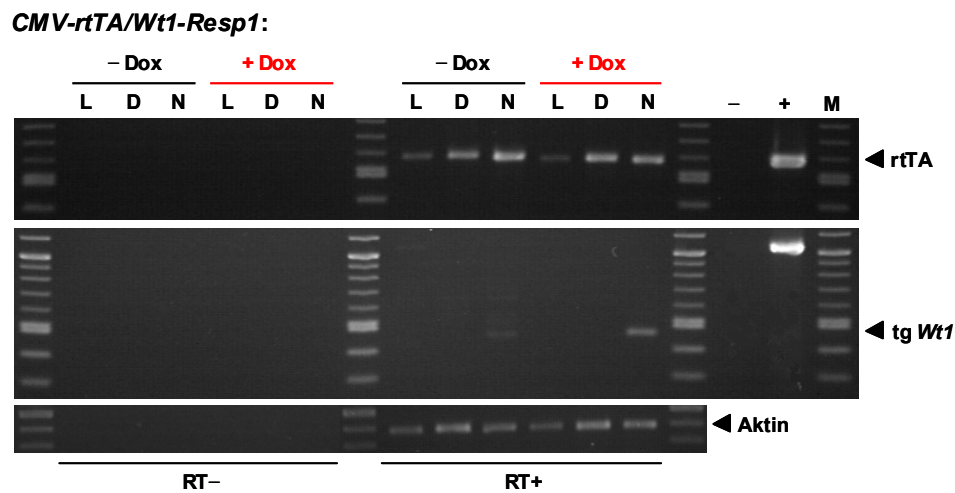


Abbildung 3.15: Untersuchung der Induzierbarkeit von *CMV-rtTA/Wt1-Resp1*-Mäusen.

Den Tieren wurde nach zweiwöchiger Dox-Applikation Leber (L), Darm (D) und Niere (N) entnommen, daraus RNA präpariert und mittels RT-PCR die induzierbare Expression des Transgens überprüft. Die PCR wurde mit *tgWt1*-spezifischen Oligonukleotiden (mWt1-RT F2/pBI-6, Produktgröße: 460 bp, 35 Zyklen) durchgeführt. Die Pfeile markieren die entsprechenden Produkte. Die *rtTA*-Amplifikation wurde mit den Oligonukleotiden rTAi/ii (Produkt: 590 bp, 35 Zyklen) durchgeführt. Als Positivkontrolle (+) wurde die entsprechende DNA der Elterntiere eingesetzt. Als Kontrolle für die eingesetzten cDNA-Mengen diente eine Aktin-spezifische RT-PCR (Oligonukleotide: musAktin A3/A5, 18 Amplifikationszyklen).

(-): H₂O/Negativkontrolle; (M): Größenstandard 100bp-Marker; (RT+): Ansätze mit reverser Transkriptase; (RT-): Ansätze ohne reverse Transkriptase.

Der Versuchsansatz mit doppelt transgenen *LAP-tTA/Wt1-Resp1* Mäusen zeigt eine stringente Regulierbarkeit des *Wt1-Resp1* Transgens in der Leber der Tiere ohne Dox-Applikation (s. Abb. 3.16).

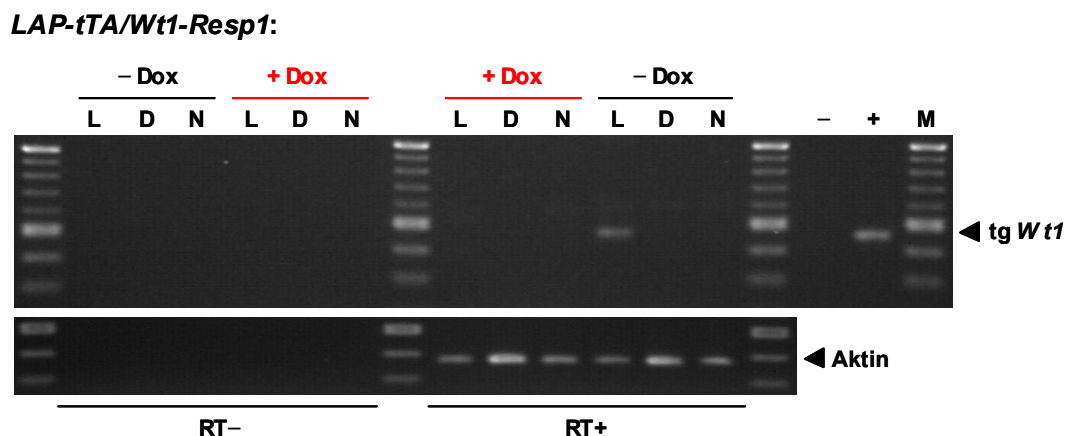


Abbildung 3.16: Untersuchung der Induzierbarkeit von *LAP-tTA/Wt1-Resp1*-Mäusen.

Versuchsablauf wie in Abb. 3.15 bereits beschrieben. Der Nachweis für *tgWt1* wurde mit spezifischen Oligonukleotiden geführt (mWt1-RT F2/pBI-6, Produktgröße: 460 bp, 35 Zyklen). Deutlich ist die Expression von *tgWt1* in der Leber von *LAP-tTA/Wt1-Resp1* (-Dox)-Tieren zu sehen. Als Positivkontrolle wurde die RNA des MEF-Assay *CMV-rtTA/Wt1-Resp1* #E9 +Dox eingesetzt. Als Abgleich für die eingesetzten RNA Mengen diente eine entsprechende Aktin-PCR (Oligonukleotide: musAktin A3/A5, Produktgröße: 380 bp, 18 Zyklen).

(-): H₂O/Negativkontrolle; (M): Größenstandard 100bp-Marker; (RT+): Ansätze mit reverser Transkriptase; (RT-): Ansätze ohne reverse Transkriptase.

Deutlich abgeschaltet dagegen ist die Expression in den Mäusen mit Doxyzyklingabe. Trotz gezeigter *tTA*-Expression in der Niere der *LAP*-Tiere (s. Abb. 3.14), konnte in diesem Organ kein Produkt für das *Wt1*-Transgen nachgewiesen werden. Ein Grund hierfür ist möglicherweise die um ein vielfaches schwächere Expressionsstärke (Faktor 1000) des unter der Kontrolle des leberspezifischen *LAP*-Promotors stehenden *tTA* in der Niere. Die Ergebnisse bestätigen die Resultate aus den MEF-Assays für die Linie *Wt1-Resp1* als Dox-abhängig regulierbarem *Responder*.

Beide *Responder*-Linien wurden mittels Embryotransfer in die SPF-Haltung der ZVTE der Universität Mainz überführt (s. o.) und für die Verpaarung mit *Wt1-tTA* Effektor-Mäusen bereitgehalten. Diese Paarungen konnten erst nach dem zehnten *Backcross* der *Responder*-Linien mit C57BL/6-Mäusen angesetzt werden. Zu diesem Zeitpunkt befanden sich die transgenen *Responder*-Mauslinien in der vierzehnten Generation seit ihrer Herstellung.

3.2 Effektor-Mäuse (*Wt1-tTA*^{+/-})

3.2.1 Generierung von *k.o./k.i.*-Mäusen

Die zielgerichtete Veränderung des murinen Genoms, z. B. die Inaktivierung eines Gens bei der Herstellung von *k.o.*- oder *k.i.*-Mäusen mittels homologer Rekombination, wird im Englischen als *gene targeting* bezeichnet. Im Gegensatz zur Generierung transgener Tiere durch Mikroinjektion von DNA in die Vorkerne befruchteter Eizellen (s. *Responder*-Mäuse), bei der das Konstrukt an einer nicht vorhersehbaren Stelle des Genoms integriert, handelt es sich bei der homologen Rekombination um einen zielgerichteten, sequenzspezifischen Austausch (Schenkel 1995, Old & Primrose 1994). Mit Hilfe der zellulären Rekombinationsmaschinerie wird ein modifiziertes Gen als Teil eines sog. *targeting construct* homolog mit seinem chromosomalen Gegenstück ausgetauscht und die Modifikation so ins Genom eingeführt. Eine solche Rekombination findet in etwa einer von 10^5 bis 10^9 Zellen statt und ist damit relativ selten. Dabei beeinflusst die Länge der homologen Sequenzen von Konstrukt-DNA und Ziel-DNA erheblich die Rekombinationsfrequenz. Zur Anreicherung rekombinierter Klone werden bei der Herstellung von *Targeting*-Konstrukten positive und negative Selektionsmarker eingesetzt. Die Insertion einer *Neomycin*-Resistenzkassette (*NeoR*, codiert für das Enzym Neomycinphosphotransferase) befähigt bei Integration des Konstruktes die rekombinierten ES-Zellklone zum Wachstum unter dem Selektionsdruck des

Antibiotikums Genetigin (G418, positive Selektion). Das Anfügen einer Expressionskassette für die *Herpes simplex*-Thymidinkinase (HSV-Tk), die bei homologer Integration abgetrennt wird, bewirkt durch ihre Anwesenheit in nicht korrekt rekombinierten Klonen bei Zugabe von Gancyclovir (Ganc) ins Nährmedium den Tod dieser Zellen (negative Selektion, s. Abb. 3.17).

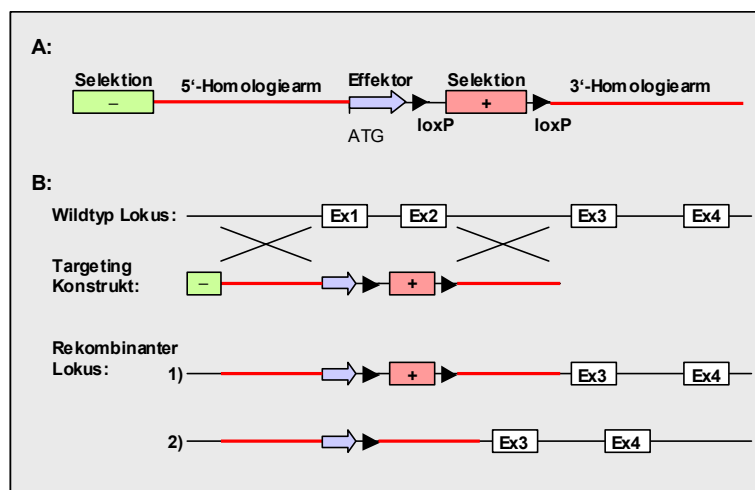


Abbildung 3.17: Schema zur Modifikation eines Gen-Lokus mit Hilfe von homologer Rekombination.

A: Bestandteile eines Effektor/Targeting-Konstruktes als Grundlage der Modifikation eines fiktiven Gen-Lokus. **B:** Homologe Rekombination am Beispiel eines fiktiven Locus. Im Wildtyp-Locus wird Exon 1 und 2 durch einen Effektor mittels homologer Rekombination ersetzt (B oben). Darunter ist der rekombinante Locus vor (1) und nach (2) der Exzision des positiven Selektionsmarkers durch die Cre-Rekombinase abgebildet (verändert nach Bockamp *et al.* 2002).

(-): Kassette zur negativen Selektion (z. B. HSV-Tk); (+): Kassette zur positiven Selektion der rekombinanten ES-Zellklone (z. B. *NeoR*); Pfeilspitzen (schwarz): *loxP*-Sequenzen zur Exzision des Selektionsmarkers mittels Cre-Rekombinase; Rot: Homologiearme (HA), Sequenzen für die homologe Rekombination in den Ziel-Locus; Blockpfeil (blau): Effektor (z. B. *rtTA*).

Für die angewandte Methode müssen ES-Zellen mit dem entsprechenden Konstrukt transfiziert, die Klone expandiert und anschließend die gewünschte Rekombination verifiziert werden. Positiv getestete ES-Zellklone werden zur Generierung chimärer Mäuse in Blastozysten injiziert. Nach der Passage durch die Keimbahn dieser Tiere wird das modifizierte Gen dann in den daraus resultierenden *k.o./k.i.*-Mäusen nachgewiesen (s. Abb. 3.18).

Von Vorteil ist es, wenn das zu inaktivierende Gen bereits gut vorcharakterisiert ist und neben ausreichend vorhandenen Sequenzdaten auch das Genprodukt analysierbar ist. Bei der Herstellung der ursprünglichen, konstitutionalen *k.o.*-Mäuse wurden deshalb funktionell wichtige Teile eines Gens als Ziel (*target*) der homologen Rekombination gewählt und diese durch sogenannte positive Selektionsmarker (z. B. *NeoR*) ersetzt, um eine Inaktivierung des Zielgens zu erreichen. Die neueren konditionalen Modelle machen sich die bewährten technischen Möglichkeiten zu Nutze, ersetzen (*k.i.*) aber das

endogene Gen durch einen Transaktivator (Effektor) am Ziellokus. Durch die dort endogen vorhandenen Regulationselemente (*Enhancer*, Promotor) resultiert eine zeitlich und räumlich, genspezifische Expression des Effektors als Grundlage induzierbarer Modelle. Dies geschieht bei gleichzeitiger Inaktivierung (*k.o.*) des Zielgens durch die herbeigeführte Exzision wichtiger Elemente durch die Sequenzen des Transaktivators (s. ebenfalls Abb. 3.17).

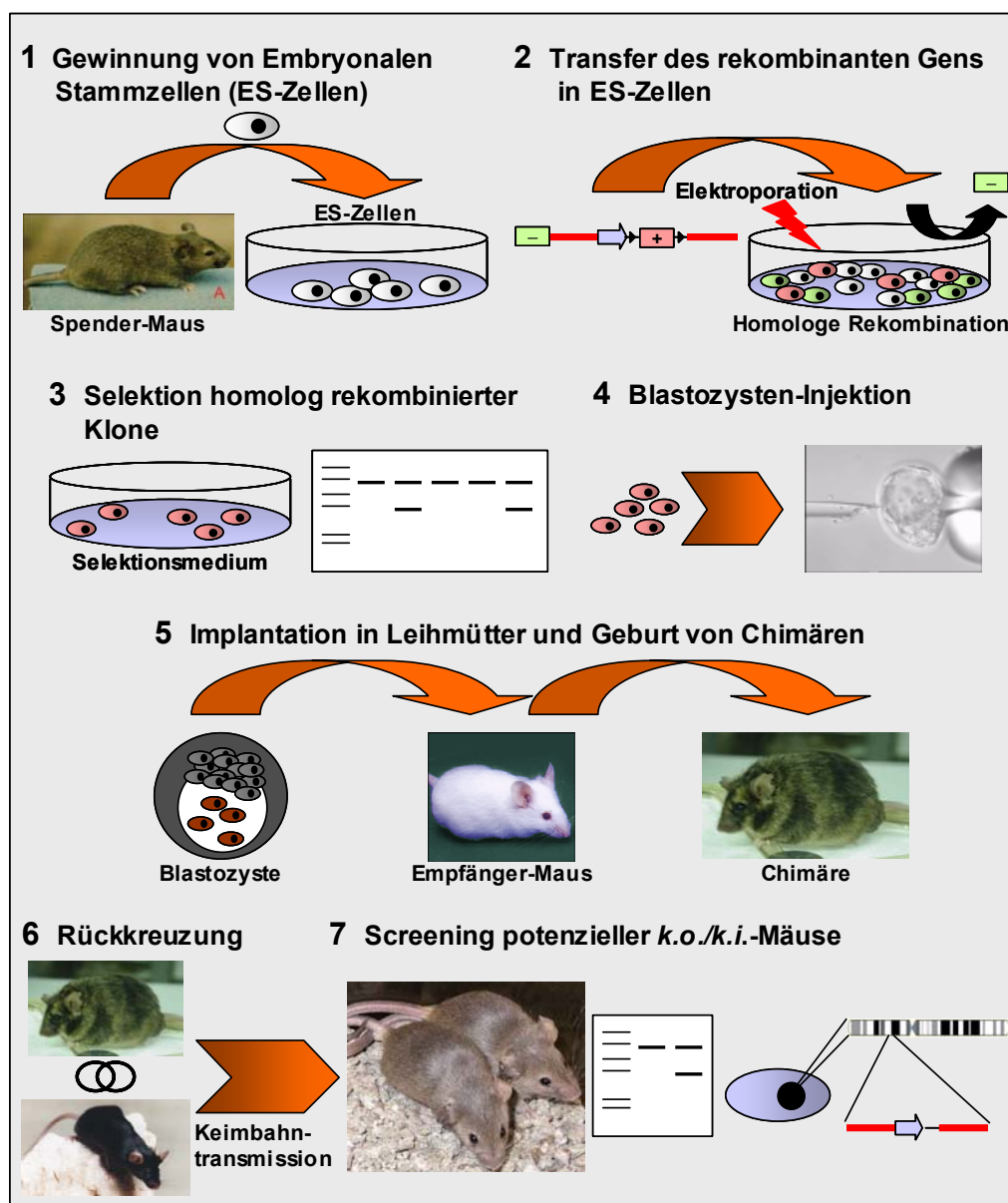


Abbildung 3.18: Herstellungsprinzip von *k.o./k.i.*-Mäusen.

1. Gewinnung der ES-Zellen aus einer Agouti-farbenen Spender-Maus und Kultivierung im Nährmedium. 2. Transfer des veränderten (rekombinanten) Gens in ES-Zellen mittels Elektroporation. Die Integration am Ziellokus erfolgt durch homologe Rekombination. 3. Selektion der transfizierten Zellen (Nährmedium mit G418 und Ganzyclovir) und Analyse der resistenten Klone auf homologe Integration des Konstruktes. 4. Injektion homolog rekombinierter Klone in Blastozysten von schwarzen Mäusen. 5. Implantation der Blastozysten in scheinchwangere Leihmütter und Geburt der genetisch veränderten chimären Tiere. 6. Rückkreuzung hochchimärer Böcke mit C57Bl/6-Mäusen. Bei einer Keimbahntransmission der veränderten ES-Zellen setzt sich das dominante Agouti-Allel in einigen Nachkommen durch und dient als Marker für potenzielle *k.o./k.i.*-Mäuse. 7. Agouti-Mäuse werden zum Nachweis der Integration des *Targeting*-Konstruktes untersucht. Positiv getestete Tiere tragen in allen Zellen die eingeführte Veränderung und werden als *k.o./k.i.*-Mäuse bezeichnet.

3.2.2 Herstellung der Effektor-Konstrukte

Für die Effektor-Linie zur Herstellung einer konditionalen, reversiblen *Wt1* k.o.-Maus musste ein *Targeting*-Konstrukt generiert werden, das als Effektor einen (reversen) tetrazyklinabhängigen Transaktivator (*rtTA* bzw. *tTA*) durch homologe Rekombination direkt unter die Kontrolle des *Wt1*-Promotors bringt [heterozygoter (*rtTA* knock in/*Wt1* knock out, s. Abb. 3.19)]. Dies sollte die *Wt1*-spezifische Expression von (*rtTA*) an Stelle von *Wt1* gewährleisten.

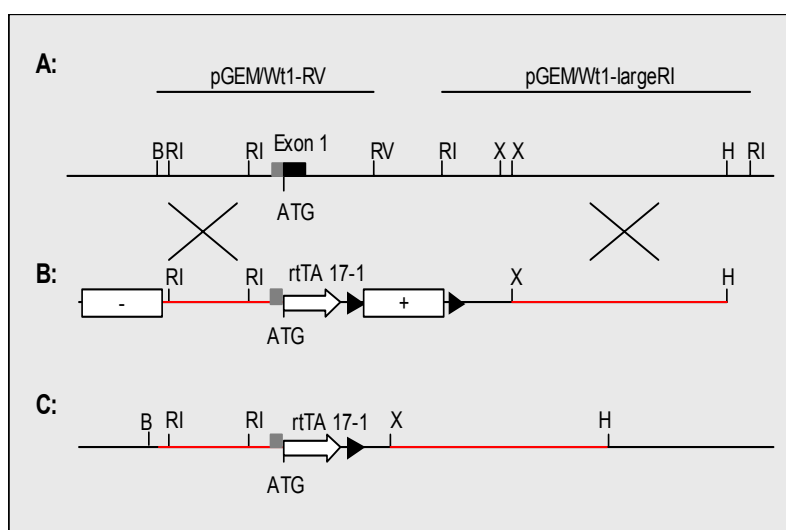


Abbildung 3.19: *Wt1*-Lokus (nach Kreidberg).

A: Zeigt den Zustand des *Wt1*-Lokus aufgrund der Publikation von Kreidberg *et al.* 1993. Darüber sind die uns überlassenen Plasmide (pGEM/*Wt1*-RV und pGEM/*Wt1*-largeRI) zur Generierung der Homologiearme abgebildet.

B: Darstellung des *Targeting*-Konstruktes *Wt1-targ1*. (-): Negative Selektion/HSV-Tk; Effektor: *rtTA* 17-1; (+): geflochte *Neomycin*-Resistenzkassette (positive Selektion); *loxP*-Sequenzen: schwarze Pfeile; Homologiearme: rot. Das Exon 1 von *Wt1* ist geteilt grau/schwarz (ab Translationsstartpunkt, ATG) abgebildet.

C: Rekombinanter *Wt1*-Lokus (*rtTA* knock in/*Wt1*-knock out). Restriktionsschnittstellen: B=*Bgl*II; H=*Hpa*I; RI=*Eco*RI; RV=*Eco*RV; X=*Xho*I.

Zur Klonierung des Effektor-Konstruktes wurden uns von Dr. J. Pelletier (McGill Cancer Center, Montreal/Kanada) freundlicherweise genomische Klone der *Wt1*-Region zur Verfügung gestellt, die bei der Herstellung der konstitutionalen *Wt1* k.o.-Maus verwendet wurden (Kreidberg *et al.* 1993). Alle Arbeiten zur Erzeugung der k.o.-Mäuse (Kultivierung und Elektroporation der ES-Zellen, Blastozysteninjektion, sowie Generierung der Chimären) wurden in der Arbeitsgruppe von Dr. E. Bockamp (Institut für Toxikologie, Universität Mainz) von Frau R. Heck und Dr. L. Eshkind durchgeführt.

3.2.3 Effektor-Konstrukt *Wt1-targ1*

Für den ersten Anlauf zur Herstellung des *Wt1-Targeting*/Effektor-Konstruktes (*Wt1-targ1*) wurden die vorliegenden *Wt1*-Sequenzen in der korrekten Orientierung in einem Plasmid pGEM-11Zf+ der Firma Promega vereinigt. Die funktionalen Teile des Effektors *rtTA* 17-1 (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. H. Bujard, ZMBH Heidelberg; Kistner *et al.* 1996), sowie eine von *loxP*-Sequenzen flankierte positive

Selektionskassette (*Neo^{fllox}*, *flanked by loxP sites*) sollten mittels einer innovativen Rekombinationsmethode zur Vermeidung der beschränkten, vorgegebenen Restriktionsschnittstellen in das Plasmid eingebracht werden. Das sog. *ET-Cloning* nutzt die Eigenschaften der Rekombinasen RecE und RecT aus *E. coli* zur sequenzspezifischen Rekombination aufgrund relativ kurzer (~ 40-75 Nukleotide), als Oligonukleotide synthetisierte Homologiearme (Zhang *et al.* 1998, Angrand *et al.* 1999). Hiermit wurden *rtTA* und *Neo*-Kassette amplifiziert und sollten durch die Verwendung *Wt1*-spezifischer Sequenzen direkt an die Stelle des *Wt1*-Translationsstartpunkt (ATG) platziert werden. Trotz vielfältiger Versuche und Bemühungen konnte diese Methode nicht etabliert werden.

Die sich anschließende konventionelle Klonierungsstrategie führte zur Herstellung des *Targeting*-Konstruktes *Wt1-targ1* (s. Abb. 3.19 B). Hiermit wurden ES-Zellen transformiert und die daraus resultierenden 1100 potenziell homolog rekombinierten Klone mittels Restriktionsverdau und *Southern Blot* analysiert. Lediglich ein zunächst als positiv identifizierter Klon ging hieraus hervor. Dieser zeigte allerdings bei der Analyse des Restriktionsverdaus eine unerwartete Produktgröße im rekombinierten 3'-Bereich. Aus der trotzdem durchgeführten Blastozysteninjektion resultierten zwar Chimären, die jedoch keine Weitergabe des rekombinanten Lokus an ihre Nachkommen zeigten.

Aufmerksam geworden durch die mangelnde Rekombinationsfrequenz trotz verwendeter Selektionsmarker sowie abweichende Verdauemuster wurde eine erneute Datenbankanalyse zur Klärung der Organisation des murinen *Wt1*-Lokus vorgenommen.

3.2.4 Datenbankanalysen zur Aufklärung des murinen *Wt1*-Lokus

Für die Aufklärung der Organisation des murinen *Wt1*-Lokus wurden zunächst die Sequenzdaten aus unseren eigenen Sequenzierungen der von Dr. J. Pelletier zur Verfügung gestellten Plasmide mit den Daten von *Celera Genomics* verglichen. Die neuen Sequenzdaten wurden dann den bis dahin veröffentlichten Sequenzen der NCBI-Datenbank gegenübergestellt. In der resultierenden Konsensus-Sequenz wurden die *Wt1* Exons 1-10 identifiziert. Es konnte ein zusammenhängendes ~ 54 kb umfassendes Contig erstellt werden, das den kompletten murinen *Wt1*-Lokus überspannt. Eine nahezu zeitgleich erschienene Veröffentlichung von Gong *et al.* 2001 bestätigte diese Ergebnisse. Es konnte gezeigt werden, dass der von Kreidberg *et al.* 1993 publizierte Zustand des *Wt1*-Lokus nach etwa drei Kilobasen 3' von Exon 1 gelegen nicht mit den neuen Erkenntnissen übereinstimmt (s. Abb. 3.20). Dadurch wurde deutlich, dass das uns zur Generierung des 3'-Homologiearmes vorliegende Plasmid pGEM/*Wt1*-largeRI nur bis etwa 800 bp nach der zweiten *XhoI* Restriktionsschnittstelle (s. Abb. 3.19) tatsächlich

Wt1-Sequenzen enthält. Die Herkunft der folgenden etwa 5,5 kb des Homologiearmes von *Wt1-targ1*, die für die Rekombination geplant waren, konnte nicht geklärt werden, standen aber für eine homologe Rekombination natürlich nicht zur Verfügung, was die niedrige Rekombinationsfrequenz des *Wt1-targ1* Konstruktes erklären könnte.

3.2.5 Generierung des Effektor-Konstruktes *Wt1-targ2*

Aufgrund der o. g. Erfahrungen wurden für die Herstellung des zweiten *Targeting*-Konstruktes (*Wt1-targ2*) einige Veränderungen vorgenommen. Zunächst wurde als Effektor eine neue tTA-Variante gewählt (pUHT 61-1, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. H. Bujard, ZMBH Heidelberg; Urlinger *et al.* 2000), die eine Dox-Administration erst zum Abschalten des Transgens (*tet off*) notwendig macht. Die verbesserten Eigenschaften im Vergleich zu den älteren Transaktivatoren, wie die Reduktion intrazellulärer Toxizität, eine erhöhte Dox-Sensitivität und eine deutlich verbesserte Aktivierungskinetik wurden bereits erwähnt (s. Kap. 1.2). Alle Komponenten (*tTA⁶¹⁻¹*, *Neo^{flox}*, 3'*Wt1*-HA), mit Ausnahme des 5'*Wt1*-HA wurden mittels *Expand-PCR* amplifiziert. Die verwendeten Oligonukleotide wurden so modifiziert, dass sie die notwendigen Restriktionsschnittstellen für die Ligation in das Effektor-Plasmid als Anhänge mit einbringen. Als Träger wurde erneut der Vektor pGEM-11Zf+ der Firma Promega gewählt. Die Abbildung 3.20 zeigt den Zustand des *Wt1*-Lokus im für die homologe Rekombination des Effektor-Konstruktes notwendigen Bereich.

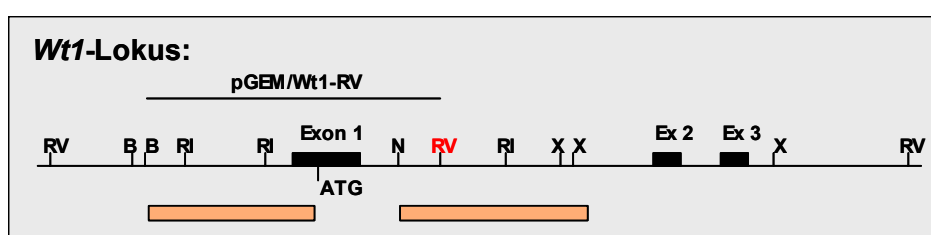


Abbildung 3.20: Muriner *Wt1*-Lokus.

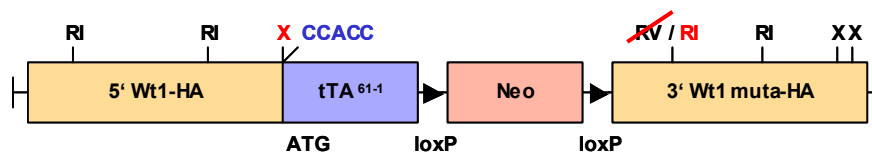
Der schematisch gezeigte Bereich umfasst etwa 18 kb. Alle zur Orientierung notwendigen Restriktionsschnittstellen sind angegeben. *Wt1* Exon 1-3 sind als schwarze Rechtecke abgebildet. *Wt1*-spezifische Sequenzen des für die Generierung des 5'*Wt1*-Homologiearmes eingesetzten Plasmids sind darüber, die Bereiche der verwendeten HAs für *Wt1-targ2* darunter (orange) dargestellt. B: *Bgl*II, RI: *Eco*RI, RV: *Eco*RV, N: *Nsi*I, X: *Xho*I.

Zunächst wurde in die uns zur Verfügung gestellte 5' *Wt1*-Sequenz (pGEM/*Wt1*-RV) mittels Mutagenese (XL Mutagenese-Kit, Fa. Stratagene) an der Position -15 vom *Wt1*-Translationsstartpunkt (ATG) eine *Xho*I-Restriktionsschnittstelle eingeführt (tcc gag zu ctc gag). Anschließend wurde das Plasmid mit den Endonukleasen *Sfi*I und *Xho*I

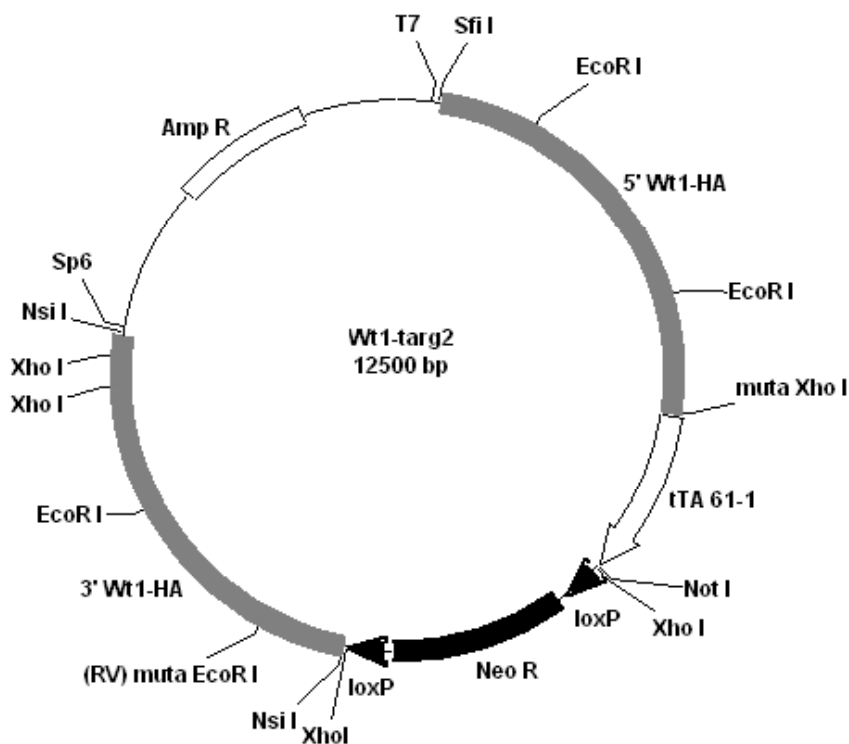
restringiert, das 3,4 kb große Produkt 5'*Wt1*-HA isoliert und in einen mit den gleichen Enzymen linearisierten pGEM-Vektor ligiert. Die notwendigen Sequenzinformationen für die Mutagenese wurden der Publikation von Pelletier *et al.* 1991 entnommen.

Der einzusetzende Effektor *tTA*⁶¹⁻¹ wurde auf Grundlage des Plasmids pUHT61-1 so amplifiziert, dass an den Produktenden die Schnittstellen der Restriktionsenzyme *Xho*I (5'-Ende) und *Not*I (3'-Ende) angefügt wurden. Zusätzlich wurde im 5'-Bereich vor das ATG des Transaktivators eine optimierte Kozak-Sequenz (cc a cc) zur Verbesserung der Translation der *tTA*-mRNA eingeführt (Kozak 1991). Hierdurch wurde gleichfalls der 5'-gelegene alternative *Wt1*-Transkriptionsstartpunkt (CTG) aus dem Leserahmen verschoben. Das *tTA Expand-PCR* Produkt (1,2 kb) wurde zunächst mittels der überhängenden A-Enden in einen T-Vektor (pCR II TOPO der Fa. Invitrogen) ligiert, durch eine *Xho*I/*Not*I-Restriktion wieder entnommen und in den gleichartig geöffneten Vektor pGEM/5'*Wt1*-HA überführt. Das entstandene Plasmid wurde mit einem kombinierten *Not*I/*Nsi*I-Verdau für die Aufnahme der *Neo*^{fl^{ox}}-Kassette vorbereitet. Diese wurde ebenfalls mittels *Expand-PCR* auf Grundlage eines Plasmides (#1268 *rtTA*17-1 aus der Arbeitsgruppe von Dr. E. Bockamp) amplifiziert und in den bereits erwähnten pCR II TOPO-Vektor kloniert. Durch die artifiziell angefügten *Not*I (5' Ende)- und *Nsi*I (3' Ende)-Restriktionsschnittstellen konnte das Produkt (1,4 kb) mit der entsprechenden Restriktion wieder freigesetzt und in den vorbereiteten pGEM/5'*Wt1*-HA/*tTA*-Vektor ligiert werden. Als letzte Komponente des Konstruktes wurde der 3'*Wt1*-HA in das Plasmid eingefügt. Hierfür wurde ein ~ 3,3 kb großes Produkt auf ES-Zell-DNA (Mausstamm 129), welches ca. 800 bp 3' vom *Wt1*-ATG entfernt liegt, mit den Oligonukleotiden xxx-*Nsi* 3'hom-FOR/xxx-*Nsi* 3'hom-REV amplifiziert und in den o. g. T-Vektor ligiert. Dabei wurde der Sense-Primer über eine endogen im *Wt1*-Lokus vorhandene *Nsi*I-Schnittstelle gelegt, um diese für die nachfolgende Ligation zu nutzen. Anschließend wurde zuerst die in Abbildung 3.20 rot markierte *Eco*RV-Restriktionsschnittstelle in eine *Eco*RI-Erkennungssequenz durch *in vitro*-Mutagenese umgewandelt, um eine spätere Identifizierung der Integration in homolog rekombinierten ES-Zellen mit einem geeigneten Restriktionsverdau und der Hybridisierung mit einer radioaktiven Sonde in *Southern Blot*-Analysen zu erleichtern. Der mutagenisierte 3'*Wt1*-mut^a-HA wurde mit einem *Nsi*I-Verdau aus dem TOPO-Vektor isoliert und in das entsprechend linearisierte Zielplasmid ligiert.

Das so generierte Effektor-Konstrukt pGEM/5'*Wt1*-HA/*tTA*⁶²⁻¹/*Neo*^{fl^{ox}}/3'*Wt1*-mut^a-HA wurde als ***Wt1-targ2*** bezeichnet. Dieses Konstrukt ist in den Abbildungen 3. 21 und 3. 22 ausführlich dargestellt.

Wt1-targ2:**Abbildung 3.21: Effektor/ Targeting-Konstrukt Wt1-targ2.**

Dargestellt ist der Aufbau des Effektor-Konstruktes *Wt1-targ2*. Die beiden Homologiearme 5'*Wt1*-HA (3,4 kb Länge) und 3'*Wt1* muta-HA (3,3 kb Länge) sind orange unterlegt. Der offene Leserahmen des verwendeten Effektor *tTA*⁶¹⁻¹ (blau) ist direkt an die Stelle des *Wt1*-Translationsstartpunkt (ATG) gesetzt worden. Die *Neomycin* (*NeoR*)-Resistenzkassette (rot) zur positiven Selektion rekombinanter ES-Klone ist von *loxP*-Sequenzen (schwarze Pfeilspitzen) flankiert. Für die Orientierung hilfreiche Restriktionsschnittstellen sind schwarz, die durch Mutagenese eingefügten rot dargestellt. Die für die Translation des *tTA* eingebrachte optimierte Kozak-Sequenz (ccacc) ist in blau gezeigt. RI: *EcoRI*, RV: *EcoRV*, X: *XhoI*.

**Abbildung 3.22: Wt1-targ2 Plasmidkarte.**

Das Plasmid *Wt1-targ2* hat eine Gesamtgröße von 12,5 kb. Es wurden alle wichtigen Komponenten aufgeführt. Die 5' (3,4 kb) und 3' (3,3 kb) *Wt1*-HAe sind grau abgebildet. Das Insert kann mit T7 und Sp6 Oligonukleotiden ansequenziert werden. Alle anderen Übergänge wurden durch Sequenzierung mit entsprechenden Primern verifiziert. Das Plasmid wurde zusätzlich mittels Restriktionsverdau (aufgeführte Schnittstellen z. B. *XhoI* und *NsiI*) überprüft. Für die Elektroporation in ES-Zellen wurde mit einem *SfiI*-Verdau linearisiert.

Weißer Pfeil: *tTA*⁶¹⁻¹ (1,2 kb); schwarze Pfeilspitzen: *loxP*-Sequenzen; *NeoR* (schwarz): *Neomycin*-Resistenzkassette zur Selektion der ES-Klone; AmpR (weiß): Ampicillin-Resistenz für die Bakterienselektion.

Zur Verifizierung wurde das Plasmid mit verschiedenen Restriktionsverdaus (*EcoRI*, *XbaI*, *XhoI*, *NsiI*) überprüft. Alle Übergänge der durch die Ligationen aneinander gefügten Bestandteile des Effektor-Konstruktes wurden mittels PCR unter Verwendung geeigneter

Oligonukleotide (s. Kap. 2.6) amplifiziert und sowohl die PCR-Produkte, als auch das Plasmid direkt sequenziert. Der *tTA*-Effektor wurde komplett sequenziert um eventuell aufgetretene Mutationen auszuschließen. Für die Elektroporation in W9.5 ES-Zellen wurde *Wt1-targ2* Plasmid-DNA mit einem *Endotoxin free* Plasmid-Präparationskit der Fa. Qiagen präpariert und mit einem *Sfi*I-Restriktionsverdau linearisiert. Die Aufreinigung erfolgte über eine Agarose-Gelelektrophorese mit anschließender Gel-Elution. Die linearisierte Konstrukt-DNA wurde präzipitiert, dreimal mit sterilem 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in sterilem Wasser der Fa. Braun (Konzentration 1 µg/µl) gelöst und anschließend für die Transfektion an die Arbeitsgruppe Bockamp übergeben.

3.2.6 Identifizierung homolog rekombinierter ES-Zellklone

Die Transfektion der W9.5 ES-Zellen (Szabó *et al.* 1994) mit dem Effektor-Konstrukt *Wt1-targ2* wurde mittels Elektroporation durchgeführt. Nach einer kurzen Ruhephase für die ES-Zellen wurden diese auf sog. Nährzellen (*feeder cells*) unter dem Selektionsdruck von G418 (Geneticin) im Nährmedium kultiviert. Überlebende potenziell homolog rekombinierte Klone wurden gepickt und in 96well-Platten überführt. Zur Herstellung mehrerer identischer Replikaplaten wurde die jeweilige Zellpopulation gesplittet und in neue Platten überführt. Zur Identifizierung möglicher homolog rekombinierter ES-Zellklone wurden transfizierte und potenziell positive Zellen einer Replikaplatte prozessiert, d. h. die DNA präpariert und mit der Restriktionsendonuklease *EcoRV* restringiert. Nach dem *Southern Blot* wurden die ES-Zellfilter mit einer radioaktiv markierten 5' außerhalb des Homologiearmes gelegenen Sonde hybridisiert. Die Beurteilung der Rekombination erfolgte unter Verwendung des angefertigten Autoradiogramms.

Die direkt an den 5'*Wt1*-HA angrenzende spezifische Sonde (5'OP-Bgl II; *engl.*: 5' *outside probe*) sollte ohne von dem Rekombinationsereignis betroffen zu sein die korrekte Integration des Effektor-Konstruktes in den *Wt1*-Lokus durch die Detektion zweier unterschiedlich großer Restriktionsprodukte nachweisen. Dabei sollte durch den Wegfall der zu einer *EcoRI* mutagenisierten *EcoRV*-Restriktionsschnittstelle das rekombinante Produkt bei einem *EcoRV*-Verdau eine Größe von 18,6 kb gegenüber 7,2 kb im Wildtyp zeigen (s. Abb. 3.23). Eine 3' außerhalb gelegene Sonde (3'OP) mit einem sinnvollen Restriktionsverdau konnte leider nicht etabliert werden.

Insgesamt wurden 2200 W9.5 ES-Zellklone analysiert. Es konnten zunächst acht Kandidaten durch die *Southern Blot*-Analysen identifiziert werden. Dies waren die Klone I.A11, II.D3, V.F2, IX.F12, X.F7, XI.C3, XI.G1, XIII.B1. Die Bezeichnung der potenziell homolog rekombinierten ES-Zellklone setzt sich aus der Nummer ihrer Kulturplatte

(römische Ziffern), sowie aus ihrer darauf befindlichen Position (Koordinaten) zusammen. Die Schritte ihrer Verifizierung sind in der Tabelle 3.2 zusammengefasst. Die Ergebnisse aus den *Southern Blot*-Hybridisierungen sind exemplarisch für vier der ES-Zellklone in der Abbildung 3.24 dargestellt.

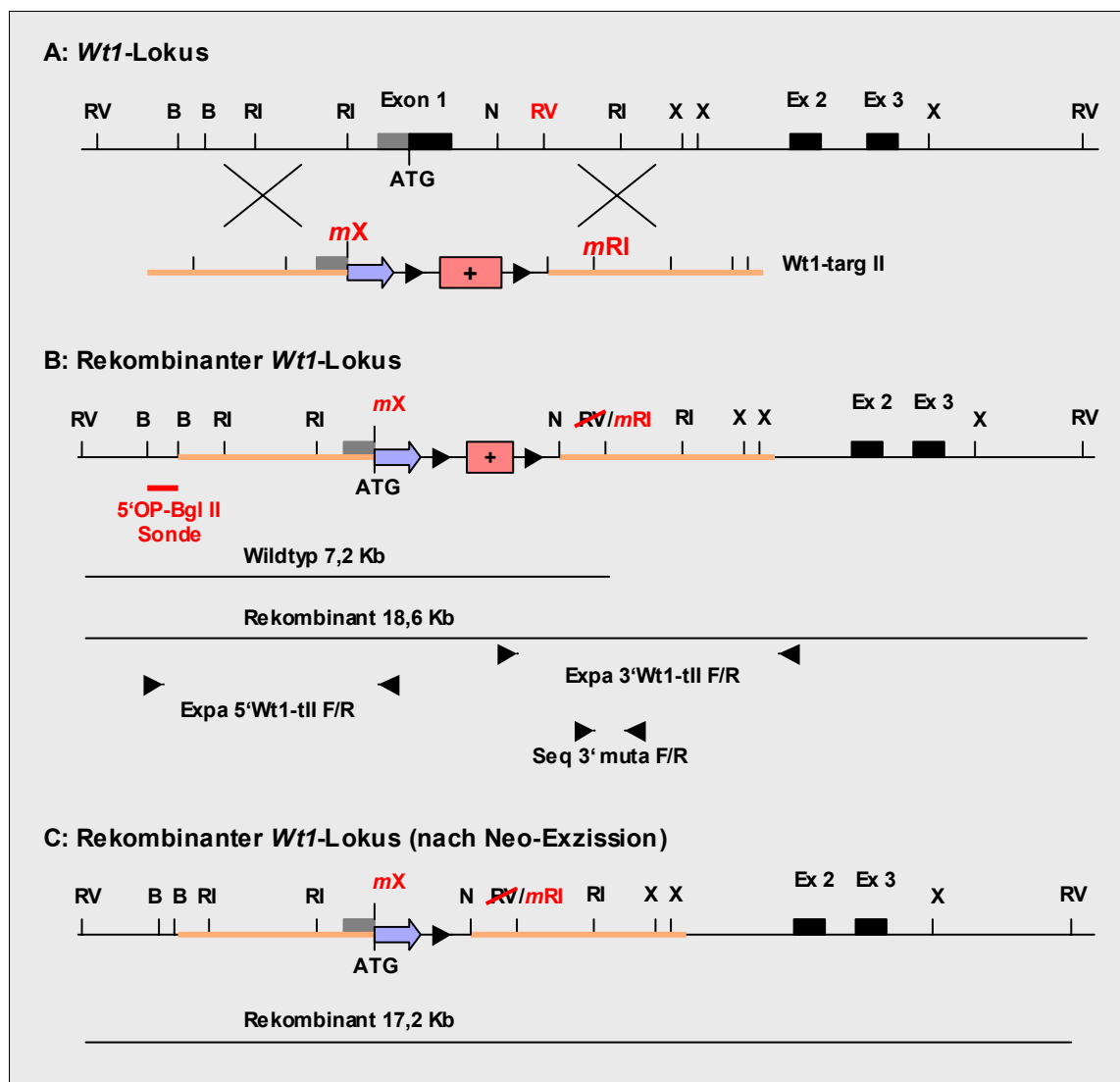


Abbildung 3.23: Homologe Rekombination von *Wt1-targ2* am *Wt1*-Lokus.

A: Schematische Darstellung der Integration des *Wt1-targ2* (Effektor) in den *Wt1*-Lokus durch homologe Rekombination. Der abgebildete Bereich umfasst etwa 19 kb. Die relevanten Restriktionsschnittstellen sind im Verhältnis zueinander angeordnet. Die im Konstrukt durch Mutagenese erzeugten Schnittstellen *Xho*I (*mX*) und *Eco*RI (*mRI*) sind rot beschriftet, die von *mRI* verdrängte *Eco*RV (*RV*)-Erkennungssequenz im *Wt1*-Lokus ebenfalls. Alle in diesem Abschnitt gelegenen Exons wurden als schwarze Rechtecke dargestellt, wobei der 5'-untranslatierte Bereich von Exon 1 in grau gehalten wurde. **B:** Durch die homologe Rekombination wird der Effektor (*tTA*) direkt an die Position des *Wt1*-ATG gebracht und gewährleistet so dessen *Wt1*-spezifisches Expressionsmuster. Hier ist ebenfalls die Lage der 5' außerhalb des HA gelegenen Sonde (5'OP-Bgl II, rot) zum Nachweis der Rekombination abgebildet. Die Sonde detektiert im unveränderten Locus (Wildtyp) ein 7,2 kb großes Fragment nach *Eco*RV-Restriktion. In rekombinanten Klonen wird zusätzlich ein 18,6 kb großes Fragment nachgewiesen (heterozygoter *knock in*). Darunter sind die Oligonukleotide zur Verifikation der Rekombination mittels *Expand*-PCR gezeigt. Die Primerpaare Expa5'*Wt1*-tII F/R sowie Expa3'*Wt1*-tII F/R überspannen den jeweiligen HA und amplifizieren beide ein Produkt von etwa 3,5 kb Größe. Sie funktionieren nur auf dem rekombinanten Locus, da je ein Primer eines Paares im Sequenzbereich des *tTA* bzw. der *Neo*-Kassette liegt. **C:** Durch die anschließende Exzision der *Neo*-Resistenzkassette mittels *Cre*-Rekombinase verkleinert sich die Größe des im *Southern Blot* detektierbaren rekombinanten Restriktionsfragmentes auf 17,2 kb. HA: orange; tTA: blauer Pfeil; Neo-Selektion: rot (+); *loxP*: Pfeilspitzen; Restriktionsschnittstellen: B: *Bgl*II, RI: *Eco*RI, RV: *Eco*RV, N: *Nsil*, X: *Xho*I.

Klon	Southern Blot	5' Expand	3' Expand	Sequenzierung	Morphologie	Blastozysteninjektion
I.A11	+	+	+	+	+	+
II.D3	+	+	-	nd	nd	nd
V.F2	+	-	+	nd	nd	Nd
IX.F12	+	-	-	nd	nd	nd
X.F7	+	+	+	+	-	nd
XI.C3	+	+	+	-	nd	nd
XI.G1	+	+	+	+	+	+
XIII.B1	+	-	-	nd	nd	nd

Tabelle 3.2: Verifizierung der ES-Zellklone.

Eine Übersicht aller Ergebnisse der durchgeführten Analysen zur korrekten homologen Rekombination der ES-Zellklone ist in der Tabelle mit (+, richtig) und (-, falsch) dargestellt. Die Hybridisierung der *Southern Blots* wurde mit einer 5' außerhalb des 5'*Wt1*-HA gelegenen Sonde durchgeführt. Nur die Klone I.A11 und XI.G1 wurden zur Injektion in Maus-Blastozysten verwendet. Nd: nicht mehr durchgeführt.

Rekombinante ES-Zellklone *Wt1-targ2*:

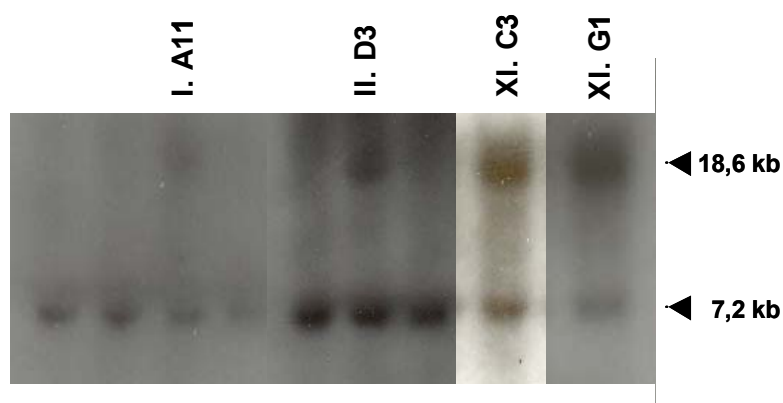


Abbildung 3.24: Southern Blot-Hybridisierung ES-Zellklone.

Die ES-Zell-DNA wurde mit dem Restriktions-enzym *EcoRV* verdaut und im *Southern Blot* analysiert. Homolog rekombinierte ES-Zell-klone zeigen zwei unterschiedlich große Fragmente (7,2 kb Wildtyp, 18,6 kb rekombinant). Dabei kommt das rekombinante Produkt durch die entfernte *EcoRV*-Restriktionsschnittstelle (muta *EcoRI*) zustande. In falsch rekombinierten Klone ist nur das Wildtyp-Fragment zu sehen. Die Hybridisierung wurde mit der außerhalb des 5'*Wt1*-HA gelegenen Sonde 5'OP-Bgl II durchgeführt. Exemplarisch abgebildet sind hier die als positiv identifizierten Klone I.A11, II.D3, XI.C3 und XI.G1.

Mangels einer reproduzierbar und spezifisch funktionierenden 3'OP-Sonde wurden alle Kandidaten anschließend durch eine die Homologiearme-überspannende *Expand-PCR* getestet und die Produkte sequenziert. So sollte die homologe Rekombination in den

ES-Zellen zweifelsfrei bestätigt werden. Die Ergebnisse der *Expand*-PCR sind für alle acht Kandidaten in Abbildung 3.25 gezeigt. Es konnten nur die drei ES-Zellklone I.A11, X.F7 und XI.G1 als eindeutig positiv für eine homologe Integration des Konstruktes in den *Wt1*-Lokus bestätigt werden. Auf der DNA der anderen Klone konnten entweder keine bzw. jeweils nur ein Produkt amplifiziert werden. Der Klon V.F2 zeigt in der 5'-*Expand* eine falsche Produktgröße und wurde aus diesem Grund verworfen.

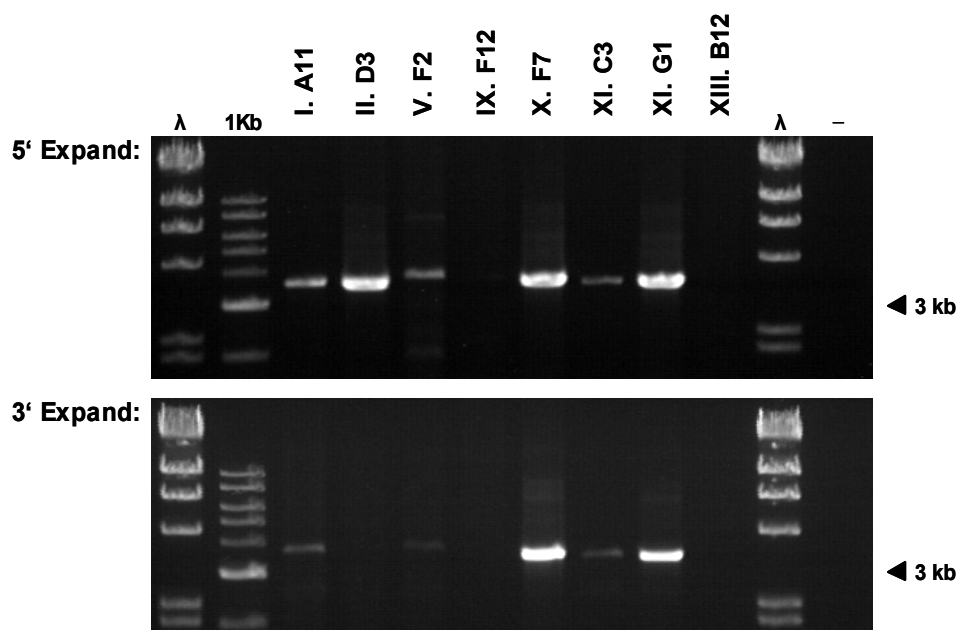


Abbildung 3.25: *Expand*-PCR zum Nachweis der homologen Rekombination des *Wt1-targ2*-Konstruktes in ES-Zellen.

Alle Kandidaten für eine homologe Integration des Effektor-Konstruktes in den *Wt1*-Lokus wurden mittels *Expand*-PCR überprüft. Die PCRs wurden mit den in Abb. 3.23 abgebildeten Oligonukleotiden durchgeführt (5': Expa 5'*Wt1*-tII F/R; 3': Expa 3'*Wt1*-tII F/R). Beide Produkte haben etwa eine Größe von 3,5 kb. Als Größenstandards wurden λ -HindIII und 1kb-Marker aufgetragen.

(-): Negativkontrolle, H₂O.

Zur Bestätigung der amplifizierten Produkte aus den *Expand*-PCRs wurden diese mit den entsprechenden Primern sequenziert. Nachgewiesen werden sollten die Übergänge der homologen Rekombination, sowie die integrierten Sequenzen des *tTA* und der *Neomycin*-Resistenzkassette. Zusätzlich wurde auf den 3'-Produkten der Bereich der mutagenisierten *EcoRV*-Schnittstelle (zu *EcoRI*) überprüft. Die Resultate der Sequenzierungen sind am Beispiel des ES-Zellklons I.A11 in Abbildung 3.26 zu sehen.

Nach Durchführung aller Analysen zur Bestätigung einer fehlerfreien homologen Rekombination des Effektor-Konstruktes *Wt1-targ2* in den *Wt1*-Lokus sowie einer morphologischen Begutachtung der Zellen durch Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Bockamp verblieben abschließend zwei positive ES-Zellklone (I.A11, XI.G1) aus 2200 für eine Injektion in Maus-Blastozysten.

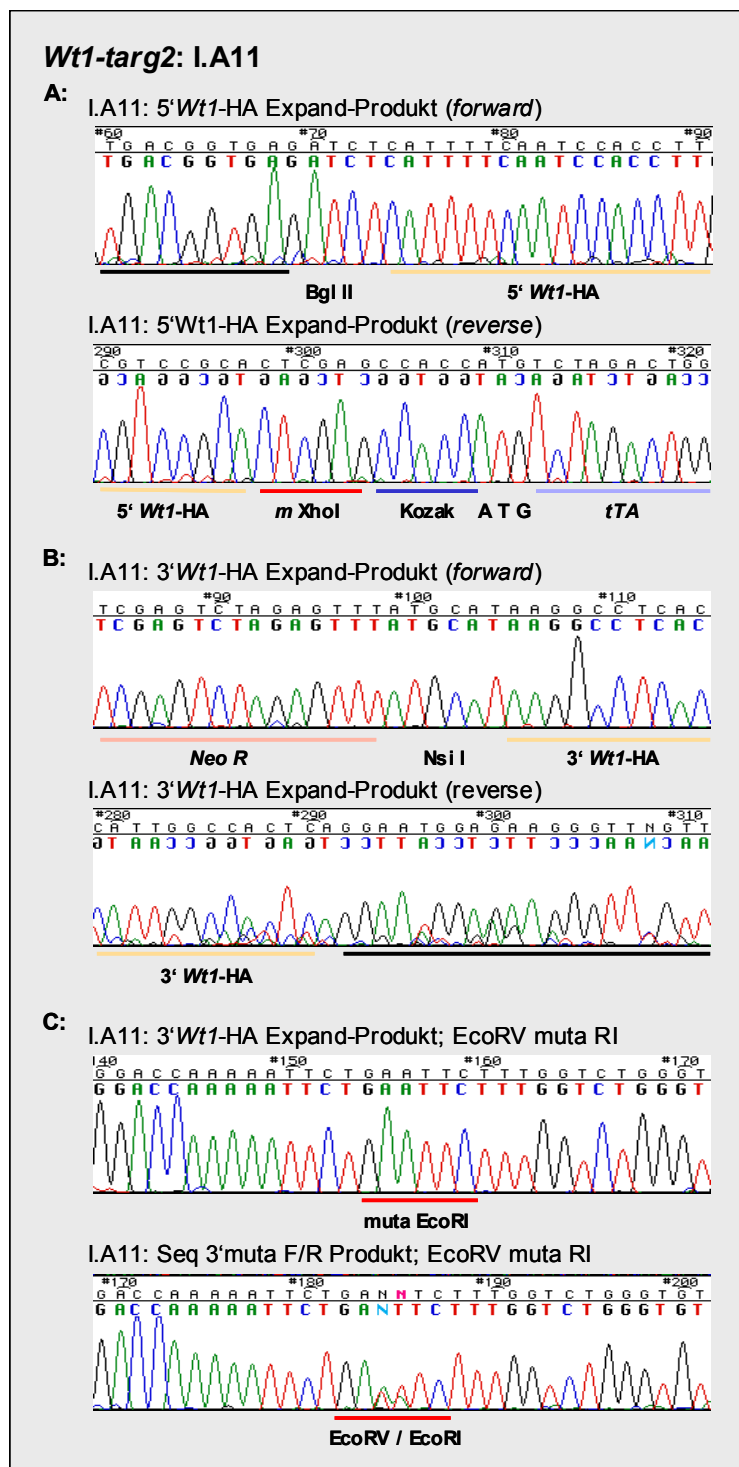


Abbildung 3.26: Sequenzierungsergebnisse der PCR-Produkte zur Kontrolle der homologen Rekombination in ES-Zellen.

Die Produkte der HA-überspannenden *Expand*-PCRs wurden mit den entsprechenden Oligonukleotiden sequenziert. Die wichtigen Stellen zum Nachweis der korrekten Integration in den *Wt1*-Lokus sind farblich markiert. **A:** Abgebildet sind die Übergänge innerhalb des 5' *Expand*-Produktes von *Wt1*-Lokus in den 5'*Wt1*-HA an der *Bgl*II-Schnittstelle (oben) und von 5'*Wt1*-HA in den *tTA*-Effektor (unten). **B:** Zeigt die Übergänge aus der *Neo*-Kassette in den 3'*Wt1*-HA (oben) sowie aus diesem in den *Wt1*-Lokus (unten). **C:** Das 3' *Expand*-Produkt wurde durch die Sequenzierung des mutagenisierten Bereiches *EcoRV* muta *EcoRI* verifiziert (oben). Die Sequenzierung des Produktes einer PCR (Oligonukleotide: Seq 3'muta F/R, Produkt: 400 bp), die in diesem Bereich sowohl das wildtypische als auch das rekombinante Allel amplifiziert, zeigt deutlich den heterozygoten Zustand des Klones an dieser Stelle (unten).

3.2.7 Blastozysten-Injektion der verifizierten ES-Zellen

Beide ES-Zellklone wurden im Anschluss in Blastozysten injiziert und diese in scheinsschwangere Leihmütter implantiert. Dabei macht man sich die Fellfarben-Allele der unterschiedlichen Mausstämme als Marker für das Transgen zu Nutze. Die ES-Zellen W9.5 als Träger der genetischen Veränderung entstammen Mäusen mit der Fellfarbe Agouti (wildfarben). Ihre Injektion erfolgt in Blastozysten eines Hybridstammes DBA/B6 mit schwarzer Fellfarbe. Die Integration der transgenen ES-Zellen in die innere Zellmasse (ICM, *inner cell mass*) der Blastozysten, sowie ihre Beteiligung an der Entwicklung des entstehenden Embryos kann nach der Geburt der Tiere mit einsetzender Fellentwicklung abgeschätzt werden. Diese sog. Chimären (schwarz/braun-gescheckte Tiere) sind ein Mosaik aus unveränderten und rekombinanten ES-Zellen, was sich in ihrer Fellfarbe widerspiegelt. Sie sind potenzielle Träger der genetischen Veränderung. Die Beteiligung rekombinanter ES-Zellen an der Entstehung der Keimzellen (Keimbahn) muss jedoch noch überprüft werden.

Hochchimäre Böcke (> 60 %) wurden deshalb nach Erreichen der Geschlechtsreife in einem Rotationsprinzip alle drei Tage mit drei neuen C57BL/6-Weibchen verpaart, um eine Transmission des Transgens nachzuweisen. Aufgrund der Dominanz des Fellfarbenmarkers Agouti über Schwarz sind mögliche heterozygote Träger des *Wt1*-Effektors an ihrer zimtfarbenen Fellfarbe zu erkennen. Diese Nachkommen (Agoutis) wurden zu gegebenem Zeitpunkt aus den Würfen isoliert und zum Nachweis der Integration des Konstruktes *Wt1-targ2* analysiert. Nach der Keimbahntransmission (KTM) wird das Transgen nach den allgemeinen Mendel'schen Regeln vererbt.

Von Mitarbeitern der AG Bockamp wurden aus den beiden ES-Zellklonen I.A11 (16) und XI.G1 (3) durch Blastozysteninjektion insgesamt 19 männliche chimäre Tiere generiert, die in die Rotationsverpaarungen übernommen wurden. Alle drei XI.G1-Chimären zeigten nach jeweils etwa 120 bis 150 Nachkommen keine Keimbahntransmission und wurden daraufhin abgetötet. Von den 16 I.A11-Böcken, die über einen Zeitraum von einem Jahr mit B6-Weibchen verpaart wurden, hatten lediglich drei ♂ agouti-farbene Nachkommen. Zur Untersuchung der Integration des *Wt1-targ2* Konstrukts ins Genom wurden diesen Tieren Schwanzbiopsien entnommen und daraus DNA präpariert. Der Nachweis eines positiven Befundes erfolgte zunächst mittels spezifischer PCRs für den Effektor *tTA*⁶¹⁻¹ (Oligonukleotide: tTA 61-1 F/R, Produkt: 500 bp) und die *Neo*-Kassette (Oligonukleotide: Neo-id F/R, Produkt: 590 bp), anschließend dann mittels *Southern Blot* und die Homologiearme-überspannende *Expand*-PCRs. Die im folgenden dargestellten Ergebnisse sind repräsentativ für die Analyse der Transgen-positiven Tiere, die aus den Chimären-Verpaarungen hervor gingen (I.A11-Agoutis). Sie beziehen sich aber ausschließlich auf das erste als positiv identifizierte I.A11 Agouti-Weibchen, das zum

Aufbau der Effektor-Linie **WE1** (*Wt1-tTA*^{+/-} [*neo*]) eingesetzt wurde. Die Resultate der Identifizierung der ersten KTM einer I.A11-Chimäre sind in Abbildung 3.27 und 3.28 zusammengefasst.

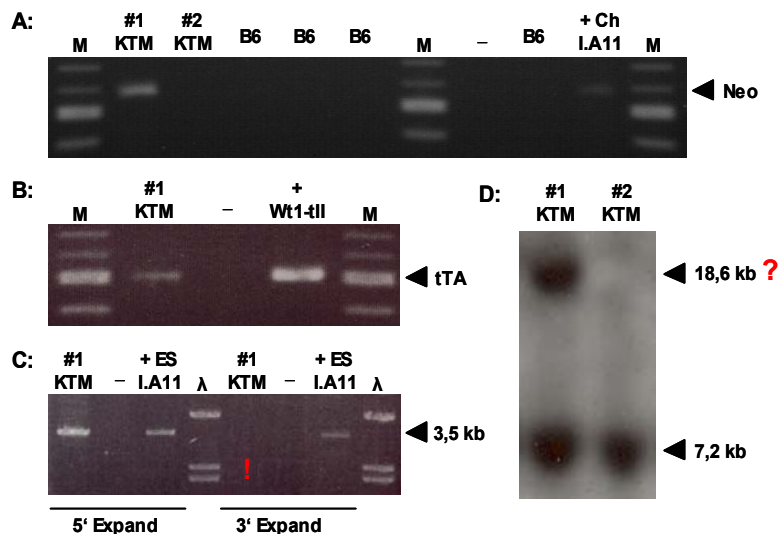


Abbildung 3.27: Nachweis der Keimbahntransmission des Effektor-Konstruktes *Wt1-targ2* in I.A11 Agouti-Mäusen.

A: Spezifische *Neo*-PCR (*Neo*-id F/R, Produkt: 590 bp) zur Identifizierung einer positiven KTM in den beiden I.A11-Agoutis (#1 KTM, #2 KTM). Als Wildtyp-Kontrolle diente DNA von verschiedenen C57BL/6 (B6)-Mäusen. Als Positivkontrolle wurde die DNA der Elternchimäre (+ Ch I.A11 ♂) eingesetzt. Es konnte nur das Tier #1 KTM als positiv bestätigt werden. **B:** PCR zum Nachweis des Effektors *tTA* 61-1 (*tTA*⁶¹⁻¹ F/R, Produkt: 500 bp) und zur Verifizierung der Resultate aus der *Neo*-PCR in der Maus #1 KTM. (+): Plasmid-DNA *Wt1-targ2* als

Positivkontrolle. **C:** 5' und 3' HA-überspannende *Expand*-PCR (Expa 5'*Wt1*-tII F/R und Expa 3'*Wt1*-tII F/R, Produkt: jeweils 3,5 kb). Das Ergebnis bestätigt im 5'-Bereich die homologe Rekombination des *Wt1-targ2* Konstruktes auch in der Maus #1 KTM. Das 3'-Produkt konnte nicht amplifiziert werden (!). Als Positivkontrolle (+) wurde DNA des ES-Zellklones I.A11 eingesetzt. **D:** *Southern Blot* der beiden Agouti-Mäuse #1 und #2 KTM. Die DNA wurde mit der Restriktionsendonuklease *EcoRV* restringiert und der Filter mit der Sonde 5'OP-*Bgl*II hybridisiert. In beiden Tieren wird deutlich das unveränderte Wildtyp-Fragment (7,2 kb) detektiert. Der Nachweis eines rekombinanten Produktes ist nur bei dem Tier #1 KTM zu sehen. Die Interpretation der Produktgröße von 18,6 kb, unter Verwendung von λ -*Hind*III-Marker als Größenstandard im *Southern Blot* ist nicht mehr gesichert (?).

(M): Größenstandard 100bp-Marker; (λ): Größenstandard λ -*Hind*III-Marker; (-): PCR Negativkontrolle/H₂O; Pfeilspitzen indizieren die Produkte.

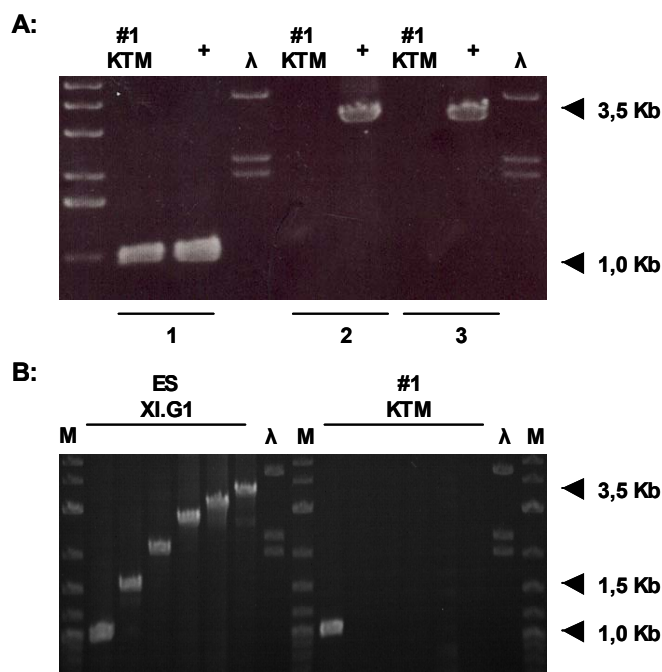


Abbildung 3.28: Untersuchungen zum Zustand der 3'-Rekombination in der Maus #1 KTM.

Dargestellt sind die Ergebnisse verschiedener *Expand*-PCRs, die den Zustand der homologen Rekombination im Tier #1 KTM näher definieren sollen. Als *Sense*-Primer für alle Ansätze wurde der in der *Neo*-Kassette gelegene Expa3'*Wt1*-tII For gewählt, so dass nur rekombinante Produkte amplifiziert wurden. Als Positivkontrolle wurden dieselben Versuchsanordnungen mit DNA des ebenfalls homolog rekombinierten ES-Zellklones XI.G1 (+) durchgeführt. **A: Reverse-Primer:** 1) Seq 3'muta Rev, Produkt: 1 kb; 2) 3'hom Rev 3,3 (innerhalb des 3' *Wt1*-HA gelegener Primer, Produkt: 3,3 kb); 3) Expa3'*Wt1*-tII Rev, Produkt: 3,5 kb. Es konnte nur das etwa 1 kb große rekombinante Produkt der Oligonukleotid-Kombination 1 amplifiziert werden. **B:** Um die Größe des Sequenzverlustes im 3'*Wt1*-HA näher einzugrenzen, wurden neben den Gegenprimern Seq 3'muta Rev und Expa3'*Wt1*-tII Rev (jeweils in der ersten und letzten Spur aufgetragen), Oligonukleotide in ~500 bp-

Abständen (3' check REV 2-5) über den 3'*Wt1*-HA verteilt eingesetzt. In den Kontrollansätzen konnten alle Produkte amplifiziert werden. Auf der DNA von #1 KTM wird erneut nur ein 1 kb großes Fragment sichtbar. Größenstandards: (λ): λ -*Hind*III-Marker, (M): 1kb-Leiter.

Wie aus Abb. 3.27 und 3.28 zu ersehen konnte zunächst ein Tier mit der Bezeichnung #1 KTM als eindeutig positiv für die Integration des *Wt1*-Effektor-Konstruktes *Wt1-targ2* identifiziert werden. Beide für *tTA*- und *Neo*-Kassette spezifischen PCRs ergaben das richtige Produkt. Die weitere eher routinemäßig geplante Verifizierung der 5'- und 3'-homologen Rekombination mittels *Expand*-PCR ergab allerdings eine Abweichung von den Ergebnissen der Analyse des zur Blastozysten-Injektion verwendeten I.A11 ES-Zellklones. Eine korrekte Rekombination konnte nur im 5'-Bereich bestätigt werden. Der Zustand im 3'-Bereich deutet auf einen Bruch des 3' *Wt1*-HA nach etwa 1-1,5 kb und damit auf einen Verlust von ca. 2 kb des Armes hin. Ob dieser Sequenzverlust mit einer größeren Deletion oder einem Rearrangement im endogenen *Wt1*-Lokus einhergeht, konnte zu diesem Zeitpunkt noch nicht geklärt werden. Zur näheren Charakterisierung der Rekombination in der *Wt1*-Effektor-Linie wurden weitere Untersuchungen durchgeführt (vgl. Kap. 3.2.9.2). Allerdings muss die Interpretation der *Southern Blot*-Analysen der ES-Zellklone und der Maus-DNA neu bewertet werden. Der als Größenstandard verwendete λ -*HindIII*-Marker erscheint im Nachhinein als ungeeignet, da er über ein zu ungenaues Auflösungsvermögen im relevanten Größenbereich von 18 kb verfügt. Unabhängig davon wurde auf Grund der Ergebnisse der ES-Zellanalysen und der Bestätigung der fehlerfreien 5'-Rekombination von einer Integration in den *Wt1*-Lokus und einem heterozygoten *knock out* von *Wt1* ausgegangen. Zur Etablierung einer *Wt1*-Effektor-Mauslinie (WE1) wurde das Weibchen #1 KTM (neubenannt: #Z1 WE1) mit einem C57Bl/6♂ für zwei Würfe verpaart. Daran anschließend wurde zur Entfernung der *Neo^{fllox}*-Resistenzkassette mittels Cre-Rekombinase eine Verpaarung mit einem transgenen Cre-*Deleter*-Männchen angesetzt.

3.2.8 Exzision der *Neo^{fllox}*-Resistenzkassette

Die Entfernung der von *loxP*-Sequenzen flankierten *Neomycin*-Resistenzkassette des *Targeting*-Konstruktes wird angestrebt, um einen störenden Einfluss des die Expression der *NeoR*-Kassette antreibenden *Thymidinkinase*-Promotors auf das Transgen zu vermeiden. Gleichzeitig soll die Integration von exogenen DNA-Sequenzen am *Wt1*-Lokus so gering wie möglich gehalten werden, um die erwartete *Wt1*-spezifische Expression des Transaktivators nicht zu verfälschen. Um eine Exzision der *Neo^{fllox}*-Resistenzkassette mittels Cre-Rekombinase zu erreichen, wird die *Wt1*-Effektor-Maus #Z1 WE1 mit einer Cre-exprimierenden Mauslinie verpaart (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. M. Rassoulzadegan, Faculté de Sciences, Nizza/Frankreich; Vidal *et al.* 1998). Diese exprimiert die Cre-Rekombinase unter dem Promotor des *Sycp1* (**Synaptonemal Complex Protein 1**)-Gens und zeigt eine Testes-spezifische Expression in einem frühen Stadium

(Leptotän/Zygotän-Übergang) der Meiose. Nach der o. g. Verpaarung (WE1♀ x *Sycp-Cre*♂) sollte somit in den Nachkommen eines daraus hervorgegangenen doppelt-transgenen Männchens (WE1/*Sycp-Cre*♂) die Deletion der geflochten *NeoR*-Sequenzen nachzuweisen sein. Doppelt transgene WE1/*Scyp-Cre*♂-Tiere wurden mittels *tTA*-(*tTA* 61-1 F/R, Produktgröße: 500 bp) und *Cre*-spezifischer (Oligo-nukleotide: *Cre*-1/*Cre*-2, Produktgröße: 890 bp) PCR identifiziert (s. Abb. 3.29).

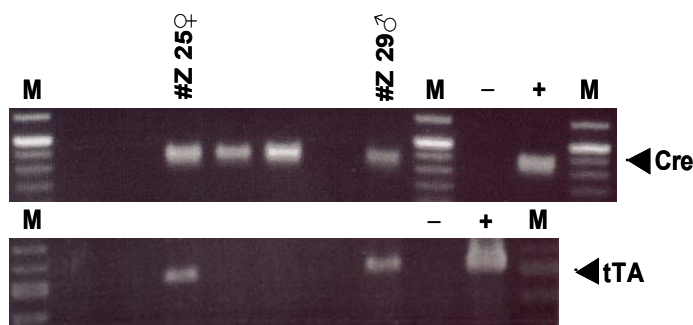


Abbildung 3.29: Genotypisierung WE1/*Sycp-Cre*-Mäuse.

Um doppelt transgene Mäuse WE1/*Sycp-Cre* zu ermitteln wurden die Tiere mit Hilfe spezifischer PCRs genotypisiert. Zum Nachweis der *Cre*-Rekombinase wurden die Oligonukleotide *Cre*1/*Cre*2 (Produktgröße: 890 bp) verwendet. Die Amplifikation des *tTA* (Produkt: 500 bp) wurde mit den Primern *tTA* 61-1 F/R durch geführt. Das in beiden PCRs positiv getestete Männchen #Z29 wurde für die *NeoR*-Exzision zur weiteren Verpaarung eingesetzt.

(+): Positivkontrolle, DNA der Elterntiere; (M): 100bp-Leiter; (-): Negativkontrolle/H₂O.

Wie oben dargestellt konnte ein doppelt transgenes Männchen identifiziert werden. Nach Erreichen der Geschlechtsreife wurde der Mausbock #Z29 zum gleichzeitigen WE1-Linienerhalt mit WE1-Weibchen verpaart. Die Nachkommen wurden durch PCR und *Southern Blot* analysiert (s. Abb. 3.30). Dabei wurden zunächst die beiden für die Genotypisierung (*tTA* 61-1 F/R und *Neo*-id F/R) etablierten PCRs durchgeführt. Eine darauf folgende, die *Neo*-Kassette überspannende PCR, welche nur ein Produkt (~ 300 bp) bei erfolgreicher Entfernung der geflochten Sequenzen ergibt, sollte die Resultate bestätigen.

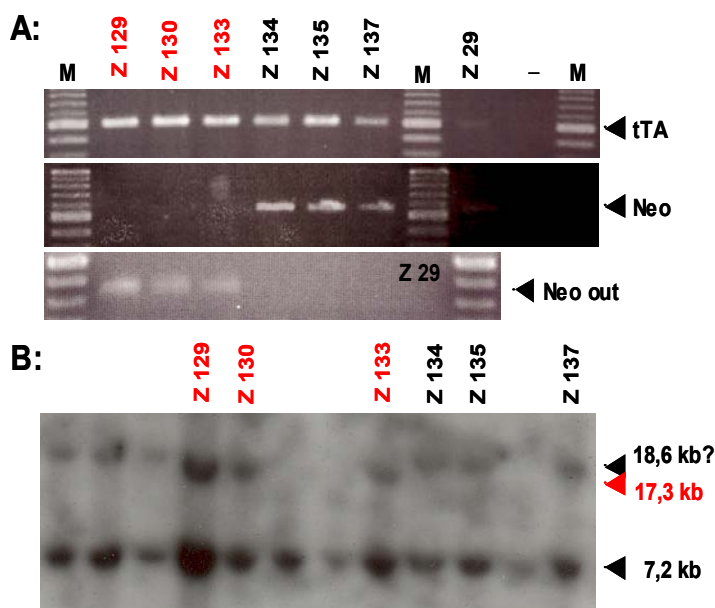


Abbildung 3.30: Nachweis der Neo-Exzision in WE1-Mäusen.

A: Exemplarisch dargestellt sind die PCR-Ergebnisse der Genotypisierung der Nachkommen von #Z29 WE1/*Sycp-Cre*♂. Neben den beiden oben abgebildeten *tTA*- (500 bp) und *Neo*-spezifischen (590 bp) PCRs wurde ein weiterer Nachweis mittels Amplifikation eines Produktes (~ 300 bp) nach der *Cre*-vermittelten *Neo*-Exzision durchgeführt (Oligo-nukleotide: *tTA*/*Neo*-FOR/3'/*Neo*-REV). Die erfolgreiche Entfernung der *Neo*-Kassette (rot markierte Nummern) konnte in drei Mäusen gezeigt werden. **B:** Das abgebildete Autoradiogramm einer *Southern Blot*-Hybridisierung (Sonde: 5'OP-*Bgl*III, Restriktion: *Eco*RV) bestätigt die PCR-Resultate. Tiere mit rekombinantem Allel ohne *Neo*-Kassette (rot) zeigen ein um die Größe der *Neo*-Kassette (1,3 kb) reduziertes rekombinantes Fragment (rote Pfeilspitze, 17,3 kb).(M): 100bp-Leiter; (-): Negativkontrolle/H₂O; Oligonukleotide: *tTA* 61-1 F/R, *Neo*-id F/R.

In drei Tieren #Z129, #Z130 und #Z133 konnte eine Exzision der Neo-Resistenzkassette nachgewiesen werden. Diese Weibchen wurden zum Aufbau der Mauslinie ***Wt1-tTA^{+/-}* (WE2)** mit C57Bl/6-Böcken verpaart. Alle folgenden Versuche zur Funktionalität der *Wt1*-Effektor-Mäuse wurden mit dieser **Linie (WE2)** durchgeführt.

3.2.9 Charakterisierung der *Wt1*-Effektor-Mauslinie ***Wt1-tTA^{+/-}* (WE2)**

Um die Eignung der generierten Mauslinie *Wt1-tTA^{+/-}* (WE2) als *Wt1*-spezifischer Effektor zu überprüfen, sollten die Tiere dieser Linie eingehend untersucht und charakterisiert werden. Dabei galt es zunächst verschiedene Fragestellungen zum herbeigeführten heterozygoten *knock out* des endogenen *Wt1*-Lokus, sowie der *Wt1*-entsprechenden Expression des *tTA*-Effektors in den vorhandenen *Wt1-tTA^{+/-}*-Mäusen zu klären. Darüber hinaus sollte versucht werden, die Art der Integration des *Targeting*-Konstruktes und den daraus entstandenen Zustand des *Wt1*-Lokus vor allem im 3'-Bereich der Rekombination näher zu charakterisieren bzw. aufzuklären. Und letztendlich wurde die potenzielle Regulierbarkeit von Zielgenen – speziell in *Wt1*-exprimierenden Geweben – durch die Verwendung geeigneter *tTA*/Dox-responsiver Reporter-Mäuse dargestellt.

3.2.9.1 Beleg eines *Wt1-knock out* durch die Integration des *tTA*-Effektors

Die funktionelle Inaktivierung von *Wt1* ist die Grundlage des angestrebten induzierbaren konditionalen Wilms-Tumor-Mausmodelles. Um einen erzielten *knock out* von *Wt1* durch die Integration der Effektor-Sequenzen an der Position des *Wt1*-Translationsstartpunktes zu beweisen, wurden heterozygote *Wt1-tTA^{+/-}*-Mäuse in einem sog. *Intercross* (IntC: *Wt1-tTA^{+/-}* ♂ x *Wt1-tTA^{+/-}* ♀) verpaart. Der homozygote Wegfall der codierenden Sequenzen von Exon 1 führt zum Tod *Wt1*-defizienter Embryonen etwa am Tag 13,5 *dpc* (Kreidberg *et al.* 1993). Daraus ist zu folgern, dass homozygote *Wt1-tTA^{-/-}*-Tiere nicht lebensfähig sind und somit nicht als Genotyp in den Nachkommen des *Intercross* vorkommen sollten. An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, dass sich die Bezeichnung (+/-) auf den Zustand des *Wt1*-Lokus bezieht und mit (+) das unveränderte wildtypische Allel bezeichnet wird. Der Genotyp bezogen auf den Effektor (*tTA*) ist dementsprechend in *Wt1-tTA^{+/+}*-Tieren *tTA*-negativ (Wildtyp-Mäuse), in *Wt1-tTA^{+/-}*-Tieren *tTA*-positiv aber heterozygot (d. h. *Wt1-k.o.* durch *tTA-knock in* in einem *Wt1*-Allel) und in *Wt1-tTA^{-/-}*-Mäusen ebenfalls *tTA*-positiv (homozygoter *tTA-k.i.*) allerdings mit einer kompletten Deletion von *Wt1* durch den Effektor.

Der *Intercross* von *Wt1-tTA^{+/-}*-Mäusen hatte zwei Zielsetzungen. Zum einen sollten Würfe genotypisiert und ausgezählt werden, um das Zahlenverhältnis der beobachteten Genotypen zu erfassen. Gleichzeitig wurden sog. *timed matings* (zeitlich überwachte Verpaarungen) angesetzt mit denen man die Begattung der Weibchen und das Alter der sich entwickelnden Embryonen bestimmen kann. Dies geschieht durch die Untersuchung der Weibchen auf Vaginalpröpfe (*plugs*), welche die Vagina nach der Begattung verschließen (s. Kap. 2.11.3). Vaginalpröpfe sind koagulierte Proteine der männlichen Samenflüssigkeit, die etwa 10 Stunden vorhanden sind und dann aus der Vagina herausfallen. Da Mäuse nachtaktive Tiere sind, wird der Begattungszeitpunkt mit 0.00 Uhr angenommen. Bei den am nächsten Morgen sondierten, begatteten (*plug*-positiven), trächtigen Weibchen wird das Alter der Embryonen auf Tag 0,5 *dpc* (*days post coitum*) festgesetzt. C57Bl/6-Weibchen werfen nach 21 Tagen, wobei die Embryonalentwicklung am Tag 19 *dpc* bereits abgeschlossen ist (Silver 1995, Schenkel 1995). Diese Verpaarungen dienen dem Zweck Embryonen des Stadiums 9,5 *dpc* zu präparieren und deren Genotypen zu bestimmen. Die Ergebnisse der Genotyp/PCR-Analysen aus dem *Wt1-tTA^{+/-}*-IntC sind in Abbildung 3.31 dargestellt. Die Integration des *tTA* wurde mit den spezifischen Oligonukleotiden *tTA* 61-1 F/R (Produkt: 500 bp) nachgewiesen. Der *Wt1-k.o.* bzw. das Vorhandensein der unveränderten Sequenz sollte mittels der Amplifikation eines Produktes aus dem von *tTA*-Sequenzen deletierten Bereich von *Wt1*-Exon 1 geschehen (Oligonukleotide: *Wt1-k.o. contr* F/R, Produkt: 320 bp). Die Integrität der analysierten DNAs wurde mit einer *GAPDH* Kontroll-PCR bestätigt.

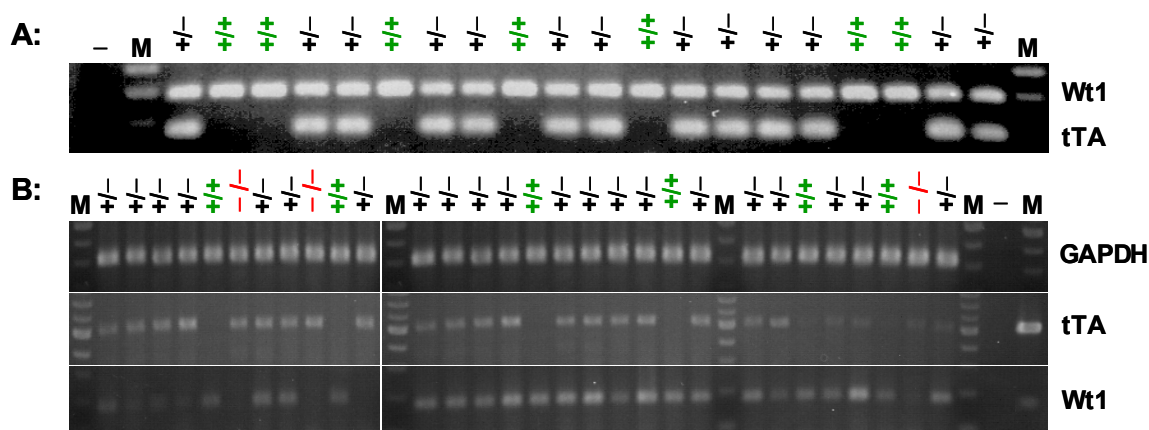


Abbildung 3.31: Nachweis eines heterozygoten *Wt1-k.o.* in der Effektor-Linie WE2.

A: Exemplarisch dargestellt ist die Genotypisierung von *Wt1-tTA^{+/-}*-IntC-Nachkommen durch eine hierfür etablierte Multiplex-PCR. (Oligonukleotide: *Wt1*/unveränderter Lokus: *Wt1 k.o. contr* F1/*Wt1 k.i. contr* R1, 290 bp; *tTA*/veränderter Lokus: Neo-Cre F1/*Wt1 k.i. contr* R1, 180 bp). Es können nur *Wt1^{+/-}*- (Wildtyp/grün) und heterozygote *Wt1-tTA^{+/-}*-Tiere detektiert werden. Dabei kommt es zu einem Verhältnis von 1:2 von *+/+* zu *+/-*. **B:** Untersuchung der Genotypen von *Wt1-tTA^{+/-}*-IntC-Embryonen Tag 9,5 *dpc*. Die Versuche wurden mit aus dem Amnion gewonnener DNA durchgeführt. Die als homozygote *knock outs* *Wt1-tTA^{+/-}* interpretierten Tiere sind rot markiert. Tiere mit unverändertem *Wt1*-Lokus (*+/+*) wurden grün gekennzeichnet. Das erwartete 1:2:1 Verhältnis konnte hier nicht bestätigt werden. Als Positivkontrollen wurde die DNA der Elterntiere herangezogen (nicht abgebildet). (-): Negativkontrolle/H₂O; (M): 100bp-Leiter.

Zur Erfassung der Genotypen von Nachkommen aus *Wt1-tTA*^{+/-} IntC-Verpaarungen wurden 2♂ und 4♀ in zwei Zuchtkäfigen miteinander verpaart. Es wurden über einen Zeitraum von fünf Monaten aus zehn Würfen insgesamt 85 Tiere genotypisch analysiert. Für das *timed mating* wurden ebenso viele Mäuse verpaart und damit aus vier Schwangerschaften 40 Embryonen gewonnen. Hier wurde die Genotypisierung auf der aus dem Amnion gewonnenen DNA durchgeführt, um die Embryonen für mögliche nachfolgende phänotypische Untersuchungen zu erhalten. Sie wurden für eine weitere Verwendung kryokonserviert.

Die oben dokumentierten Versuche (s. Abb. 3.31) belegen einen *knock out* von *Wt1* durch die eingebrachten *tTA*-Sequenzen. Beim Auszählen von 85 Nachkommen des IntC wurden 27 als *Wt1*^{+/+} und 58 Tiere als heterozygot *Wt1-tTA*^{+/-} identifiziert. Die Genotypisierung einer Auswahl von 20 Tieren ist in der Abbildung 3.31 zu sehen. Der Genotyp *Wt1-tTA*^{-/-} tritt bei den untersuchten lebenden Mäusen nicht auf. Dies entspricht einem nahezu perfekten 1:2 Verhältnis und bestätigt die Erwartung bedingt durch Letalität des *Wt1-knock outs*. Bei einem nicht letalen Erbgang sollte es nach der Mendel'schen Spaltungsregel zu einem Verhältnis von 1:2:1 für die Genotypen +/+, +/- und -/- kommen. Dies sollte durch die Experimente an 9,5 *dpc*-Embryonen gezeigt werden, da hier noch *Wt1-tTA*^{-/-}-Genotypen vorhanden sein sollten. Es wurden vier schwangere Weibchen getötet und die Würfe analysiert. Eindeutig gezeigt werden konnte das Vorhandensein von homozygoten *Wt1 k.o.*-Genotypen unter den präparierten Embryonen (3 aus 39). Allerdings kann das o.g. Zahlenverhältnis nicht bestätigt werden. Möglicherweise ist die Präparation der DNA aus dem Amnion der Embryonen zu kontaminationsanfällig und es kommt zu einer Verfälschung der Ergebnisse. Außerdem werden tote Embryonen bei Mäusen rückresorbiert, was ein weiterer Grund für das geringe Auftreten von *Wt1-tTA*^{-/-}-Tieren sein könnte. Trotzdem kann durch die Resultate des vorangegangenen *Intercross*-Versuches von einem *Wt1-knock out* durch das *Wt1-Targeting*-Konstrukt ausgegangen werden.

3.2.9.2 Untersuchungen zum Zustand des 3'-Homologiebereiches im rekombinierten *Wt1*-Lokus

Nach einer umfassenden Bewertung der Ergebnisse zum Nachweis der homologen Rekombination des Effektor-Konstruktes wird von einer korrekten Integration von *Wt1-targ2* in die angestrebte Zielregion 5' des *Wt1*-Lokus ausgegangen. Dies wird durch die Resultate des *Southern Blots*, der den 5'*Wt1*-HA-überspannenden *Expand*-PCR, der zusätzlichen Sequenzierung der Übergänge sowie der *Intercross*-Versuche zum *Wt1-knock out* gestützt. Die nachgewiesene *Wt1*-spezifische Expression des *tTA*-Effektors im

Northern Blot macht eine positionell richtige Integration am *Wt1*-Translationsstartpunkt äußerst wahrscheinlich. Allerdings ist eine fehlerfreie Rekombination in der 3'-Homologieregion, trotz positivem Test des verwendeten I.A11 ES-Zellklons, nicht zu belegen. Erste Untersuchungen ergaben einen Bruch des 3'*Wt1*-HA nach etwa 1-1,5 kb und deuten zumindest auf einen 2 kb großen Verlust von 3'*Wt1*-Sequenzen hin. Ob und wie viel Materialverlust im weiteren Verlauf des *Wt1*-Genlokus zu verzeichnen ist, bleibt bisher unklar. Fakt ist, dass es zumindest zur Deletion der Bereiche kommt, in denen der Antisense-Primer der 3'-*Expand*-PCR liegt, da sonst ein kleineres Produkt mit dieser PCR amplifiziert werden sollte. Diese Zustandsbeschreibung (s. Abb. 3.32) ist Ausgangspunkt der folgenden Arbeiten zur Aufklärung der 3'-Integration des *Wt1*-Effektor-Konstruktes.

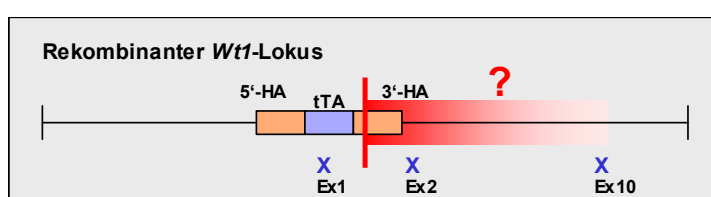


Abbildung 3.32: Ausgangsinformation bezüglich der Integration des *Wt1*-Effektor-Konstruktes in den *Wt1*-Lokus.

Die korrekte Integration in den *Wt1*-Lokus wurde mittels *Expand*-PCR und Expressionsanalysen des *tTA*-Effektors belegt. 5'*Wt1*-HA (orange) und *tTA* (blau) sind vollständig erhalten. Es kommt zu einem *Wt1*-k.o. durch die Deletion der Exon 1-Sequenzen. Vom 3'*Wt1*-HA sind noch ca. 1-1,5 kb vorhanden, dann kommt es zu einem Bruch (roter Balken). Die in der Abbildung rechts vom Bruchpunkt vorliegende Situation am *Wt1*-Lokus ist unklar (rot Unterlegt). Die Größe (?) einer eventuell vorhandenen Deletion soll nach Möglichkeit aufgeklärt werden.

Ausgehend von einer entstandenen Deletion bei der homologen Rekombination in der stromabwärts von Exon 1 gelegenen Region wurde versucht, den 3'-Bruchpunkt (3'-BRP) durch eine als *Splinkerette*-PCR bezeichnete Methode aufzuklären (s. Kap. 2.4). Diese ermöglicht die Amplifikation unbekannter Sequenzen (mittels PCR) zwischen der Position eines bekannten Oligonukleotides und einer nahegelegenen Restriktionsschnittstelle (Devon *et al.* 1995, Protokoll: Dr. N. Stover, UC Irvine/USA). Dafür wurden 5 µg genomischer DNA einer WE1-Maus mit der Endonuklease *Bam*HI (und zusätzlich *Hind*III) verdaut. Das gewählte Restriktionsenzym schneidet im 3'-Bereich der *Neo*-Resistenzkassette und danach nicht mehr im Sequenzbereich bis zum Abbruch des 3'*Wt1*-HA. An die entstandenen *Bam*HI-Fragmente werden im nächsten Schritt die sog. *Splinkerettes* (versehen mit den entsprechenden überhängenden Enden des gewählten Restriktionsenzym) ligiert. *Splinkerettes* bestehen zum einen aus einem doppelsträngigen Bereich mit einem überhängenden Ende für Ligationen (passend zur Endonuklease). Und zum anderen aus einer *mismatch*-Region, für die *Sense*-Primer generiert wurden, die nur dann ein Produkt amplifizieren, wenn der Gegenstrang ausgehend von der bekannten Sequenz (und damit dem bekannten Oligonukleotid)

synthetisiert wurde und somit bereits als Matrize vorliegt. Die Ergebnisse der *Splinkerette*-Methode sind in Abbildung 3.33 dargestellt. Die PCR-Amplifikation (Oligonukleotide: Seq 3'muta-For/Splnk1) auf dem Ansatz mit den *Bam*HI-Ligaten ergab ein etwa 650 bp großes Produkt (benannt: SPLNK-*Bam*HI). Das Fragment wurde isoliert und sequenziert. Ein ebenfalls durchgeführter *Eco*RI-Restriktionsverdau bestätigte die Anwesenheit der *mut*a RI-Schnittstelle durch die Abtrennung eines 220 bp großen Produktes (Daten nicht abgebildet).

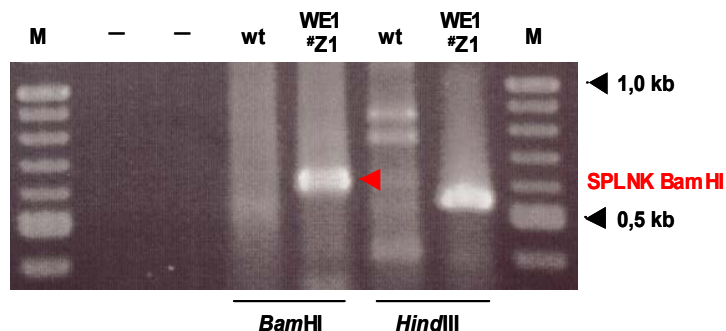


Abbildung 3.33: Ergebnisse der Splinkerette-PCR.

Es wurden je 5 µg DNA von einer Wildtyp-(wt) und einer WE1-Maus (#Z1) mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Hind*III verdaut und an entsprechende *Splinkerettes* ligiert. Mit der anschließend durchgeführten PCR (Oligonukleotide: Seq 3'muta-For/Splnk1) wurden in den Ansätzen der WE1-Maus den 3'-Bruchpunkt überspannende Fragmente amplifiziert. Die Größe für das SPLNK-*Bam*HI-Produkt beträgt etwa 650 bp (*Hind*III: ~550 bp). (M): 100bp-Leiter.

Die Sequenzierung des SPLNK-*Bam*HI-Produktes ergab eine eindeutige Identifizierung von Sequenzen aus dem 3'*Wt1*-HA mit einer Länge von ~ 500 bp. Der Rest des Fragments war von unbekannter Herkunft und definierte somit den 3'-BRP. Die Länge des verbliebenen Homologiearms konnte auf 1,1 kb festgelegt werden. Sequenzvergleiche des neu isolierten 3' SPLNK-*Bam*HI-Fragmentes mit der *ensembl*-Datenbank ergab eine Position für dieses Produkt etwa 120 kb 5'-strangaufwärts des *Wt1*-Translationsstartpunktes. Mit diesen Sequenzinformationen wurden Oligonukleotide (Splnk-C2 For/Rev, Produktgröße: 980 bp) generiert, deren Produkt den identifizierten Bruchpunkt überspannen und so das *Splinkerette*-Ergebnis verifizieren sollte (s. Abb. 3.34).

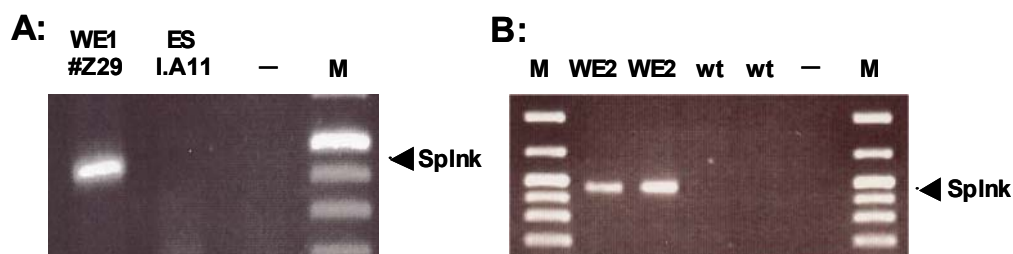


Abbildung 3.34: Splinkerette Kontroll-PCR zur Verifizierung des 3'-Bruchpunktes.

Die Generierung der Oligonukleotide (Splnk-C2 For/Rev, Produktgröße: 980 bp) für die dargestellte Splnk Kontroll-PCR erfolgte auf Basis der Sequenzierung des SPLNK-*Bam*HI-Fragmentes. Sie umfassen den angenommenen invertierten 3'-BRP. **A:** Die Prüfung der bereits etablierten Effektor-Linie (WE1) und des zu ihrer Herstellung verwendeten ES-Zellklons (I.A11) ergab ein positives Signal nur im WE1-Ansatz. **B:** Zeigt die Analyse der aus WE1 nach der Exzision der *NeoR*-Kassette hervorgegangenen Linie WE2. Das Produkt wird nur auf den DNAs der WE2-Effektor-Mäuse amplifiziert. (wt): Wildtyp; (M): 100bp-Marker; (-): Negativkontrolle/H₂O.

Da dieses Experiment in der Übergangszeit der beiden Effektor-Linien durchgeführt wurde, wurden sowohl WE1- (#Z29), als auch WE2-Mäuse zur Überprüfung des 3'-Bruchpunktes herangezogen. Bemerkenswert ist, dass auf der DNA des ES-Zellklones I.A11 das Splnk PCR-Produkt nicht amplifiziert werden konnte. Die Interpretationsmöglichkeiten zu den Ergebnissen der *Splinkerette*-Experimente über den Zustand des rekombinanten *Wt1*-Lokus sind in der Abbildung 3.35 dargestellt. Bei einer korrekten Annotation des *Wt1*-Lokus in den Datenbanken deutet die *Splinkerette*-PCR auf eine Inversion am rekombinanten Integrationsort hin. Wird die Position des SPLNK-*Bam*HI 3'-Fragmentes im *Wt1*-Lokus in Frage gestellt, könnte eine Deletion unbekanntes Ausmaßes vorliegen. Ausgehend davon sollten *Fluoreszenz in situ-Hybridisierungen* (FISH) von Metaphasenchromosomen durchgeführt werden, um eine der beiden Möglichkeiten zu bestätigen. Die hierfür eingesetzten BAC (*Bacterial Artificial Chromosome*)-Vektoren der untersuchten *Wt1*-Region, sowie die generierten Sonden sind eingezeichnet (s. Abb. 3.35) und in Tabelle 3.3. aufgelistet. Die Anordnung der BAC-Klone wurde zuvor mittels PCR-Analysen verifiziert (Daten nicht abgebildet).

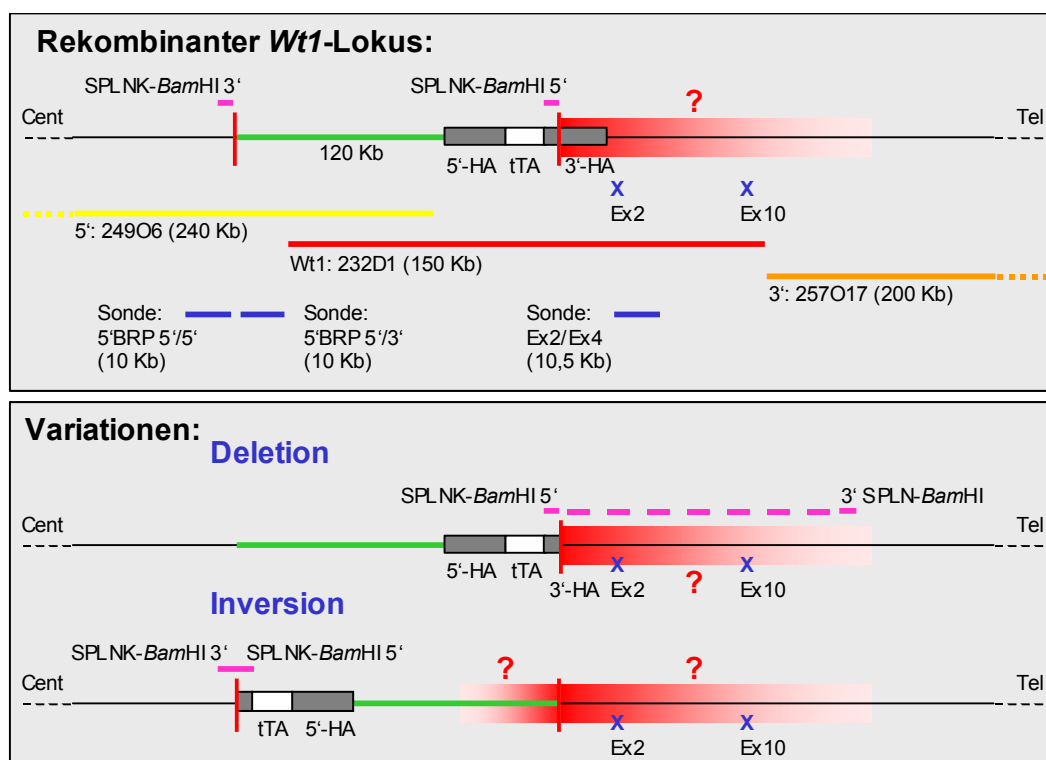


Abbildung 3.35: Rekombinanter *Wt1*-Lokus nach *Splinkerette*-PCR.

A: Schematisch dargestellt ist der Zustand des rekombinanten *Wt1*-Lokus mit der Lage der Fragmente des SPLNK-*Bam*HI-Produktes (pink). Möglicherweise kommt es zu zwei Brüchen bei der Integration des Effektors (rote Linien senkrecht) und zu damit einhergehenden Sequenzverlusten (rot unterlegt, ?). Zusätzlich wurde die Lage der für die folgenden FISH-Experimente verwendeten BAC- (gelb, rot, orange; s. Tab. 3.4) und 10 kb-Sonden (blau) eingezeichnet. **B:** Abgebildet wurden zwei mögliche Variationen des veränderten *Wt1*-Lokus. Bei einer falschen Annotation des *Wt1*-Lokus in den Datenbanken käme das amplifizierte Produkt durch eine Deletion unbekannter Größe zustande. FISH-Analysen mit der Sonde Ex2/4 könnten darüber Auskunft geben. Als zweite Variante besteht die Möglichkeit einer Inversion eines etwa 120 kb 5' von *Wt1* gelegenen Bereiches. Hierbei wäre ein Sequenzverlust in beide Richtungen zu überprüfen. Eine Hybridisierung mit den beiden Sonden 5'BRP-5'/5' und 5'BRP-5'/3' gibt durch eine potenzielle Trennung der beiden Signale nähere Informationen über ein solches Ereignis.

RZPD ID	ensembl Eintrag	Position
RPCIB731G10393Q2	RP23-393G10	Chromosom 2 (centromernah) Chr. 2: 9 792 581 - 10 012 324
RPCIB731O06249Q2	RP23-249O6	5' von <i>Wt1</i> Chr. 2: 104 774 284 - 105 016 994
RPCIB731D01232Q2	RP23-232D1	<i>Wt1</i> überspannend Chr. 2: 104 923 009 - 105 074 905
RPCIB731O17257Q2	RP23-257O17	3' von <i>Wt1</i> Chr. 2: 105 077 912 - 105 272 879

Tabelle 3.3: BAC-Klone zur Charakterisierung der *Wt1*-Region.

Die oben aufgeführten BAC-Klone wurden mit Hilfe der *ensembl*-Datenbank aus der *Wt1*-Region auf Maus-Chromosom 2 (Bande E3) ausgewählt. Zusätzlich wurde ein nahe des Centromers gelegener Klon für die Identifizierung von Chromosom 2 benutzt. Alle Klone wurden vom RZPD aus der Klonbank 731 bezogen und stammen ursprünglich aus der *Mouse BAC Library*, Roswell Park Cancer Institute RPCI-23, hergestellt von M. Tateno, K. Osoegawa und P. J. de Jong aus Niere und Gehirn.

Die Spreiten der Metaphasenchromosomen aus peripheren Lymphozyten wurden aus Milz-Gewebe hergestellt (s. Kap. 2.10.1). Die in der Metaphase arretierten Zellen wurden auf Objektträger aufgetropft und fixiert. Nach der Denaturierung wurden die Chromosomenspreiten, mit den zuvor vorbereiteten und mit Fluoreszenz-Farbstoffen markierten Sonden hybridisiert und anschließend mit DAPI-Antifade gefärbt. Das Ergebnis einer Hybridisierung mit den BAC-Klonen ist in Abbildung 3.36 zu sehen. Die Aufnahmen erfolgten bei der entsprechenden Anregung der verwendeten Fluorophore unter dem Fluoreszenzmikroskop.

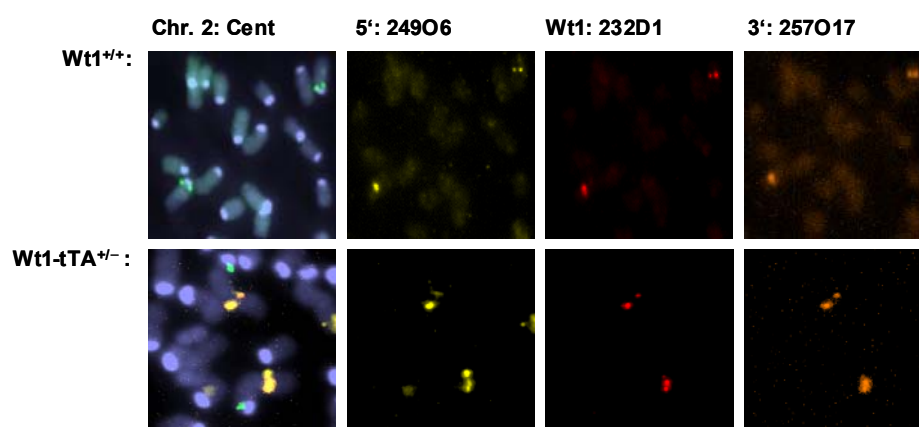


Abbildung 3.36: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen einer FISH zur Charakterisierung des rekombinanten *Wt1*-Lokus.

Die oben abgebildeten Aufnahmen wurden nach der Hybridisierung von Metaphasechromosomen mit den vom RZPD bezogenen BAC-Klonen (s. Tab. 3.4) gemacht. Es wurden vergleichsweise Chromosomenspreiten von Wildtyp- (*Wt1*^{+/+}) und heterozygoten *Wt1-tTA*^{+/-} k.o.-Mäusen angefertigt. Die Testhybridisierung zeigt eine sichere Identifizierung des Maus-Chromosoms 2 durch den centromernah gelegenen BAC 393G10 (*Wt1*^{+/+}, ganz links, grünes Signal), sowie eine korrekte Co-Lokalisation aller verwendeten Sonden am *Wt1*-Lokus (*Wt1-tTA*^{+/-}, ganz links, gelbes Signal durch Überlagerung). In den Einzelbildern der Hybridisierung von *Wt1-tTA*^{+/-}-Chromosomen (untere Reihe) mit den verschiedenen Sonden (im Vergleich zu *Wt1*^{+/+}, oben) sind keine Auffälligkeiten zu beobachten, die auf ein größeres chromosomales Rearrangement schließen lassen. Die BAC-Klone wurden mit folgenden Fluorophoren markiert: 249O6/Cy3 (gelb), 232D1/Cy3,5 (rot), 257O17/Cy5 (orange), 393G10/Spektrum grün (grün). Die Gegenfärbung der Chromosomen erfolgte mit DAPI-Antifade.

Die mit den BAC-Sonden durchgeführte FISH zeigt eine sichere Identifizierung des Maus-Chromosom 2 durch den centromernah gelegenen BAC-Klon. Eine Aussage zum Rekombinationsereignis am *Wt1*-Lokus lässt sich mit den relativ großen BAC-Sonden leider nicht treffen. Die Experimente ergeben aber eine deutliche Co-Lokalisation aller Signale am *Wt1*-Lokus. Es sind auf dieser Ebene keine Auffälligkeiten zwischen Wildtyp (*Wt1*^{+/+}) und heterozygot rekombinanten (*Wt1-tTA*^{+/-})-k.o.-Mäusen zu sehen. Für jede Sonde sind auf jedem der beiden Chromosomen die Doppelsignale zu erkennen. Die so getesteten BAC-Klone können zum einen als Grundlage einer Generierung weiterer kleinerer Sonden dienen, die möglicherweise Aufschluss über die Existenz einer Deletion bzw. Inversion geben. Zum anderen kann man sie zur Orientierung am *Wt1*-Lokus co-hybridisieren, um die Aussagekraft der 10 kb-Sonden zu erhöhen.

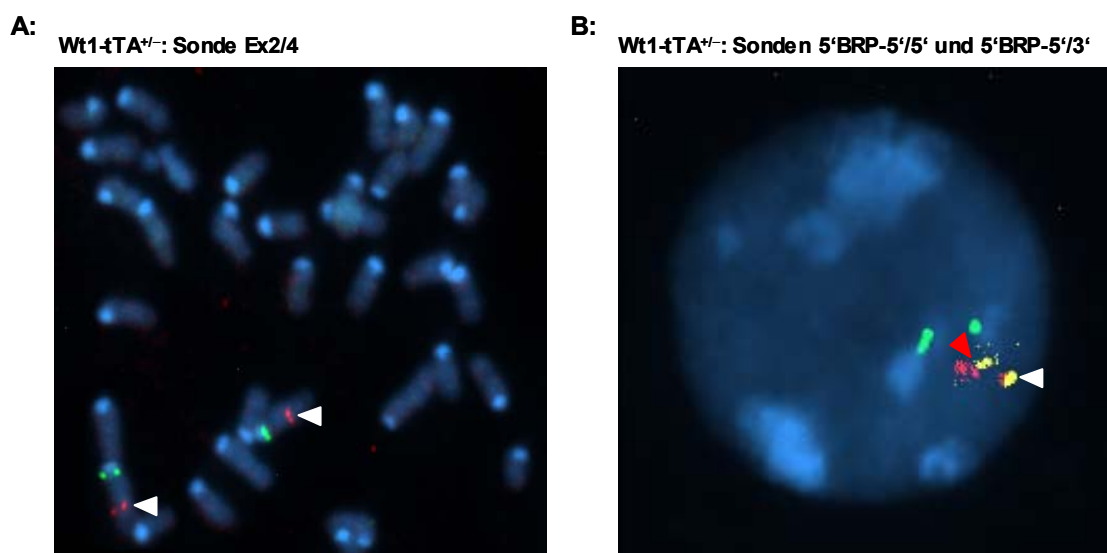


Abbildung 3.37: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Hybridisierung von *Wt1-tTA*^{+/-}-Chromosomen mit 10 kb-Sonden.

A: Zeigt das Ergebnis einer Metaphasen-FISH mit der am 3'-BRP gelegenen Ex2/4-Sonde (rote Signale). Eindeutig sind auf beiden Chromosomen 2 (grüne Signale) die Doppelsignale (rot, weiße Pfeilspitzen) zu erkennen, die gegen eine Deletion (<10 kb) in diesem Bereich sprechen. **B:** Der Nachweis mit den beiden 5'BRP-Sonden wurde hier an Interphase-Kernen dokumentiert, da davon ausgegangen wurde, auf hochkondensierten Metaphasechromosomen eine Verschiebung der räumlichen Position der Sonden zueinander nicht zeigen zu können. Zu erkennen ist auf einem Chromosom (wt) die Co-Lokalisation beider Signale (weißer Pfeil). Auf dem vermuteten rekombinanten Chromosom ist eine räumliche Trennung der beiden Signale für 5'BRP-5'/5' (rot) und 5'BRP-5'/3' (gelb) zu sehen (roter Pfeil).

Grundlage für die Herstellung der 10 kb-Sonde (Ex2/4-Sonde), welche direkt strangabwärts am 3'-BRP gelegen ist, war die DNA des *Wt1*-überspannenden BAC-Klons 232D1. Die Amplifikation wurde in einer PCR-Reaktion (Oligonukleotide: *Wt1* Ex2-FOR/*Wt1* Ex4-REV) mit dem Enzym Elongase durchgeführt. Mit der Ex2/4-Sonde sollte eine mögliche Deletion im Bereich von Exon 2 bis Exon 4 von *Wt1* nachgewiesen werden. Die beiden anderen eingesetzten 10 kb-Sonden (5'/5- und 5'/3-Sonde), welche die Sequenzen des 5'-BRP 120 kb strangaufwärts vom *Wt1*-Translationsstartpunkt gelegen

umfassen, wurden mit entsprechenden Oligonukleotiden (Eff5/5-F/R und Eff5/3-F/R) auf Basis des BAC-Klons 249O6 amplifiziert. Eine vorliegende Inversion könnte hier zu einer räumlichen Trennung der beiden Signale führen und so Hinweise auf den Zustand des rekombinanten Lokus geben. Die Resultate der FISH mit den beschriebenen 10 kb-Sonden auf Inter- und Metaphasechromosomen von *Wt1-tTA^{+/-}* sind in Abbildung 3.37 dargestellt.

Die Ergebnisse der hier gezeigten FISH-Analysen deuten auf eine etwa 120 kb große Inversion des 5'-regulatorischen Bereiches von *Wt1* hin. Bei der Hybridisierung mit den 5'-BRP umfassenden Sonden kommt es zu einer räumlichen Trennung der beiden Signale. Eine Deletion im 3'-Bereich, die größer als 10 kb wäre kann nahezu ausgeschlossen werden. Weitere Untersuchungen zur Erfassung des 5'-BRP sollen sich an diese Arbeit anschließen.

3.2.9.3 Nachweis der *tTA*-Expression in adulten *Wt1-tTA^{+/-}*-Mäusen

Der Nachweis einer *Wt1*-spezifischen Expression von *tTA* in *Wt1-tTA^{+/-}*-Mäusen sollte auf RNA-Ebene in *Northern Blot*-Analysen erfolgen. Dafür wurden den Tieren ausgewählte Organe entnommen und daraus RNA isoliert. Es wurden 10 µg Gesamt-RNA für den *Northern Blot* eingesetzt und der Filter anschließend mit einer *tTA*-spezifischen radioaktiv markierten Sonde hybridisiert. Die Sondenherstellung erfolgte mit den *tTA*-spezifischen Oligonukleotiden (*tTA* 61-1 F/R, Produkt: 500 bp) mittels PCR auf Grundlage des Plasmids *Wt1-targ2*. Die Dokumentation der Hybridisierung erfolgte im Autoradiogramm. Die Organe wurden für eine möglichst umfassende Charakterisierung der Linie WE2 ausgewählt. Dabei standen alle aus der Literatur bekannten *Wt1*-exprimierenden Gewebe, vor allem die des Urogenitaltraktes im Vordergrund. Diese in Tabelle 3.4 aufgelisteten Organe wurden auch in späteren Analysen mit Reporter-Mäusen zur detaillierteren Beschreibung der *Wt1*-gesteuerten *tTA*-Expression verwendet. Die für verschiedene Organe bereits aus der Literatur bekannte *Wt1*-Expression in adulten Tieren ist in der Tabelle vermerkt. Die Ergebnisse der *Northern Blot*-Analysen sind in der Abbildung 3.38 zu sehen.

Die Resultate der unten aufgeführten *Northern Blot*-Analysen bestätigen eine *Wt1*-spezifische Expression des *tTA* in adulten WE2-Mäusen. Das ca. 1 kb große *tTA*-Transkript konnte zunächst in den bekannten *Wt1*-positiven Geweben, wie Niere, Ovar, Hoden, Uterus und Milz nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde ein starkes Signal in der Harnblase dokumentiert (alles bei kurzer Exposition von drei Tagen, Daten nicht abgebildet). Abhängig vom Expositionszeitraum (14 Tage) lässt sich deutlich eine *tTA*-Expression auch in Herz, Lunge und im Thymus der Tiere zeigen.

Gewebe		Wt1 Lit.	Wt1 tTA	Gewebe		Wt1 Lit.	Wt1 tTA
Gehirn	G	-	-	Speicheldrüsen	Sd	-	-
Herz	Hz	+	+/-	Niere	N	+	+
Lunge	Lu	+	+	Ovar	Ov	+	+
Leber	Le	-	-	Uterus	Ut	+	+
Milz	Mz	+	+	Hoden	Ho	+	+
Thymus	Ty	-	-	Samenblase	Sb	-	-
Knochenmark	Km	+	+	Harnblase	Hb	-	+
Dünndarm	Dd	-	-	Mesenterium	Me	-	+/-
Kolon	Ko	-	-	Skelettmuskel	Skm	-	-
Pankreas	Pa	-	-				

Tabelle 3.4: Ausgewählte Organe für die Charakterisierung der Wt1-Effektor-Mauslinie WE2.

Abgebildet sind alle für die Präparation von RNA verwendeten Organe. Die aus Veröffentlichungen bekannte Expression von *Wt1* in diesen Geweben adulter Mäuse wurde mit (+) gekennzeichnet. Es war beabsichtigt, ein breites Spektrum an Organen zu präparieren, um eine möglichst ausführliche Charakterisierung zu gewährleisten. Die identischen Organe wurden ebenfalls bei späteren Experimenten mit Reporter-Mäusen zur Herstellung von Proteinextrakten für die Durchführung von Luziferase-Assays und X-Gal Färbungen nach Kryodünnschnitten verwendet. Dies ermöglicht einen Vergleich der verschiedenen Daten.

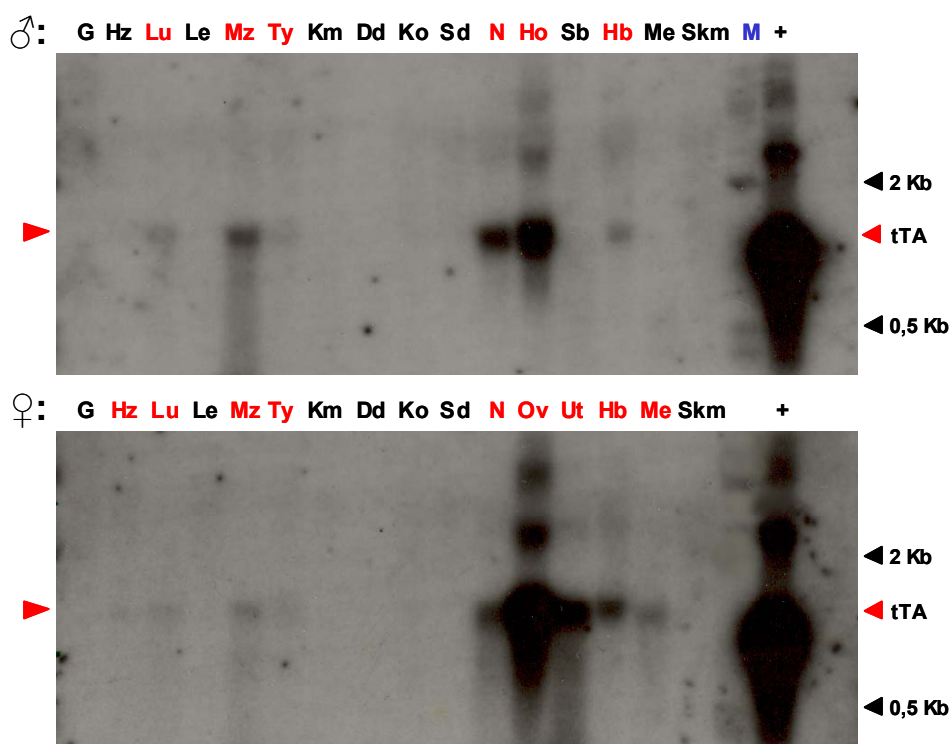


Abbildung 3.38: Northern Blot zur tTA-Expression in Geweben von adulten WE2-Mäusen.

Der abgebildete *Northern Blot* wurde je Spur mit 10 µg RNA des entsprechenden Gewebes beladen und mit einer *tTA*-spezifischen radioaktiv markierten Sonde hybridisiert. Das etwa 1 kb große Transkript (roter Pfeil) kann deutlich in der Niere (N), den Keimdrüsen Ovar (Ov) und Hoden (Ho), dem Uterus (Ut), der Harnblase (Hb), der Milz (Mz), dem Thymus (Ty), dem Herz (Hz), der Lunge (Lu) und im Mesenterium von adulten *Wt1-tTA^{+/+}*-Mäusen nachgewiesen werden. Es ist kein Signal im Knochenmark zu sehen.

Expositionszeit: 14 Tage; (M): RNA-Leiter; *tTA*-Sonde: Herstellung mit *tTA* 61-1 F/R Oligonukleotiden.

Allerdings ergeben sich Unterschiede beim Nachweis der *tTA*-Expression zwischen Männchen und Weibchen im Herz und im Mesenterium. Beim Mesenterium ist möglicherweise die Art der Präparation ausschlaggebend für einen genau zu reproduzierenden Nachweis. Die Expression im Herzen dagegen scheint so schwach zu sein, dass selbst eine 14-tägige Exposition für den Nachweis beim Männchen noch zu kurz war. Zur Bestimmung der genauen zellulären Expressionsorte müssen allerdings innerhalb dieser Gewebe weitere Untersuchungen mit Reporter-Mäusen durchgeführt werden.

3.2.10 Charakterisierung der WE2-Linie durch Kreuzung mit Reporter-Mäusen

Eine funktionelle Beschreibung der WE2-Mauslinie wurde mit Hilfe von *tTA*-abhängigen, Tet (Dox)-responsiven Reporter-Mäusen erbracht. Damit sollte eine zuverlässige Aussage über die Tauglichkeit der WE2-Mäuse als *Wt1*-spezifische Effektor-Linie getroffen werden. Die verwendeten Reporter-Mauslinien tragen durch den *tTA* induzierbare und damit Dox-regulierbare Reportergene, die eine visuelle Dokumentation der *tTA*-Expressionsorte von der Organspezifität bis hin zur zellulären Ebene der untersuchten Gewebe ermöglichen. Die Regulierbarkeit der getesteten Reportergene liefert zusätzliche Informationen über die Steuerbarkeit einer *Wt1*-*tTA* induzierten Expression, sowie die Zeitpunkte dieser Expression. Zusammen sollten die im folgenden dokumentierten Experimente eine *Wt1*-spezifische, räumliche und zeitliche *tTA*-Expression nachweisen, die durch eine stringent Dox-abhängige Regulierbarkeit von Reportergenen die Steuerung relevanter Zielgene als möglich definiert. Die hierfür verwendeten Reporter-Mauslinien wurden uns freundlicherweise von verschiedenen Arbeitsgruppen zur Verfügung gestellt und sind in Tabelle 3.5 aufgelistet. Die zu Beginn eingesetzte Reporter-Linie *TetO_{br}-Luc/Cre* (**LC1**) enthält ein Transgen, das bei Anwesenheit eines tetrazyklinabhängigen Transaktivators, Dox-regulierbar einen bidirektionalen *TetO*-Promotor aktiviert und so zur Expression der Transgene *Luziferase* und *Cre-Rekombinase* führt (Hasan *et al.* 2001). Die Expression der *Firefly-Luziferase* lässt sich in Proteinextrakten von Organen mittels Luziferase-Assay nachweisen. Die beiden anderen Reporter-Mäuse ermöglichen den Nachweis von β -Galactosidase (*LacZ*) durch X-Gal Färbung. Dabei trägt die Linie *TetO_{br}-LacZ/GFP* (**LZ**) ebenfalls ein bidirektional *tTA*/Dox-responsives Transgen, das neben *LacZ* auch *GFP* exprimiert (Krestel *et al.* 2001). Die Mauslinie *ROSA26-Stop^{fllox}-LacZ* (**RLZ**) ist eine Mauslinie, die dem visuellen Nachweis einer *Cre*-Expression dient (Cre-Reporter) und wird von uns indirekt zum Nachweis der *Wt1*-spezifischen *tTA*-Expression eingesetzt. Sie trägt eine am

ROSA26-Lokus integrierte *LacZ*-Expressionskassette, deren vom *ROSA26*-Promotor aktivierte Expression durch eine dazwischen geschaltete von *loxP*-Sequenzen flankierte *Neo/Stop*-Kassette (*Neo-Stop^{fllox}*) unterbunden wird (Soriano 1999). Die durch den tTA gesteuerte Expression der *Cre-Rekombinase* in dreifach transgenen (ttg, triple transgenen) WE2/LC1/RLZ-Mäusen entfernt die Stop-Kassette und ermöglicht so eine nicht reversible Expression der β -Galaktosidase.

Reporter	Publikation	Abkürzung	Nachweis
<i>TetO_{bi}-Luc/Cre</i>	Hasan <i>et al.</i> 2001	LC1	Luziferase
<i>TetO_{bi}-LacZ/GFP</i>	Krestel <i>et al.</i> 2001	LZ	X-Gal
<i>ROSA26-Stop^{fllox}-LacZ</i>	Soriano 1999	RLZ	X-Gal

Tabelle 3.5: Reporter-Mauslinien.

Zunächst wurden LC1 und LZ-Reporter mit der Linie WE2 verpaart. Der Nachweis der *Luziferase*-Expression erfolgte im Luziferase-Assay, die X-Gal-Färbung von Organen der WE2/LZ-Tiere an Kryoschnitten der präparierten Gewebe (s. Tab. 3.3). Für die Verwendung der RLZ Cre-Reporter-Mäuse wurden diese mit doppelt transgenen (dtg) WE2/LC1-Mäusen verpaart. In ttg Nachkommen (WE2/LC1/RLZ) entfernt die tTA-abhängig exprimierte *Cre-Rekombinase* der LC1-Tiere die Stop-Kassette am *ROSA26*-Lokus und ermöglicht die Expression der β -Galaktosidase (*LacZ*). Der Nachweis erfolgte hier ebenfalls durch X-Gal-Färbung an Kryoschnitten der Gewebe.

Für die Charakterisierung wurden zunächst die Reporter-Linien LC1 und LZ mit WE2 Effektor-Mäusen verpaart. Die Nachkommen wurden mittels PCR zur Identifizierung doppelt transgener (dtg) Tiere genotypisiert (Daten nicht abgebildet). Zum Nachweis der Dox-abhängigen Regulierbarkeit wurde dtg Mäusen beider Genotypen (WE2/LC1 und WE2/LZ) für vier Wochen 4 mg/ml Doxyzyklin (Dox) im Trinkwasser appliziert. Danach wurde den Versuchstieren zur Anfertigung von Proteinextrakten bzw. von Kryodünnschnitten die in Tabelle 3.3 aufgeführten Organe/Gewebe entnommen und aufbereitet (s. Kap. 2.8 und 2.12.1).

3.2.10.1 Untersuchung der tTA-Expression in WE2/LC1-Mäusen

Nach der Verpaarung wurden potenzielle WE2/LC1-transgene Nachkommen (Genotyp: *Wt1-tTA^{+/-}/TetO_{bi}-Luc-Cre*) mittels PCR genotypisiert (Oligonukleotide: LUC-1 F/R, Produkt: 650 bp und tTA61-1 F/R, Produkt: 500 bp). Der Hälfte der Versuchstiere wurde Doxyzyklin im Trinkwasser appliziert. Nach vier Wochen wurden den Mäusen die in Tab. 3.3 aufgelisteten Organe entnommen und daraus Proteine isoliert. Alle Extrakte

wurden zunächst bei -20°C eingefroren und gelagert, um alle Proben zum gleichen Zeitpunkt zu messen. Der Nachweis erfolgte im Luziferase-Assay, der die Lichtemission (560 nm) beim Umsatz des Substrates Luziferin durch die Luziferase des untersuchten Gewebeproteinextrakts im Luminometer bestimmt.



Als enzymatische Reaktion ist der Substratumsatz und damit die Lichtemission temperaturabhängig. Durch eine am Stück durchgeführte Messreihe aller zu vergleichender Gewebe wurde versucht möglichst konstante Bedingungen zu erreichen, die z. B. nicht durch Temperaturschwankungen beeinflusst wurden. Unabhängig davon waren die gemessenen Proben allerdings unterschiedlich lange Zeiträume eingefroren, was sich möglicherweise auf die Aktivität der Luziferase auswirkt. Die Angabe der Messung erfolgte in *relative light units* und wurde durch eine Proteinkonzentrationsbestimmung (Bradford-Assay) normalisiert. Die Ergebnisse des Luziferase-Assay mit den Geweben von WE2/LC1-(+/-Dox)-Mäusen ist in der Abbildung 3.39 exemplarisch für eine Auswahl von Tieren dargestellt. Die Anzahl der untersuchten Tiere reichte nicht für eine statistische Auswertung der Resultate.

Der durchgeführte Luziferase-Assay zeigt eine eindeutige tTA-bedingte *Luziferase*-Expression in den *Wt1*-positiven Geweben des Urogenitaltraktes. Dies deutet auf die Eignung der WE2 *Wt1*-Effektor-Linie für eine *Wt1*-spezifische, exogen regulierbare Expression von Transgenen hin. Schwächere Signale in der Milz müssen näher untersucht werden, da sie nur knapp über den Werten der Kontrolltiere liegen (entspricht Hintergrundexpression). Auch muss die Stärke der *Wt1*-Expression in den zellulären Kompartimenten bzw. ihr Anteil an der Gesamtproteinmenge dieser Organe bei der Interpretation der Resultate mit in Betracht gezogen werden. Zur Darstellung einer stringenten Regulierbarkeit durch Dox-Administration sind die LC1-Reporter-Mäuse möglicherweise nur bedingt geeignet. Deutlich sieht man eine Erniedrigung der *Luziferase*-Expression in allen positiven Geweben (s. Organspezifität), doch kommt es zu keinem kompletten Abschalten. Relativ hohe Restaktivitäten in Niere (N) und Hoden (Ho) sind entweder Ausdruck einer nicht stringenten Regulierbarkeit oder aber Ergebnis einer großen Proteinstabilität der Luziferase im Gewebe. Diese wird nach ihrer Herstellung in den Peroxisomen der Zellen gespeichert und erst nach und nach abgebaut, so dass der Versuchszeitraum möglicherweise zu kurz gewählt war, um eindeutige Abschaltkinetiken zu erzielen. Ergänzende Untersuchungen zur Regulierbarkeit können hierüber Aufschluss geben.

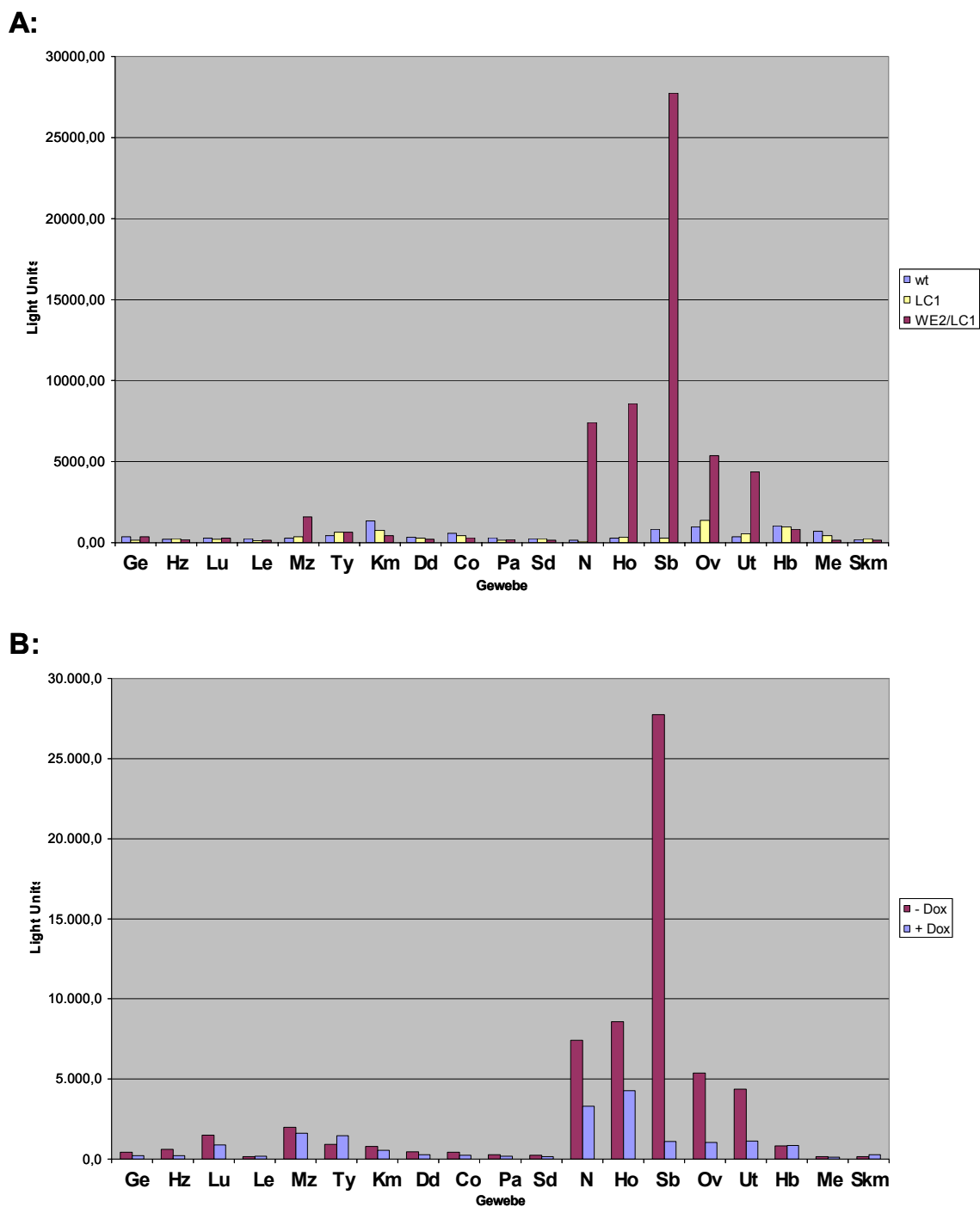


Abbildung 3.39: Nachweis der Luziferase-Expression in Geweben von WE2/LC1-Mäusen.

In den Diagrammen sind die gegen die Proteinkonzentration des untersuchten Extraktes normalisierten *Light Units* der präparierten Gewebe aufgetragen. **A: Organspezifität WE2/LC1.** Gezeigt ist die tTA-bedingte *Luziferase*-Expression von dtg WE2/LC1-Tieren ohne Dox (lila). Als Kontrolle wurden die Organe von Wildtyp (blau) und *single* transgenen (stg) LC1-Mäusen analysiert. Deutliche Signale sind in den *Wt1*-spezifischen Geweben des Urogenitaltraktes (N, Ho, Sb, Ov, Ut) zu sehen. **B: Regulierbarkeit WE2/LC1.** Dargestellt ist das Dox-induzierte Abschalten der *Luziferase*-Expression. Alle in der Organspezifität positiv getesteten Organe reagieren auf die Dox-Applikation (4 Wochen 4 mg/ml Dox im Trinkwasser) mit reduzierter *Luziferase*-Expression. Ein komplettes Abschalten ist nicht zu erreichen. Die deutlichste Induzierbarkeit liegt in der Samenblase vor, für die allerdings bisher keine *Wt1*-Expression in adulten Mäusen beschrieben wurde.

Co: Kolon, Dd: Dünndarm, Ge: Gehirn, Hb: Harnblase, Hz: Herz, Km: Knochenmark, Le: Leber, Lu: Lunge, Me: Mesenterium, Mz: Milz, N: Niere, Ov: Ovar, Pa: Pankreas, Sb: Samenblase, Sd: Speicheldrüse, Skm: Skelettmuskel, Ho: Hoden, Ty: Thymus, Ut: Uterus.

3.2.10.2 Analyse der *tTA*-Gewebespezifität und Dox-abhängigen Regulierbarkeit der Reporterogenaktivität in WE2/LZ-Mäusen

Auch mit der LZ-Reporter-Linie sollte die Gewebespezifität der *tTA*-Expression, sowohl in adulten Mäusen, als auch in verschiedenen Stadien der Embryonalentwicklung dargestellt werden. Der Nachweis einer β -Galaktosidase-Expression auf Kryodünnschnitten erlaubt es, die *tTA*-Expression auf zellulärer Ebene darzustellen. Im direkten Vergleich der -Dox- und +Dox-Tiere sollte darüber hinaus eine stringente Regulierbarkeit des Reportergens zu erkennen sein.

Aus den Verpaarungen WE2 x LZ wurden die doppelt transgenen Nachkommen (Genotyp: *Wt1-tTA^{+/+}/TetO_{br}-LacZ/GFP*) mit Hilfe linienspezifischer PCRs genotypisiert (Oligonukleotide: *tTA*: s. o.; LZ: hGFP-12/13, Produkt: 490 bp). WE2/LZ dtg Mäuse wurden mittels cervikaler Dislokation getötet und die entsprechenden Organe entnommen. Parallel wurden Mäuse des selben Genotyps (WE2/LZ) vor ihrer Präparation vier Wochen lang mit Doxyzyklin (Konzentration s. o.) stimuliert, um ein Abschalten der β -Galaktosidase-Expression zu erreichen. Die Organe wurden in flüssigem Stickstoff kryokonserviert und anschließend im Kryotom geschnitten. Es wurden 12 μ m dicke Kryoschnitte (aller Organe, außer Knochenmark) angefertigt und für die Färbung verwendet. Die Aufnahmen erfolgten am Durchlichtmikroskop. Bei richtiger *tTA*-Expression sollte ein *Wt1*-spezifisches Expressionsmuster durch Blaufärbung der entsprechenden Organe bzw. Gewebe nachzuweisen sein. Die Ergebnisse der X-Gal-Färbung auf Kryodünnschnitten von Organen aus WE2/LZ dtg +/-Dox-Mäusen ist in den folgenden Abbildungen (Abb. 3.40 - 3.46) dargestellt und in Tabelle 3.6 zusammengefasst.

Wie in den Darstellungen zu erkennen ist, zeigen die Untersuchungen der WE2 Effektor-Mauslinie anhand der Reportergen-Analysen eine eindeutige und stringente Regulierbarkeit. Die als Zielgen des Transaktivators exprimierte β -Galaktosidase kann in definierten Geweben von doppelt transgenen, unbehandelten (-Dox) WE2/LZ-Mäusen zweifelsfrei nachgewiesen werden. Die vierwöchige Applikation von Dox bewirkt ein offenbar komplettes Abschalten des Reportergens. In den Geweben ist keine *LacZ*-Expression mehr festzustellen. Die Färbungen in den Kanälchen des Epididymis (Nebenhoden, Abb. 3.41) sind als Ergebnis endogener β -Galaktosidase-aktivität zu werten, da sie sowohl in behandelten als auch in unbehandelten Tieren dokumentiert wurden (Daten nicht abgebildet).

Alle weiteren X-Gal-Färbungen an Geweben embryonaler und adulter Herkunft bestätigen ein *Wt1*-spezifisches Expressionsmuster des *tTA*. Hierauf soll im Folgenden näher eingegangen werden. Dabei wurde auf eine Abbildung der Milz, die lediglich eine schwache Färbung der Kapsel zeigt, verzichtet.

(* Die Beurteilung aller folgenden histologischen Präparate wurde mit der am Ende des Ergebnisteils aufgeführten Fachliteratur vorgenommen und mit den Aussagen eines Pathologen abgeglichen.)

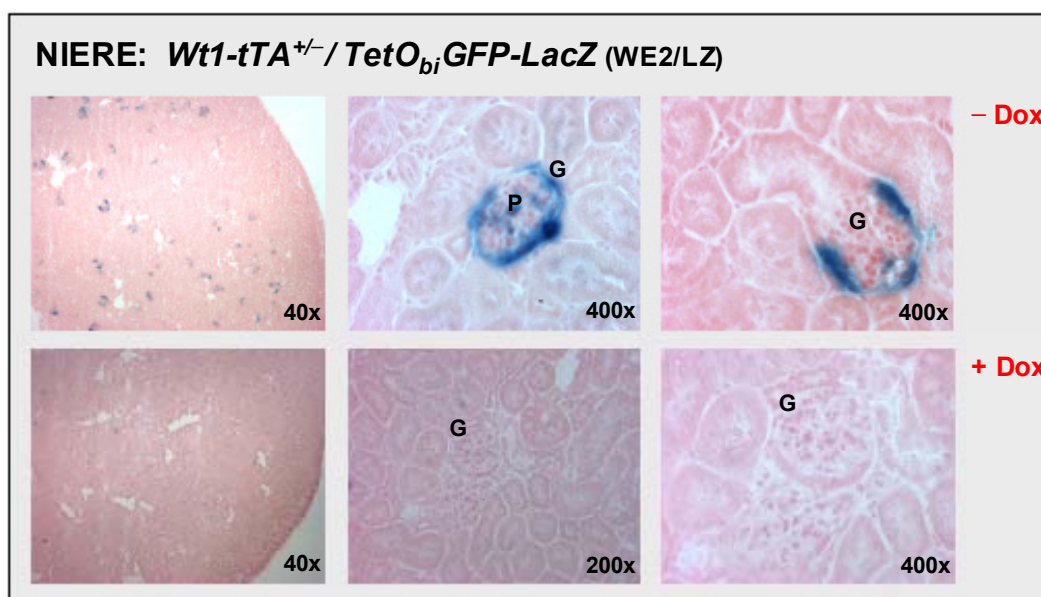


Abbildung 3.40: X-Gal Färbung auf Kryoschnitten der Niere von WE2/LZ-Mäusen.

Die X-Gal-Färbung markiert die Glomeruli bzw. die Podozyten der Niere als Expressionsort des Transaktivators und damit der β -Galaktosidase. Je nach Lage des Schnittes erkennt man durchgefärbte bzw. hufeisenförmige Strukturen. Es ist keine Färbung auf den Schnitten der Dox-behandelten Kontrolltiere zu erkennen.

(G): Glomerulus; (P): Podozyten; Schnittdicke: 12 μ m.

Auf den Kryoschnitten der Niere markiert die X-Gal-Färbung deutlich die Glomeruli als *tTA*-Expressionsort (s. Abb. 3.40). Höhere mikroskopische Auflösungen bestätigen dies. Da eine detailliertere Darstellung auf zellulärer Ebene nicht möglich ist, impliziert die klare Restriktion der β -Galaktosidase auf die Glomeruli, dass die Podozyten das zelluläre Kompartiment der *tTA*-Expression in WE2-Mäusen sind. Diese sind als Orte der *Wt1*-Expression in der adulten Niere bereits beschrieben (Mundlos *et al.* 1993, Rivera und Haber 2005). Die Befunde sprechen für eine exakte Rekapitulation des *Wt1*-spezifischen Expressionsmusters in der Niere durch den *tTA*.

In den Hoden (s. Abb. 3.41) der adulten Tiere sind Signale in den Bereichen der Leydig-Zwischenzellen des Interstitiums und in den Zellen des epithelialen Überzug des Hodens (Deckepithel) zu erkennen. Die intertubulären Areale des Interstitiums enthalten neben den hormonproduzierenden Leydig-Zellen auch Kapillaren zur Durchblutung des Hodens. Das Hodendeckepithel ist bedingt durch die begrenzte lichtmikroskopische Auflösung als solches schwer zu identifizieren, möglicherweise wird eine Färbung der *Tunica albuginea*, einer darunter liegenden bindegewebigen Hodenkapsel mit glatten Muskelzellen gezeigt (vgl. Mundlos *et al.* 1993). Die *Tubuli seminiferi contorti* (Samen-

kanälchen) mit allen Zellstadien der Spermatogenese, sowie auch die Sertoli-Zellen (Stütz- und Nährzellen) zeigen keine Blaufärbung.

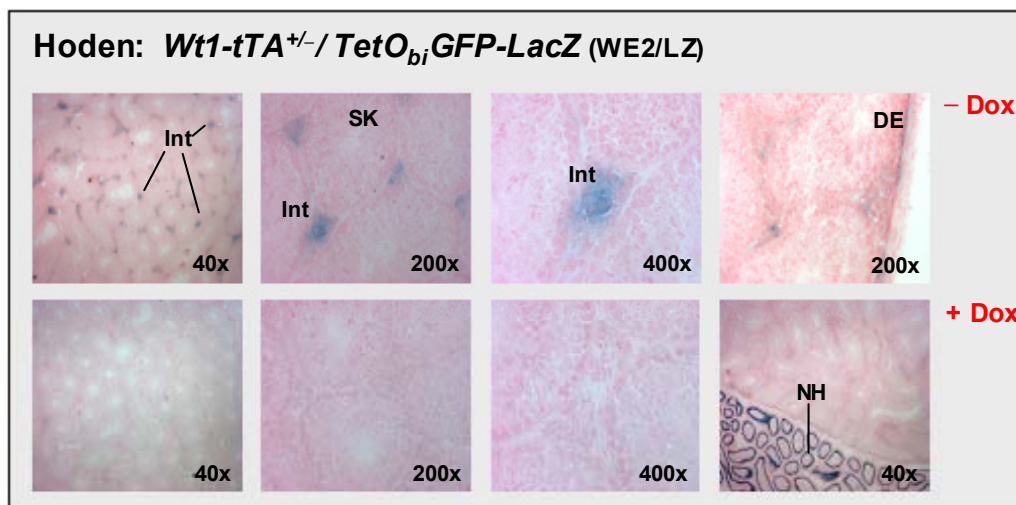


Abbildung 3.41: X-Gal-Färbung auf Kryoschnitten der Hoden von WE2/LZ-Mäusen.

Eine Färbung ist im Interstitium (intermediärer Bereich zwischen den Samenkanälchen) und im epithelialen Überzug (Deckepithel) bzw. der *Tunica albuginea* des Hoden zu erkennen. Das Interstitium wird als Areal von Leydig-Zellen und Kapillaren gefüllt. Es wird keine *tTA*-Expression in den Dox-behandelten Geweben dokumentiert. Die Färbung in den Kanälchen des Nebenhoden kann einer endogenen β -Galaktosidaseaktivität zugeschrieben werden (Hintergrund). (DE): Deckepithel; (Int): Interstitium; (NH): Nebenhoden; (SK): Samenkanälchen; Schnittdicke: 12 μ m.

Auf den Gewebeschnitten der Samenblase (s. Abb. 3.42) finden sich auffällige Signale im Bereich der *Tunica muscularis*, einer bindegewebigen Hülle mit einem hohen Anteil an glatten Muskelzellen. Die Zellen der im Inneren faltig aufgeworfenen Schleimhaut sind ohne Färbung.

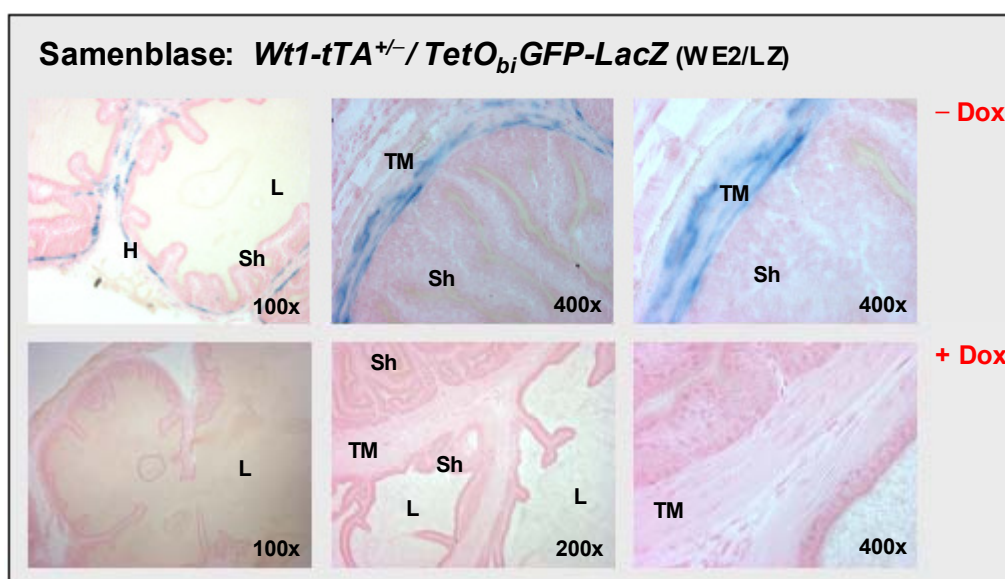


Abbildung 3.42: X-Gal-Färbung auf Kryoschnitten der Samenblase von WE2/LZ-Mäusen.

In der Samenblase adulter Mäuse wird die äußerste Hüllschicht angefärbt. Es handelt sich hierbei um eine *Tunica muscularis* aus glatten Muskelzellen. Die Kontrolle (+Dox) zeigt keine Färbung. (H): Hülle; (L): Lumen; (Sh): Schleimhaut; (TM): *Tunica muscularis*; Schnittdicke: 12 μ m.

Bei den weiblichen Geschlechtsorganen wurden in Ovar und Uterus die *Wt1*-spezifische *tTA*-Expression untersucht. Die X-Gal-Färbung auf Schnitten des Ovars (s. Abb. 3.43) zeigt eine starke Färbung des spinozellulären Bindegewebes (Stroma) des Ovars zwischen den einzelnen Follikeln, sowie der glatten Muskulatur des Eileiters. Sehr schwache, diffuse Signale sind im Bereich der Granulosa-Zellen (*Stratum granulosum*) sichtbar. Es gibt keine Farbreaktion der Keimzellen und der sie umgebenden Cumulus-Zellen des *Cumulus oophorus*.

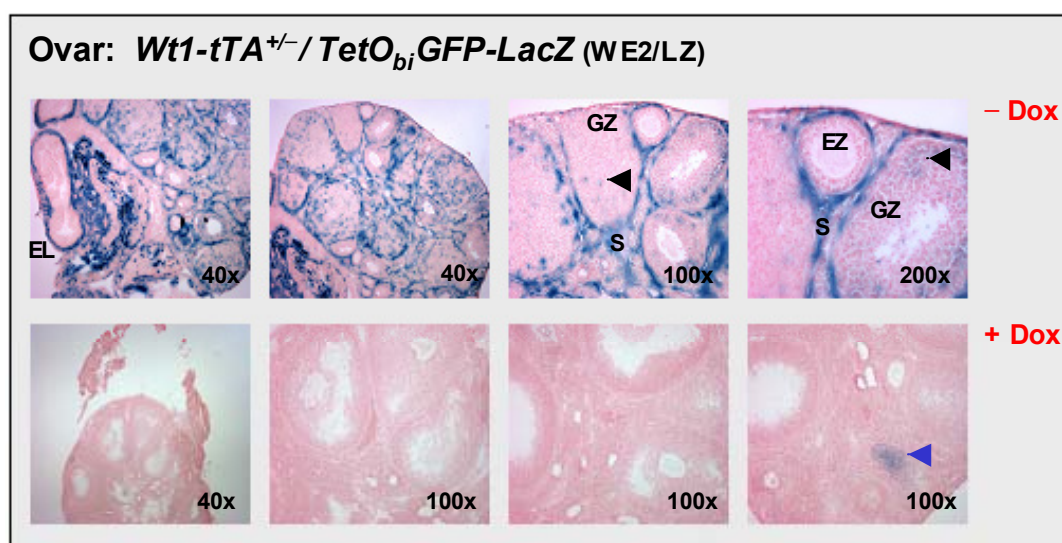


Abbildung 3.43: X-Gal-Färbung auf Kryoschnitten des Ovars von WE2/LZ-Mäusen.

Zu sehen sind eindeutige Signale im Stroma zwischen den einzelnen Follikeln, sowie in der Muskulatur des Eileiters (glatte Muskulatur). Eine Färbung der Granulosa-Zellen ist nur sehr schwach zu erkennen (s. schwarze Pfeile). Die Keimzellen sind wie im Hoden negativ. Das Ovar der Dox-behandelten Mäuse zeigt nur in einem Gelbkörper eine schwache Blaufärbung (+Dox, blauer Pfeil).

(EZ): Eizelle; (GZ): Granulosa-Zellen; (S): Stroma; Schnittdicke: 12µm.

Eine *Wt1*-Expression für verschiedene Regionen des Uterus wurde ebenfalls bereits beschrieben (Pelletier *et al.* 1991, Rackley *et al.* 1993). Die Abbildung 3.44 zeigt deutliche aber diffuse Signale im stromalen Gewebe (*Stratum spongiosum*) der *Zona functionalis* des Endometriums mit den uterinen Drüsen. Dagegen sind in den Zellen der epithelialen Strukturen (Oberflächenepithel zum Lumen) sowie in den Zellen des darauf folgenden *Stratum compactum* keine Anfärbungen zu erkennen. Im mehrschichtigen muskulären Mantel aus glatten Muskelzellen, dem Myometrium sind deutliche Signale im *Stratum submucosum* und im *Stratum supravasculare* mit seinen längs verlaufenden Muskelbündeln zu sehen.

Alle anderen untersuchten Gewebe (in Abb. 3.45 zusammengefasst) zeigen keine Farbsignale durch eine β -Galaktosidaseaktivität. Diese Resultate entsprechen den Beschreibungen der *Wt1*-Expression in adulten Geweben von Menschen und Mäusen.

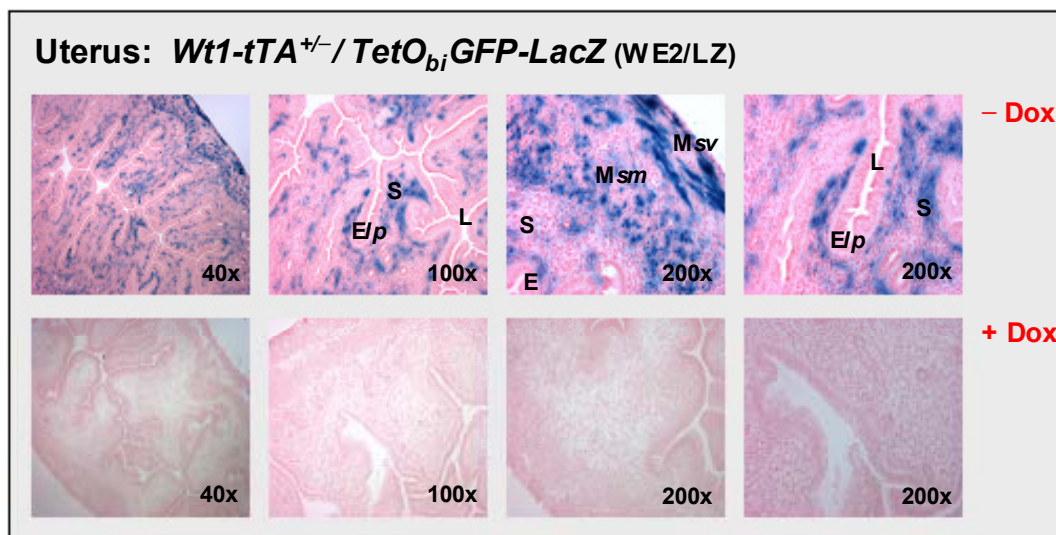


Abbildung 3.44: X-Gal-Färbung auf Kryoschnitten des Uterus von WE2/LZ-Mäusen.

Die Blaufärbung im Uterus erstreckt sich über verschiedene Gewebsschichten. Eine diffuse Färbung ist im Bereich des Stroma zu erkennen, sowie deutliche Signale in den Schichten des Myometriums. Die Dox-behandelten Uteri zeigen keine β -Galaktosidase-Expression.

(E): Endometrium; (lp): *Lamina propria*; (S): Stroma; (M): Myometrium; (sm): *Stratum submucosum*; (sv): *Stratum supra-vasculare*; Schnittdicke: 12 μ m.

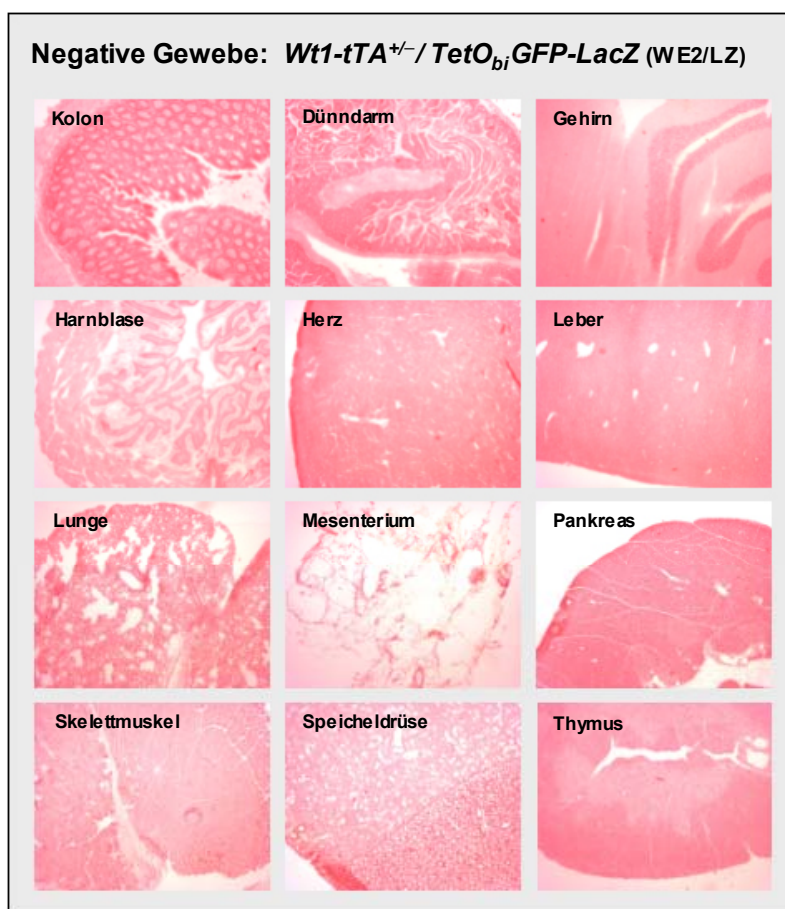


Abbildung 3.45: X-Gal-Färbung negativer Gewebe aus WE2/LZ-Mäusen.

In der Darstellung sind alle Gewebe der adulten Mäuse zusammengefasst, die keine Farbsignale durch eine tTA-hervorgerufene β -Galaktosidaseaktivität zeigten. Diese negativen Gewebe sind bisher auch nicht als *Wt1*-Expressionsorte in adulten Mäusen bekannt. Alle Organe sind von dtg Mäusen ohne Dox-Applikation.

Schnittdicke: 12 μ m; Vergrößerung: 40x.

Ergänzend zu den Untersuchungen in adulten Geweben von WE2/LZ-Mäusen wurden die Embryonalstadien E11,5 *dpc* bis E14,5 *dpc* analysiert (s. Abb. 3.46).

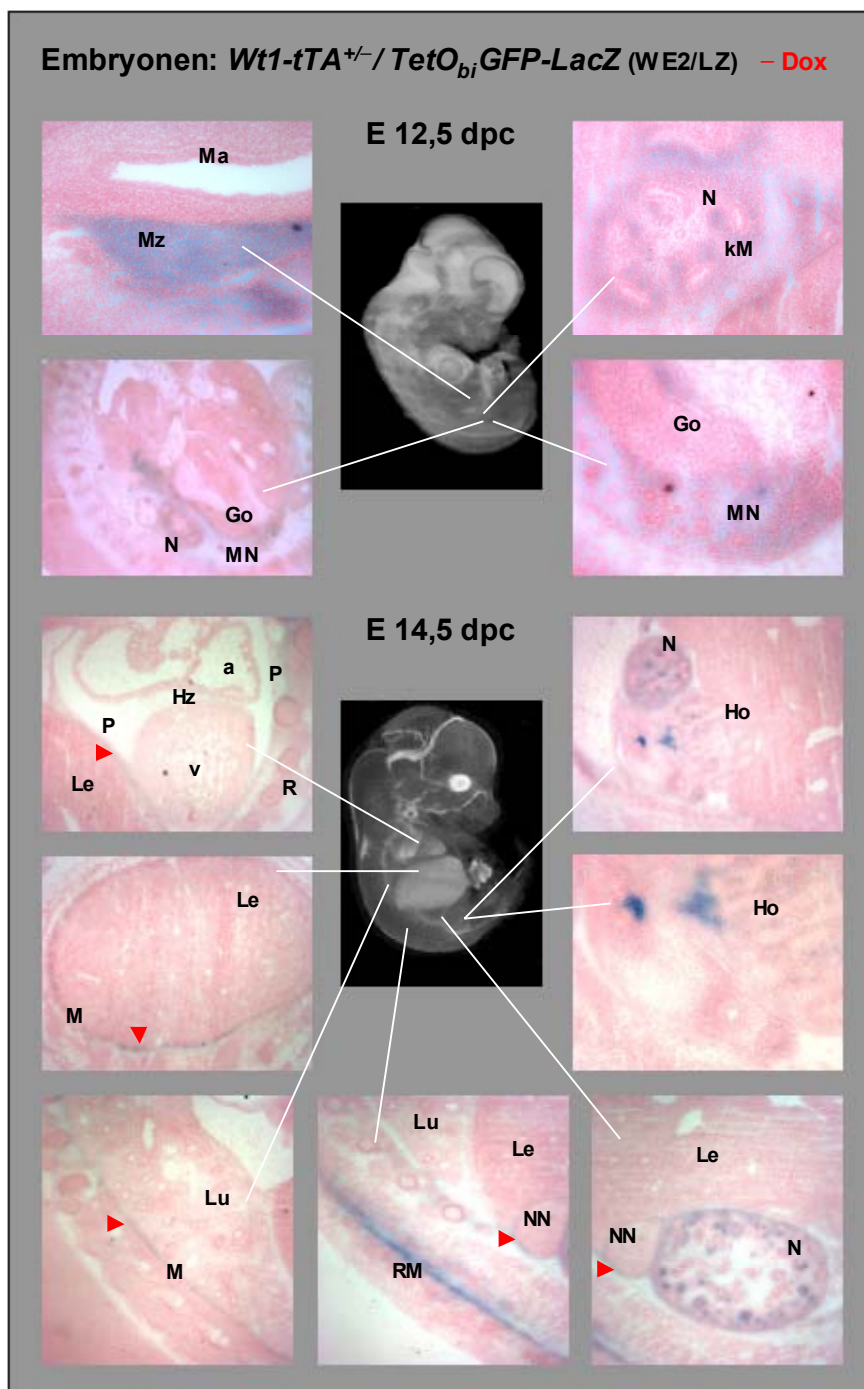


Abbildung 3.46: X-Gal-Färbung auf Kryoschnitten von dtg WE2/LZ-Embryonen der Stadien E12,5 *dpc* und E14,5 *dpc*.

E12,5 *dpc*: Zu sehen sind Signale in der sich entwickelnden Milz und im Urogenitalsystem. In der Niere beschränkt sich die Färbung auf das kondensierende Mesenchym um die verzweigende Ureterknospe. Der degenerierende Mesonephros zeigt ebenfalls eine Färbung. Die angeschnittene Gonade ist frei von Signalen. **E14,5 *dpc*:** Die Fotos links und unten zeigen die *LacZ*-Expression in den die Organe umgebenden Mesothelien (rote Pfeile) der Leber, Lunge, Nebenniere und des Herzens (Perikard). In der Niere sind Signale in den epithelialisierenden Bereichen und den Glomeruli zu sehen. Eine leichte Färbung ist im sich entwickelnden Hoden (Hodenstreifen) zu erkennen. Das stärkere Signal wird der AGM-Region (Aorta-Gonaden-Mesonephros) zugeschrieben. Deutlich zu erkennen ist die Färbung im Rückenmark.

(a): Atrium; (Go): Gonade; (Ho): Hoden; (Hz): Herz; (kM): kondensierendes Mesenchym; (Le): Leber; (Lu): Lunge; (M): Mesothel; (Ma): Magen; (MN): Mesonephros; (N): Niere; (NN): Nebenniere; (P): Perikard; (R): Rippen; (RM): Rückenmark; (v): Ventrikel; Schnittdicke: 12 μ m; Vergrößerung: 7-15x.

Dabei wurde das Alter der Embryonen durch *plug checks* bestimmt und die doppelt transgenen Tiere mittels spezifischer PCR identifiziert. In der Abbildung 3.46 sind die Ergebnisse der Stadien 12,5 *dpc* und 14,5 *dpc* dargestellt. Zur besseren Orientierung über die ungefähre Lage der dargestellten Strukturen im Embryo wurden Abbildungen vergleichbarer Entwicklungsstadien der Internetseite des *Edinburgh mouse atlas project* (*emap*, <http://genex.hgu.mrc.ac.uk/>) entnommen.

Die Untersuchungen der *tTA*-Expression an verschiedenen Embryonalstadien von WE2/LZ-Mäusen bestätigen ein *Wt1*-spezifisches Expressionsmuster auch in der Embryonalentwicklung. In Embryonen des Stadiums E11,5 *dpc* konnten starke Signale in der Urogenitalfalte, dem Mesonephros und den Mesothelien festgestellt werden (Daten nicht abgebildet). Im Embryonalstadium E12,5 *dpc* verhält sich die *LacZ*-Expression analog zur in der Literatur beschriebenen *Wt1*-Expression der Urogenitalregion. Während der Degeneration des Mesonephros (spezifisch gefärbt) ist in der sich entwickelnden Niere (Metanephros) eine deutliche Färbung im kondensierenden Mesenchym zu erkennen. Die Gonaden sind zu diesem Zeitpunkt noch nicht gefärbt. Des Weiteren ist eine Farbreaktion in Bereichen vermutlich unterhalb des Magens zu beobachten. Hierbei handelt es sich möglicherweise um die Milzanlagen. Die Ergebnisse der Analysen von dtg WE2/LZ-Mäusen sind in der folgenden Tabelle zusammen gefasst.

Gewebe		X-Gal positiv		Gewebe		X-Gal positiv	
		Embryonal	Adult			Embryonal	Adult
Gehirn	G	-	-	Niere	N	+	+
Herz	Hz	-	-	Ovar	Ov	n.a.	+
Lunge	Lu	-	-	Uterus	Ut	n.a.	+
Leber	Le	-	-	Hoden	Ho	+	+
Milz	Mz	+	-	Samenblase	Sb	n.a.	+
Thymus	Ty	-	-	Harnblase	Hb	-	-
Knochenmark	Km	n.a.	n.a.	Skelettmuskel	Skm	-	-
Dünndarm	Dd	-	-	Rückenmark	R	+	-
Kolon	Ko	-	-	Mesothelien	M	+	-
Pankreas	Pa	-	-	Perikard	P	+	-
Speicheldrüse	Sd	-	-	Mesonephros	MN	+	-
Mesenterium	Me	-	-	Urogenitalfalte	U	+	-

Tabelle 3.6: Übersicht der Ergebnisse der X-Gal-Färbungen aus WE2/LZ -Mäusen.

Gezeigt ist eine Zusammenfassung der beobachteten *LacZ*-Expression in Embryonen und adulten Mäusen des Genotyps WE2/LZ. Die Tiere waren stringent regulierbar und zeigen ein *Wt1*-spezifisches Expressionsmuster des *tTA*. Die Ergebnisse sind in der Tabelle unabhängig vom genauen Zeitpunkt der Expression dokumentiert. Das Knochenmark wurde nicht untersucht.

(+): Expression/Blaufärbung; (-): keine Expression; (n.a.): nicht analysiert.

3.2.10.3 Nachweis *Wt1*-spezifischer *tTA*-Expression in der murinen Ontogenese

Ausgehend von den oben gezeigten Ergebnissen einer *Wt1*-spezifischen *tTA*-Expression in der Effektor-Mauslinie WE2 sollte mit Hilfe einer weiteren Reporter-Linie zusätzliche Erkenntnisse insbesondere über das Expressionsmuster während der murinen Entwicklung zum adulten Organismus gewonnen werden. Dafür wurden doppelt transgene Tiere des Genotyps WE2/LC1, die bidirektional neben *Luziferase* auch die *Cre-Rekombinase* exprimieren, mit der Mauslinie *ROSA26-Stop^{fllox}-LacZ* (RLZ) verpaart. Diese Linie ist eigentlich ein Cre-Reporter und kann somit indirekt zum Nachweis der *tTA*-Expression verwendet werden. Durch die *tTA*-bedingte *Cre*-Expression wird die Stop-Kassette vor dem *LacZ*-Reportergen entfernt und es kommt zur Transkription der β -Galaktosidase. Dieses Verfahren (*tagging and tracing*) markiert alle Zellen und ihre Nachkommen, die eine *Wt1*-Expression (und damit eine *tTA*-Expression) in der Ontogenese aufweisen, da die *tTA*-induzierte *Cre*-Expression eine nicht reversible Exzision der Stop-Kassette zur Folge hat. Dies bietet die Möglichkeit, neben weiteren Erkenntnissen zur Gewebespezifität von WE2 zusätzliche Informationen zu *Wt1*-Expressionsorten während der murinen Entwicklung zu sammeln. Die Identifizierung dreifach transgener Mäuse (ttg WE2/LC1/RLZ) erfolgte mittels spezifischer PCR (Oligonukleotide: *tTA*, s. o.; LC-1, s. o.; ROSA: Multiplex PCR, ROSA26 1-3, Produktgröße: wt 320 bp, rek 610 bp). Als Kontrolltiere zum Nachweis von Hintergrund wurden LC1/RLZ-Mäuse ohne Effektor untersucht. Ein Vergleich mit Dox-behandelten ttg Tieren erfolgte ebenfalls. Hierfür wurde den Zuchttieren bereits bei der Verpaarung, wie auch in der anschließenden Schwangerschaft und während der gesamten Stillzeit Dox verabreicht (Konz: 4 mg/ml im Trinkwasser). Die Nachkommen wurden noch unter Dox-Administration genotypisiert und erst dann wurde den ttg Mäusen das Doxyzyklin entzogen (Induktion). Nach einer zweimonatigen Karenzzeit zum Ausschleichen der Dox-Wirkung wurden den Versuchstieren die entsprechenden Organe entnommen und davon Kryodünnschnitte angefertigt. Das zu erwartende Expressionsmuster sollte hier den bereits o. g. WE2/LZ-Mäusen entsprechen und die *Wt1*-Expression in adulten Tieren rekapitulieren. Damit wurden für dieses Experiment drei Gruppen von ttg Mäusen untersucht, die im weiteren wie folgt bezeichnet werden: 1) ttg Mäuse immer ohne Dox (**-Dox-Tiere**). 2) ttg Mäuse ständig Dox exponiert (**+Dox-Tiere**). 3) ttg Mäuse, die induziert wurden (**+/-Dox-Tiere**).

Der Nachweis der *tTA*/Cre-vermittelten *LacZ*-Expression erfolgte durch X-Gal-Färbung auf Kryoschnitten. Die Resultate der Charakterisierung der WE2-Linie mit Hilfe der RLZ-Reporter-Mäuse sind in den folgenden Abbildungen 3.47 - 3.55 dargestellt. Die Untersuchung der LC1/RLZ-Kontrolltiere ergab keine Hintergrundfärbung auf den

Organen (nicht abgebildet). Es können somit alle positiven Signale auf eine *Wt1*-entsprechende *tTA*-Expression zurückgeführt werden. Ein Vergleich der nur im adulten Zustand induzierten Gewebe (+/-Dox-Mäuse) mit den Ergebnissen der Reporter-Analysen von WE2/LZ-Mäusen bietet sich an. Beide sollten das *Wt1*-entsprechende Expressionsmuster adulter Mäuse rekapitulieren.

Die X-Gal Färbung der Niere (s. Abb. 3.47) von WE2/LC1/RLZ(-Dox)-Mäusen zeigt eine bis auf wenige Bereiche komplett durchgefärbte Niere. Neben den zu erwartenden Signalen in den Glomeruli sind alle Anteile der Niere, die aus dem metanephrischen Mesenchym hervorgehen, gefärbt. Negative Strukturen sind vermutlich Anteile der Sammelrohre, die ihren Ursprung aus der sich verzweigenden Ureterknospe haben. WE2/LC1/RLZ(+/-Dox)-Mäuse zeigen eine typische *Wt1*-spezifische *tTA*-Expression vermutlich in den Podozyten der Glomeruli.

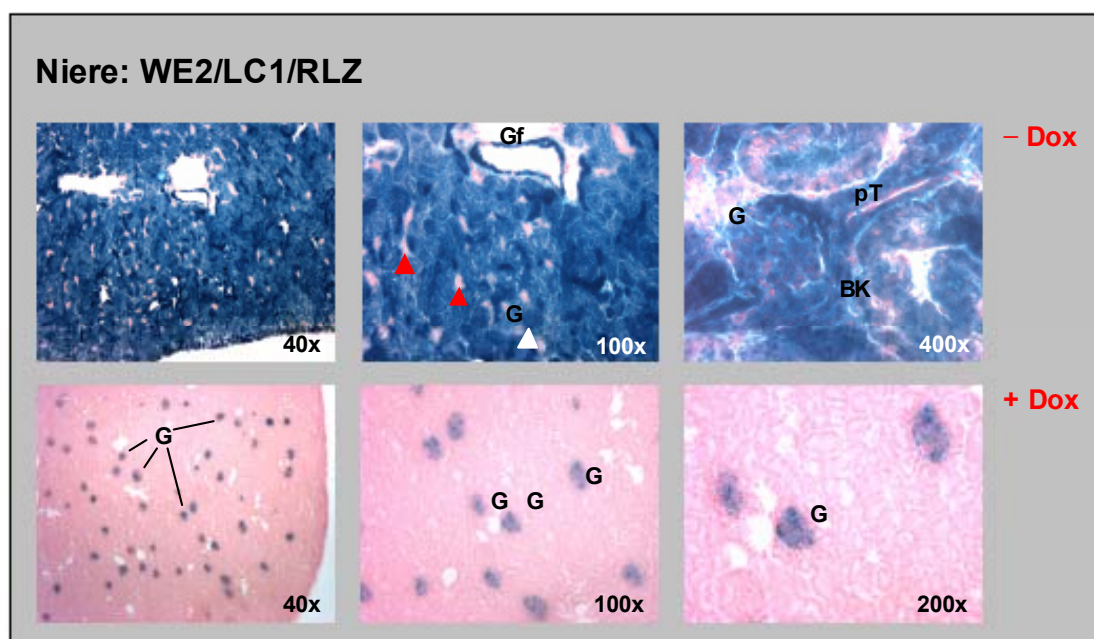


Abbildung 3.47: X-Gal-Färbung auf Kryoschnitten der Niere von WE2/LC1/RLZ-Mäusen.

Oben: Die X-Gal-Färbung der Kryoschnitte von ttg -Dox-Mäusen zeigt bis auf wenige Bereiche (rote Pfeile) eine komplette Blaufärbung der Niere. **Unten:** Der Dox-Entzug (+/-Dox) erst in adulten Mäusen ergibt eine typische der *Wt1*-Expression entsprechende Färbung. Nur die Zellen im Bereich der Glomeruli (vermutlich die Podozyten) zeigen eine *tTA*-Expression. (BK): Bowman Kapsel; (G): Glomerulus; (Gf): Gefäß; (pT): Proximaler Tubulus; Schnittdicke: 12 µm.

In den Hoden von ttg (-Dox)-Tieren (s. Abb. 3.48) werden neben Zellen in den intertubulären Arealen (vermutlich: Leydig-Zellen) auch Zellen innerhalb der Samenkanälchen (vermutlich: Sertoli-Zellen) angefärbt. Dies spricht zunächst für eine Rolle von *Wt1* in der Entwicklung beider Zelltypen (noch nicht beschrieben). Es sei denn, die Signale im Interstitium stellen sich als falsch-positiv heraus oder lassen sich anderen

zellulären Strukturen zuordnen, dann lediglich für eine Funktion von *Wt1* in den Sertoli-Zellen (s. Kap 1.3.6). Anscheinend beschränkt sich diese aber auf einen embryonalen und frühen adulten Zeitraum, da eine *tTA*-Expression in älteren WE2/LZ- bzw. WE2/LC1/RLZ-(+/-Dox)-Mäusen nicht nachgewiesen werden kann. Auch eine Färbung der *Tunica albuginea* und des mesothelialen Epiorchiums kann nicht gezeigt werden. Es gibt definitiv keine Signale in den Keimzellen. Die Präparate von (+/-Dox)-Mäusen sind mit Ausnahme des Epididymis (Nebenhoden: endogene β -Galaktosidase) frei von jeglichen Farbsignalen.

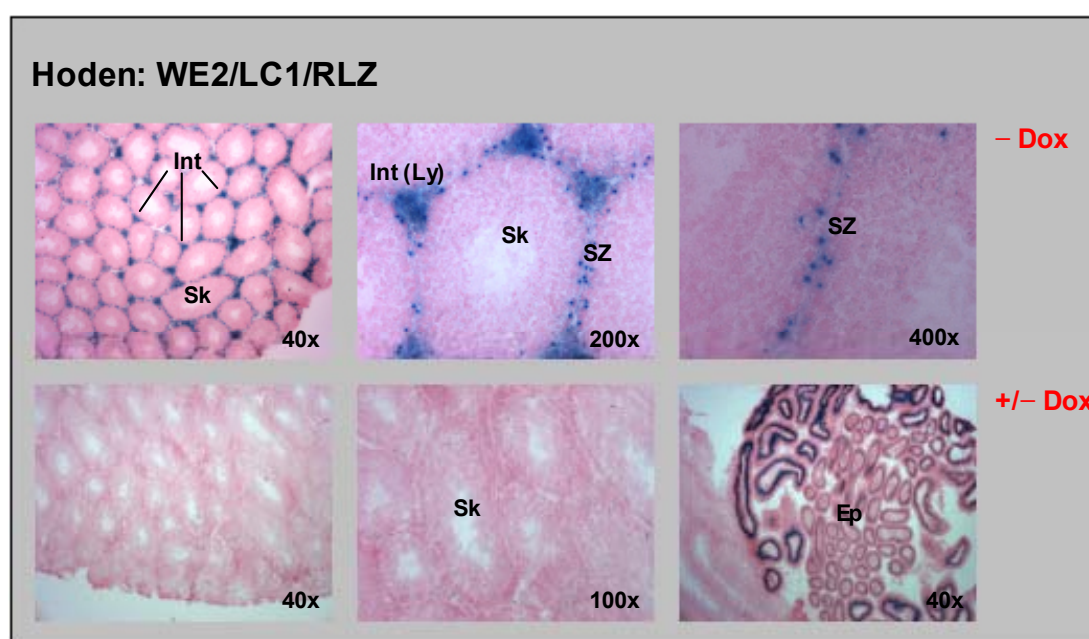


Abbildung 3.48: X-Gal-Färbung auf Kryoschnitten der Hoden von WE2/LC1/RLZ -Mäusen.

Oben: Die Färbung in WE2/LC1/RLZ (-Dox)-Mäusen markiert deutlich Zellen im Interstitium der Hoden (vermutl. Leydig-Zellen), sowie einzelne Zellen innerhalb der Samenkanälchen (vermutl. Sertoli-Zellen). **Unten:** Auf den Schnitten von *ttg* (+/-Dox)-Tieren ist eine *tTA*-Expression weder im Interstitium noch in den *Tubuli seminiferi contorti* nachzuweisen. Signale des Epididymis (unten/ganz rechts, Nebenhoden) sind vermutlich einer endogenen β -Galaktosidaseaktivität zu zuschreiben. (Ep): Epididymis (Nebenhoden); (Int): Interstitium; (Ly): Leydig-Zellen; (Sk): Samenkanälchen; (SZ): Sertoli-Zellen; Schnittdicke: 12 μ m.

Die Samenblase (s. Abb. 3.49) zeigt eine starke Färbung der äußeren Hülle, die als *Tunica muscularis* bezeichnet wird. Dies entspricht auch der *tTA*-Expression in *ttg* (+/-Dox)-Mäusen und in den oben dargestellten Färbungen von Geweben der WE2/LZ-Tiere.

Die Darstellungen des Ovars von WE2/LC1/RLZ(-Dox)-Mäusen (s. Abb. 3.50) zeigen ein ebenfalls nahezu komplett gefärbtes Organ. Dies würde eine *tTA*-Expression während der Entwicklung in Vorläuferzellen von Stroma und Follikeln bedeuten. Darüber hinaus sind Signale in den Bereichen der Granulosa-Zellen zu erkennen. Eine Färbung

der Oozyten kann nicht ausgeschlossen werden. Auf den Schnitten des Ovars von WE2/LC1/RLZ-(+/-Dox)-Mäusen findet man zum ersten Mal die Blaufärbung ausschließlich in Bereichen, die den Granulosa-Zellen zugeordnet werden.

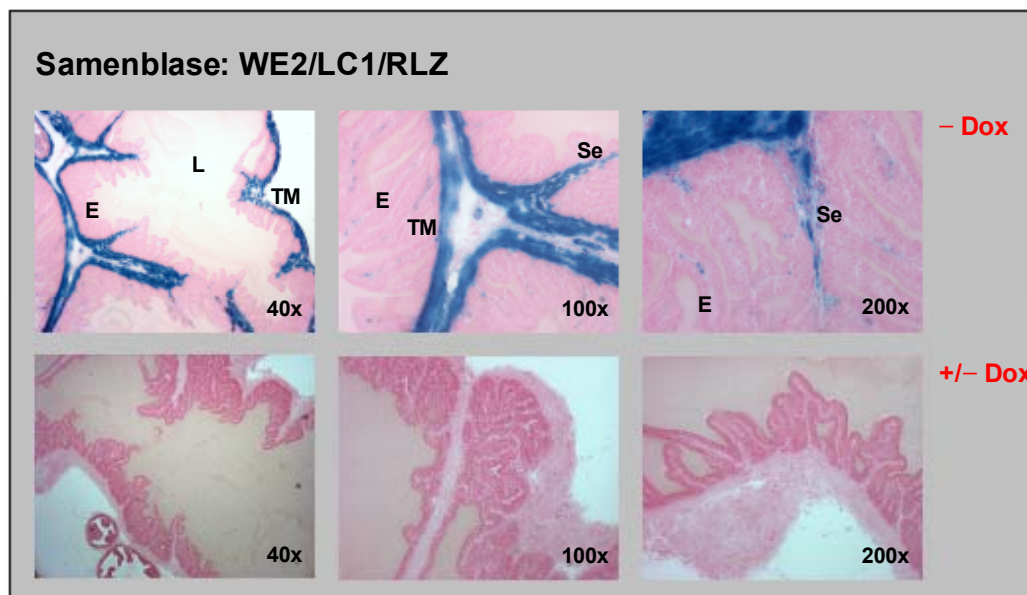


Abbildung 3.49: X-Gal-Färbung auf Kryoschnitten der Samenblase von WE2/LC1/RLZ-Mäusen.

Oben: Zu sehen ist die *Wt1*-abhängige *tTA*-Expression in der *Tunica muscularis* der Samenblase von *ttg* (-Dox)-Mäusen. Diese zieht an mehreren Stellen als Septen ins innere der Blase. Es ist keine Färbung des faltigen Epithels zu erkennen.

Unten: (+/-Dox)-Mäuse zeigen keine Blaufärbung des selben Gewebes.

(E): Epithel; (L): Lumen; (Se): Septen; (TM): *Tunica muscularis*; Schnittdicke: 12 μ m.

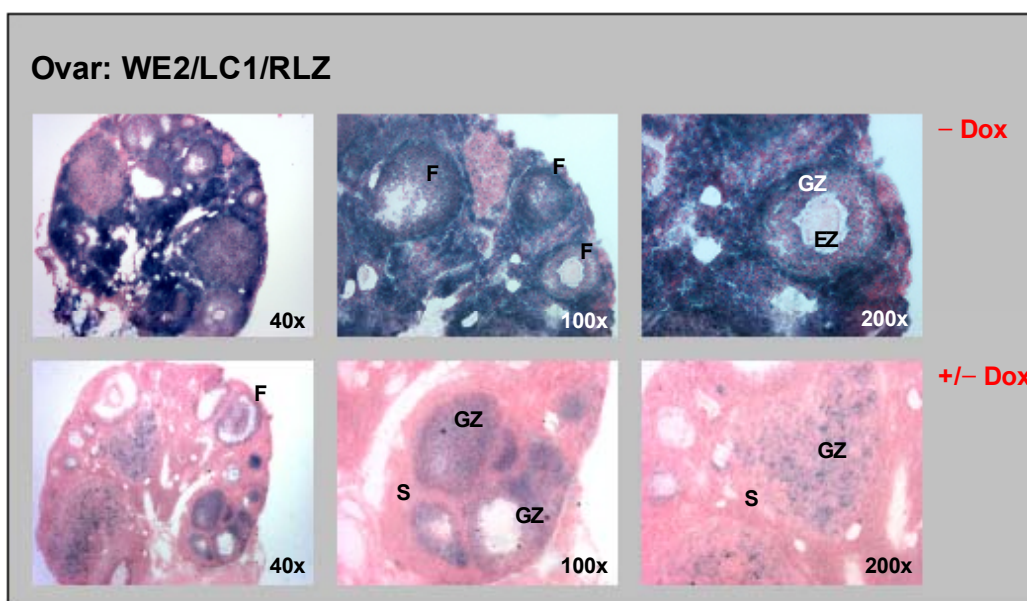


Abbildung 3.50: X-Gal-Färbung auf Kryoschnitten des Ovars von WE2/LC1/RLZ-Mäusen.

Oben: Die X-Gal-Färbung zeigt ein nahezu komplett gefärbtes Ovar einer (-Dox)-Maus. Die *tTA*-regulierte *LacZ*-Expression wurde hier in Bereichen des Stroma und in den Granulosa-Zellen der Follikel nachgewiesen. **Unten:** Ovari von (+/-Dox)-Mäusen zeigen Signale ausschließlich in Bereichen, die Granulosa-Zellen zugeschrieben werden.

(EZ): Eizelle; (F): Follikel; (GZ): Granulosa-Zellen; (S): Stroma; Schnittdicke: 12 μ m.

Auch im Uterus von ttg (-Dox)-Mäusen kommt es zu einer starken Blaufärbung in den verschiedenen Gewebeanteilen. Bei der Betrachtung von innen nach außen, ausgehend vom Lumen, ist eine Färbung des Uterusepithel zugehörig dem Endometrium teilweise sichtbar. Die stromalen Anteile (*Stratum spongiosum*) der *Zona functionalis* des Endometriums zeigen erneut (vgl. WE2/LZ-Mäuse) eine diffuse Färbung, die zellulär nicht näher zugeordnet werden kann. Ebenfalls positiv ist das Myometrium als Uteruswand. Hier werden die Schichten *Stratum submucosum* und *Stratum supravasculare* mit ihren unterschiedlich orientierten Muskelbündeln glatter Muskelzellen angefärbt (s. Abb. 3.51).

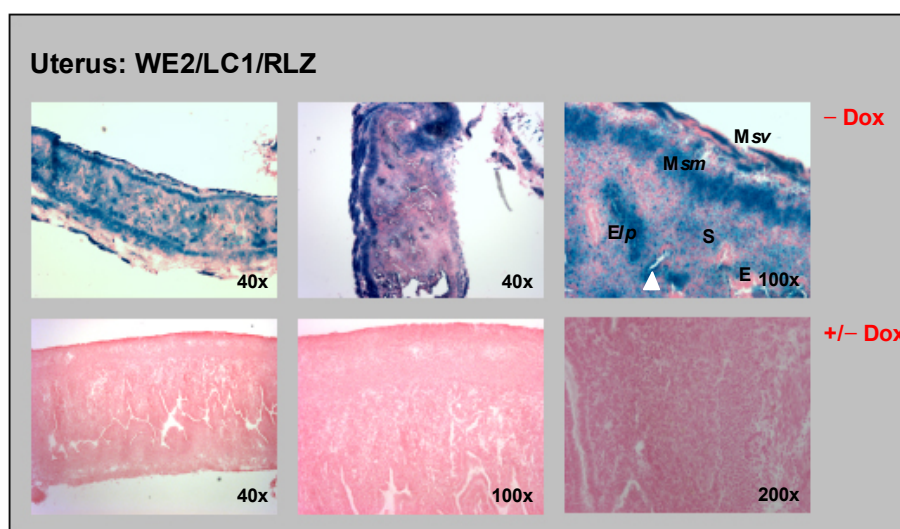


Abbildung 3.51: X-Gal-Färbung auf Kryoschnitten des Uterus von WE2/LC1/RLZ-Mäusen.

Oben: Signale sind in verschiedenen Regionen der Uteri von ttg (-Dox)-Mäusen zu sehen. Diese erstrecken sich über den stromalen Bereich des Endometriums (*Stratum spongiosum* der *Zona functionalis*) bis zu den Schichten des Myometriums (*M. submucosum* und *M. supravasculare*). Eine Färbung im *Stratum compactum* des Endometriums scheint teilweise sichtbar (weiße Pfeilspitze). Die Uteri von (+/-Dox)-Tieren zeigen keinerlei Signale.

(E): Endometrium; (Sc): *Stratum compactum*; (M): Myometrium; (sm): submucosum; (sv): supravasculare; (S): Stroma/*Stratum spongiosum*; Schnittdicke: 12 μ m.

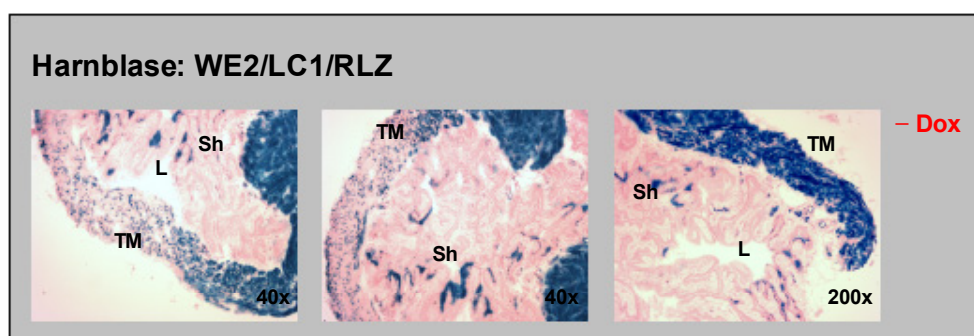


Abbildung 3.52: X-Gal-Färbung auf Kryoschnitten der Harnblase von WE2/LC1/RLZ-Mäusen.

Die Aufnahmen zeigen eine starke Färbung der *Tunica muscularis* der Harnblase. Die vereinzelten Signale im Übergangsepithel der Schleimhaut können zellulär nicht näher bestimmt werden. Es gibt keine Blaufärbung auf (+/-Dox)-Präparaten (nicht abgebildet).

(L): Lumen; (Sh): Schleimhaut; (TM): *Tunica muscularis*; Schnittdicke: 12 μ m.

Auffällig in den untersuchten WE2/LC1/RLZ-Mäusen ist eine prägnante Färbung auf den Kryoschnitten der Harnblase von (-Dox)-Tieren (s. Abb. 3.52). Eine starke *LacZ*-Expression kann hier in der *Tunica muscularis* gezeigt werden (vgl. Samenblase). Die Harnblase von *ttg* (+/-Dox)-Mäusen zeigte keine Blaufärbung (Daten nicht abgebildet).

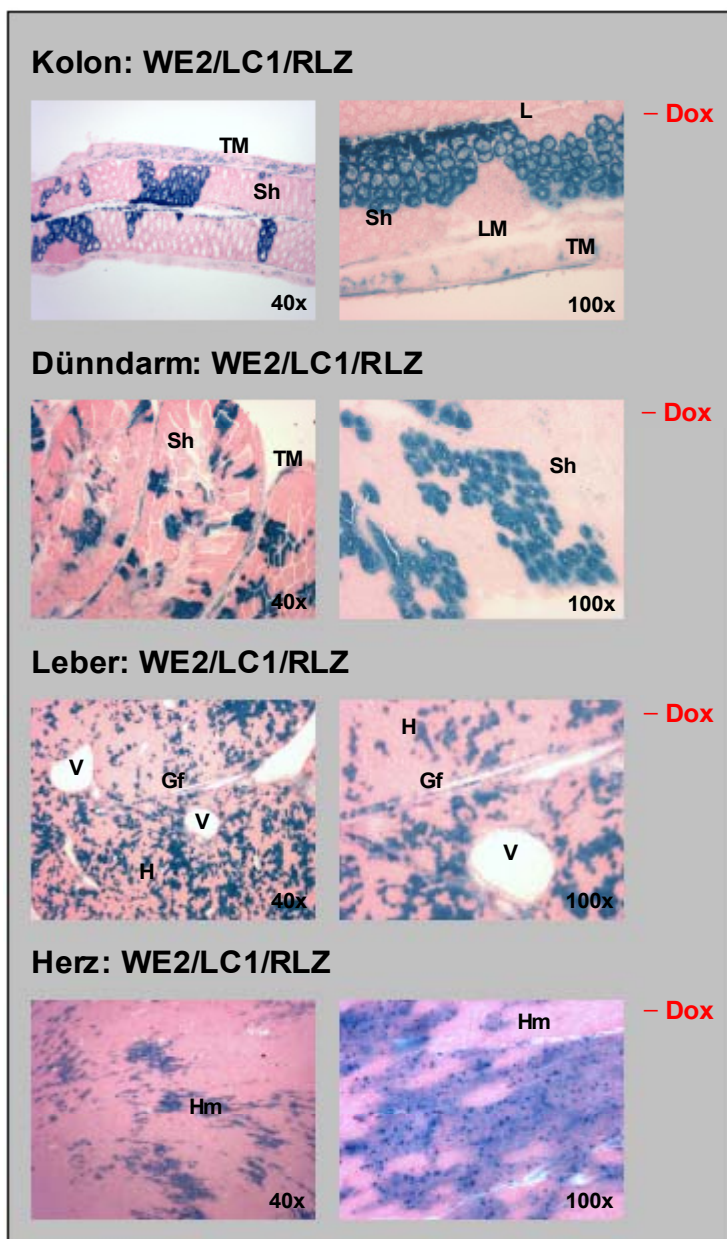


Abbildung 3.53: X-Gal-Färbung auf Kryoschnitten von WE2/LC1/RLZ-Mäusen.

Zusammengefasst sind die Resultate verschiedener Organe von *ttg* (-Dox)-Mäusen. Die jeweiligen Kontrollgewebe (+/-Dox) zeigen keine Signale (nicht abgebildet). **Kolon:** Eine Blaufärbung ist in der glatten Muskulatur der Darmwand zu sehen. Zusätzlich sind begrenzte Bereiche der Schleimhaut gefärbt. **Dünndarm:** Zu sehen sind hier ebenfalls Signale der Muskulatur der Darmwand und begrenzte Regionen der Schleimhaut mit Krypten und Zotten. **Leber:** Als Orte der *tTA*-Expression bei der Entwicklung der Leber sind zum einen Gefäße zu erkennen. Zum anderen sind große Teile des Leber-parenchyms (Hepatozyten) ange-färbt. **Herz:** Die diffuse Färbung auf Teilen der Herzmuskelzellen (Myokard) kann nicht näher zugeordnet werden. Möglicher-weise werden Bereiche des Epikards angeschnitten.

(Gf): Gefäße; (H): Hepatozyten; (Hm): Herzmuskelzellen; (L): Darmlumen; (LM): *Lamina muscularis*; (Sh): Schleimhaut; (TM): *Tunica muscularis*; (V): Venen; Schnittdicke 12 μ m.

In Abbildung 3.53 sind zusätzlich X-Gal-Färbungen von Organen zusammen-gefasst, die im weiteren einer detaillierteren Klärung bedürfen. So wird in Dünndarm und Kolon neben der *tTA*-Expression in der Ringmuskulatur der Darmwand (glatte Muskelzellen) auch ein Signal in einigen Zellklustern von Krypten und/oder Zotten nachgewiesen.

In der Leber (Abb. 3.53) ist in den Aufnahmen des dokumentierten Präparates eine mosaikale Färbung des Leberparenchyms zu erkennen. Die X-Gal-Färbung markiert eine *Wt1*-induzierte *tTA*-Expression in einem Teil der Hepatozyten. Eine genauere Zuordnung der gefärbten Zellen zu speziellen Strukturen der Leber ist zur Zeit nicht möglich.

Auch die Färbung in Bereichen des Herzmuskels ist schwer zu interpretieren. Möglicherweise werden bei diesem Längsschnitt teilweise noch Zellen des Epikards oder daraus sich ableitende Zellen getroffen, für die bereits eine *Wt1*-Expression beschrieben wurde (Moore *et al.* 1999). Vielleicht kann hier ein Querschnitt des Herzens genaueren Aufschluss über die gefärbten Strukturen geben.

Neben den dargestellten Unterschieden gibt es aber auch Gemeinsamkeiten von *tTA*-Expressionsorten in den verschiedenen Organen. So konnte eine Färbung der arteriellen Gefäße in nahezu jedem untersuchten Organ von WE2/LC1/RLZ(-Dox)-Mäusen nachgewiesen werden. Eine Auswahl ist exemplarisch in Abbildung 3.54 dargestellt. Dem Erscheinungsbild nach zu urteilen wird der Anteil der glatten Muskulatur in der Gefäßwand angefärbt. In adulten *ttg* (+/-Dox)-Mäusen dagegen kann kein Signal in den Gefäßen gezeigt werden, was sehr stark auf eine Rolle von *Wt1* in der Vaskulogenese hindeutet (Daten nicht abgebildet).

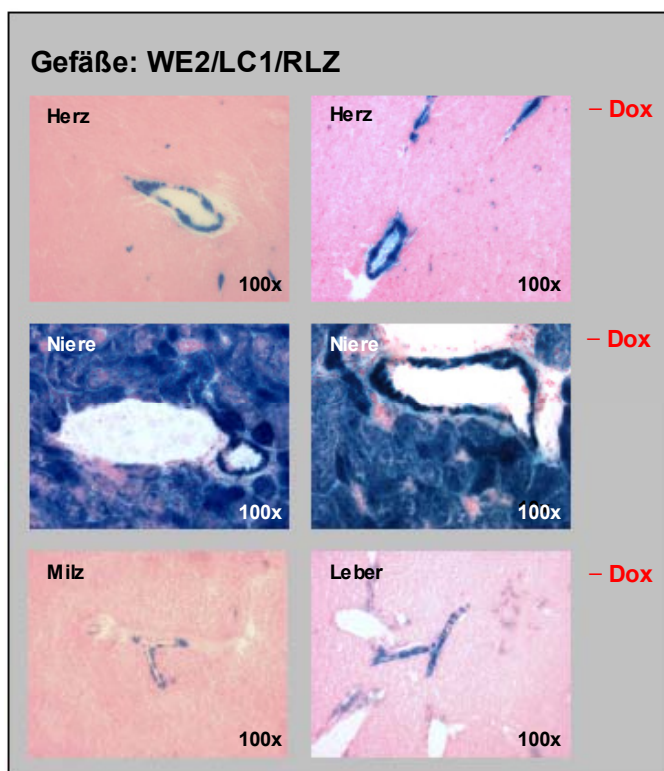


Abbildung 3.54: X-Gal-Färbung in Gefäßen von WE2/LC1/RLZ-Mäusen.

Dargestellt sind X-Gal-Färbungen von Gefäßen aus verschiedenen Organen Dox-unbehandelter Mäuse (-Dox-Tiere). Dabei ist die Färbung im Bereich der glatten Muskulatur der Gefäßwände zu finden. In (+/-Dox)-Geweben waren keine positiven Signale in Gefäßen zu finden. Schnittdicke: 12 μ m.

Die in der Literatur beschriebene *Wt1*-spezifische Expression in den Epithelien peritoneal-gelegener bzw. -entstandener Organe war Anlass des Versuchs, eine *tTA*-Expression in diesen Bereichen nachzuweisen. Dies gelang nur in den unten abgebildeten Organen eindeutig (s. Abb. 3.55). Deutlich sind Färbungen der Milzkapsel, sowie der äußersten Zellschicht des Pankreas und des Hodens zu sehen. Ähnliche Färbungen, aber sehr viel schwächer und teilweise fragmentarisch, ergaben sich auch im Herzen, der Leber, dem Kolon und der Samenblase. Ob es sich bei den in Abb. 3.55 gezeigten Strukturen tatsächlich um den jeweiligen Peritonealepithelüberzug handelt, oder um eine Bindegewebshülle mit einem Anteil glatter Muskelzellen, muss noch geklärt werden.

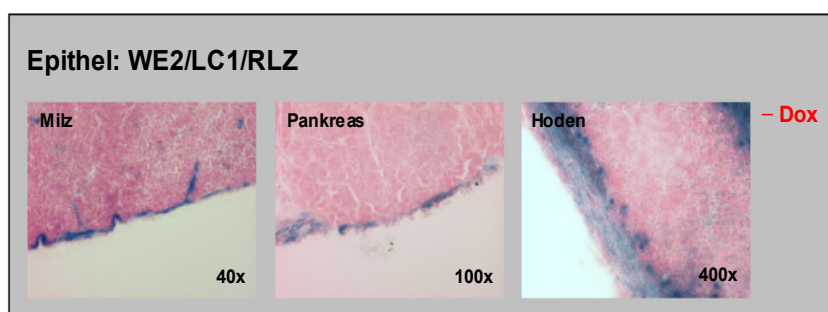


Abbildung 3.55: X-Gal-Färbung in Peritonealepithelien von WE2/LC1/RLZ-Mäusen.

In der Abbildung zusammengefasst sind alle Organe (Milz, Pankreas, Hoden) von ttg (-Dox)-Mäusen bei denen eine Färbung des als Oberflächenepithel interpretierten Bereiches eindeutig nachgewiesen werden konnte.

Schnittdicke: 12 µm.

Die Interpretation der Ergebnisse aus der Charakterisierung der WE2-Effektor-Linie mit RLZ-Reportermausen erscheint etwas schwieriger als in WE2/LZ-Tieren. Zunächst kann eine Dox-abhängige Regulierbarkeit der WE2-Linie erneut bestätigt werden (vgl. -Dox, +Dox und +/-Dox-Mäuse). Darüber hinaus zeigen die Daten ein umfangreiches Spektrum an Informationen zur vermutlich *Wt1*-induzierten *tTA*-Expression während der murinen Ontogenese. Neben den bekannten *Wt1*-positiven Organen des Urogenitalsystems mit einer räumlich und zeitlich sehr genau definierten *Wt1*-Expression, die in WE2-Mäusen durch den *tTA* rekapituliert wird, lässt der Nachweis einer *tTA*-Expression in Bereichen glatter Muskelzellen, u. a. des Darmes und der Gefäße, den Umkehrschluss einer möglichen Beteiligung von *Wt1* in der Vaskularisierung von Organen bzw. der Entstehung von glatter Muskulatur zu. Weitere überraschende Befunde aus Darm und Leber (s. Abb. 3.53) müssen näher untersucht werden.

3.2.11 *Wt1* k.o. Rescue-Versuche

Das abschließende Experiment als Basis zu Herstellung eines Wilms-Tumor-Mausmodells sollte der *Rescue* des durch die Integration des *tTA* am *Wt1*-Lokus

hervorgerufenen *Wt1-knock outs* sein. Hierfür wurden die generierten Linien WE2 (Effektor) und *Wt1-Resp1* bzw. *-Resp2* miteinander verpaart, um doppelt transgene Nachkommen als Ausgangspunkt für die *Rescue*-Verpaarungen zu erhalten.

Wenige Nachkommen v. a. bei der **WE2 x Resp1**-Verkreuzung deuteten erste Probleme mit den Zuchten zur Herstellung der notwendigen Genotypen an. Aus diesen Verpaarungen ergaben sich bisher 29 Tiere, von denen lediglich vier den doppelt transgenen Genotyp WE2/*Resp1* trugen. Davon waren drei Tiere weiblich und eines männlich (3:1). Aus diesen Tieren wurde die bisher einzige *Rescue*-Verpaarung für die *Responder*-Linie1 angesetzt. Es konnten noch keine Nachkommen ausgewertet werden.

Bei den Verpaarungen **WE2 x Resp2** wurden bisher 105 Nachkommen genotypisiert, wobei insgesamt 21 Mäuse doppelt transgen waren. Hier zeigt sich allerdings eine Auffälligkeit bei der Verteilung des Geschlechts der Tiere. 19 Mäuse waren weiblich und lediglich 3 männlich, so dass man bei der Zucht von einer Verschiebung des Geschlechtsverhältnisses ♀:♂ hin zum weiblichen Phänotyp ausgehen muss. Mit jedem der drei Böcke wurden *Rescue*-Verpaarungen angesetzt, die über einen Zuchtzeitraum von einem halben Jahr bisher nur von einem Männchen einmal Nachkommen hatten. In diesem Wurf konnte kein *Rescue*-Tier identifiziert werden. Bis zum Abschluss der Arbeit konnte kein *Rescue* des *Wt1-knock outs* erzielt werden.

*Literatur zur Beurteilung der histologischen Präparate:

Welsch, U., Sobotta, J. (2006): Lehrbuch Histologie – Zytologie, Histologie, mikroskopische Anatomie. 2. Auflage. Elsevier, Urban & Fischer Verlag, München

Hees, H., Sinowatz, F. (1992): Histologie – Kurzlehrbuch der Zytologie und mikroskopischen Anatomie. 2. Auflage. Deutscher Ärzte-Verlag, Köln

Sobotta, J. (2005): Atlas Histologie. (Hrsg.: Welsch, U.), 7. Auflage. Elsevier, Urban & Fischer Verlag, München

Curran, R. C., Crocker, J. (2001) : Atlas der Histopathologie. 5. Auflage. Springer-Verlag Berlin

4. DISKUSSION

Der Wilms-Tumor (Nephroblastom) ist ein frühkindlicher Tumor der Niere und einer der am häufigsten auftretenden soliden Tumore bei Kindern. Er entsteht durch fehlgesteuerte Prozesse der Nierenentwicklung auf Grund genetischer und epigenetischer Veränderungen, die zu einer abnormen Proliferation renaler Blastemzellen führt (Brown und Malik 2001, Satoh *et al.* 2006). Das erste mit der Entstehung von Wilms-Tumoren in Verbindung gebrachte Gen *WT1* codiert für einen Zinkfinger-Transkriptionsfaktor, der außer als Tumorsuppressor auch als wichtiger Regulator in der Embryonalentwicklung fungiert (Call *et al.* 1990, Gessler *et al.* 1990). Eine Schlüsselrolle kommt ihm dabei während der Entwicklung des Urogenitalsystems zu (Pelletier *et al.* 1991 a und b, Park *et al.* 2006). Etwa 10-15 % sporadischer Wilms-Tumore zeigen inaktivierende Mutationen in *WT1*. Darüber hinaus wurde *WT1* auch mit weiteren Tumorerkrankungen wie Mesotheliomen, Ovarialkrebs, Gonadoblastomen, Brustkrebs und Leukämien in Verbindung gebracht (Park *et al.* 1993, Walker *et al.* 1994, Hussong *et al.* 1997, Hylander *et al.* 2005, Silberstein *et al.* 1997, Algar 2002). Die verschiedenen Funktionen von *WT1*, sowie das sehr komplexe Expressionsmuster in unterschiedlichen Geweben während der Embryonalentwicklung, wie auch später im adulten Organismus (s. Kap 1.3.6; Abb. 1.9), deuten die wichtige Rolle des Genprodukts in der Ontogenese, der Homöostase und in der Pathogenese an (Rackley *et al.* 1993, Mundlos *et al.* 1993, Quaggin 2002, Rivera *et al.* 2005, Scott *et al.* 2006). Dies wird durch die 1993 generierte konstitutive *Wt1* *k.o.*-Maus bestätigt: Homozygote Tiere sind embryonal letal und bilden u. a. keine Gonaden und keine Nieren (Kreidberg *et al.* 1993). Bisher konnte noch kein Wilms-Tumor-Mausmodell etabliert werden (s. Kap. 1.3.7).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Grundlage geschaffen eine konditionale *Wt1* *k.o.*-Maus als Wilms-Tumormodell auf Basis des *Tet on/off*-Systems herzustellen. Die räumliche und zeitliche, *Wt1*-spezifische Expression eines tetrazyklinabhängigen Transaktivators (*tTA*) und die nachgeschaltete Steuerung eines *Wt1*-Transgens (*tgWt1*), bei gleichzeitiger Eliminierung von endogenem *Wt1*, sollte es ermöglichen, die kritischen *Wt1*-abhängigen Phasen der Embryogenese zu überwinden. Das Abschalten der *tgWt1*-Expression durch Doxyzyklingabe (*Tet off*) zu definierten Zeitpunkten in der Embryonalentwicklung simuliert den Verlust von *Wt1* durch Mutationen in der sich entwickelnden Niere und sollte so einen Wilms-Tumor initiieren können. Um dies zu erreichen, wurden drei Mauslinien (zwei *tgWt1 Responder*-Linien und eine Effektor-Linie *Wt1-tTA*) separat generiert und zur Umgehung der Letalität eines *Wt1*-Verlustes sukzessive zur *Wt1* *k.o.*-Maus verpaart.

4.1 *Wt1-Responder-Mäuse*

4.1.1 Generierung der Konstrukte und Herstellung der transgenen Mäuse

Ein Problem bei der Herstellung eines *WT1*-Transgens ist die komplexe Struktur von *WT1*, insbesondere die Tatsache, dass dem Organismus, normalerweise vier mögliche, physiologisch bedeutungsvolle Spleißformen (+Exon 5/+KTS, +Exon 5/-KTS, -Exon 5/+KTS, -Exon 5/-KTS), die in den Geweben in einem gleichbleibenden Mengenverhältnis zueinander auftreten, zur Verfügung stehen (Haber *et al.* 1991). Zu Beginn der vorliegenden Arbeit war die Funktion von Exon 5 relativ unklar (s. u.). Die Bedeutung des zweiten Spleiß (+/-KTS), der die Abstände des dritten und vierten Zinkfingers zueinander betrifft und damit Eigenschaften von *WT1* direkt beeinflusst, war bereits genauer untersucht. Aus diesem Grund wurde eine chimäre *Wt1* cDNA (mus *Wt1*^{+Ex 5,+/-KTS}) konstruiert, in die genomische Sequenzen von Intron 9 eingeführt wurden. Diese strukturelle Konzeption basiert auf den Ergebnissen von Bruening *et al.* (1992), die zeigen konnten, dass ein Minigen, bestehend aus Exon 9 (Spleißdonorstelle), 117 Nukleotide von Intron 9 (enthalten die vermutete Verzweigungsstelle) und Teile von Exon 10 (Spleißakzeptorstelle) in COS1-Zellen gespleißt wird. Durch diese Vorgehensweise kann man möglicherweise die zwei wichtigsten Proteinisoformentypen dem Organismus zur Verfügung stellen. Zusätzlich wurde das chimäre cDNA-Konstrukt mit Isolatorsequenzen umgeben, um es gegen mögliche Positionseffekte am Integrationsort abzuschirmen (Fukumura *et al.* 1998, Pikaart *et al.* 1998, Bell *et al.* 1999 und 2001).

Trotz allem verschiebt sich bei einer ungewollten Expression des Transgens das Mengenverhältnis der *WT1*-Proteinisoformentypen *in vivo*. Die geringe Anzahl *Founder*-Tiere bei der Herstellung der transgenen *Responder*-Linien *Wt1-Resp1* (1 aus 42) und *Wt1-Resp2* (1 aus 32) (s. Kap. 3.1.2) könnten ein möglicher Hinweis auf die Folgen einer basalen Expression des Transgens nach der Injektion des Konstruktes in die Vorkerne von befruchteten Oozyten sein. Die niedrige Ausbeute kann nicht allein auf einen ungünstigen Integrationsort, beispielsweise in essenziellen Genen erklärt werden, deren Beeinträchtigung dann zum Absterben der Zygote bzw. des sich entwickelnden Keims führt. Die ungewollte Expression (trotz eingesetzter Isolatoren) von *Wt1*^{+Ex 5,+/-KTS}-Varianten in frühen Stadien der Embryonalentwicklung führt mit Sicherheit zu einer fehlerhaften Regulation von *Wt1*-Zielgenen. Eine breite Expression von *Wt1* in Präimplantationsembryonen von Mäusen, sowohl im Trophoblast als auch im Epiblast, wurde mit immunhistochemischen Nachweismethoden im Zuge von *Nr0b1* (*Dax1*)-

Expressionsstudien nachgewiesen (Clipsham *et al.* 2004). Eine fehlgesteuerte Entwicklung durch eine ungewollte tg*Wt1*-Expression zu diesem Zeitpunkt könnte zum einen die Implantation eines transgenen Embryos in den Uterus verhindern, da die Entwicklung des Trophoblasten gestört wird. Zum anderen wäre die Ontogenese des Keims (Epiblast) direkt betroffen und könnte zu dessen Absterben führen. Beide Möglichkeiten zusammengefasst liefern eine plausible Erklärung für die niedrige Anzahl transgener *Founder* nach der Oozyteninjektion.

Des Weiteren bleibt die Frage offen, ob diese künstlich generierte chimäre tg*Wt1*-cDNA mit ‚nur‘ zwei Spleißvarianten überhaupt das Potenzial hat, einen *knock out* des endogenen *Wt1*-Lokus zu kompensieren und einen *Rescue* zu erzeugen (s. u.). Im Mausmodell konnte bislang gezeigt werden, dass die *Wt1*-Isoformen wichtige zum Teil überlappende Funktionen aufweisen und in der Lage sind, den Ausfall einer Variante teilweise zu ersetzen (Hammes *et al.* 2001). Auch ist die Bedeutung von Exon 5 noch nicht abschließend geklärt. Diskutiert wird eine Rolle bei der Selbstassoziation von WT1 genauso wie die Regulation bestimmter Zielgene, wie z. B. Par-4 über die von Exon 5 codierten Sequenzen (Moffet *et al.* 1995, Reddy *et al.* 1995, Hewitt *et al.* 1996, Richard *et al.* 2001). Da das Spleißen von Exon 5 nur in Säugetieren auftritt (Kent *et al.* 1995), wurde zusätzlich eine Funktion bei säugertypischen Vorgängen, wie Implantation des Embryos oder Laktation angenommen (Zhou *et al.* 1993). Ein entsprechendes Mausmodell, bei dem die Exon 5-Sequenzen deletiert wurden, zeigt allerdings keinen Phänotyp. Die Tiere entwickeln sich normal und sind fertil. Die untersuchten Weibchen zeigen keine Beeinträchtigung des Laktationsverhaltens (Natoli *et al.* 2002 a). Dagegen scheint der Spleiß von Exon 5 die Funktionen der +/-KTS-Formen bzw. die Folgen einer Mutation in der Zinkfinger-Region mitzugestalten. Transgene Mäuse mit einer in DDS-Patienten gefundenen trunkierten (Deletion der Zinkfinger drei und vier), dominant/negativ-wirkenden Form von *Wt1* zeigen nur bei gleichzeitigem Verlust von Exon 5 einen pathologischen Phänotyp in der Niere (Natoli *et al.* 2002b). Der Verzicht auf die -Exon 5-Varianten im transgenen Konstrukt dieser Arbeit hat möglicherweise Folgen, die im Vorfeld noch nicht zu erkennen waren.

Im Zuge dieser Arbeit konnten nach Herstellung der beiden entsprechenden Konstrukte zwei *Responder*-Linien etabliert werden (*Wt1-Resp1* mit Isolatoren und *Wt1-Resp2* ohne Isolatoren, s. Kap. 3.1.1 bis 3.1.4; Abb. 3.2 und 3.3). Beide Mauslinien wurden im Anschluss auf unterschiedliche Weise auf ihre Funktionalität hin überprüft. Es sollte eine gesteuerte Dox-induzierbare Regulierbarkeit des Transgens gewährleistet sein. Für beide Linien konnte der Nachweis einer *tTA/rtTA*-abhängigen (Dox-regulierbaren) Expression des tg*Wt1* erbracht werden. Zusätzlich konnte das alternative Spleißen der

chimären *Wt1* cDNA (+/-KTS-Form) gezeigt werden. Für die Linie *Wt1-Resp1* gelang dies anhand eines MEF-Assay (s. Kap. 3.1.5.2) und in Versuchen mit Hilfe von Effektor-Linien (*LAP-tTA*, s. Kap. 3.1.5.3). Für die Mäuse der Linie *Wt1-Resp2* wurde Induzierbarkeit und Spleißbarkeit auf RNA-Ebene im MEF-Assay durch transiente Transfektion der Zellen mit einem *rtTA*-Effektorplasmid nachgewiesen (s. Kap. 3.1.5.2). Ungünstigerweise zeigen die Analysen zur Funktionalität der transgenen *Responder*-Linien Lücken, da ursprünglich geplant war, mit jeder Linie alle Nachweismöglichkeiten auszuschöpfen. Hoher Arbeitsaufwand, zeitliche Beschränkungen, Versuchswiederholungen und mangelnder Platz in den Tierställen ließen dieses Vorhaben scheitern. Sinnvoll allerdings wäre ein Nachweis der ektopten *tgWt1*-Expression in der Leber auf Proteinebene im *Western Blot* gewesen, um die Translation der eingeführten cDNA zu beweisen.

4.1.2 Zucht der *Responder*-Linien

Verschiedene, zum Teil unterschiedlich zu bewertende Beobachtungen bei der Generierung (s. o., geringe Anzahl transgener *Founder*), beim Erhalt und bei der Zucht der *Responder*-Linien (s. u.) im Hinblick auch auf die Erzeugung einer konditionalen *Wt1* *k.o.*-Maus, weisen auf Problematiken bei der Manipulation entwicklungsrelevanter Gene hin. Die Beteiligung von WT1 an der Urogenitalentwicklung hat bei einem durch das Transgen gestörten Expressionsmuster nicht nur Folgen für die Nierenentwicklung und die Herstellung eines Wilms-Tumormodells, sondern möglicherweise auch für die Geschlechtsdeterminierung, die Gonadalentwicklung, die Fertilität und damit zwangsläufig auch für die Zucht der Tiere.

Es gelang bisher nicht, homozygote *Responder*-Linien zu etablieren. Die Zucht scheiterte bislang mit der ersten Generation homozygoter Tiere und ist vermutlich die Folge einer sehr frühen Infertilität der Tiere. *Incross*-Verpaarungen homozygoter *Responder*-Mäuse ergaben bislang keine Nachkommen. So wäre dieser Phänotyp durch eine ungewollte basale Expression (*Leakage*) des Transgens zu erklären, da es sich um einfach transgene Linien handelt, in denen noch kein Effektor die Kontrolle des Transgens reguliert. Die aberrante Expression der *Wt1*-Isoformen könnte vom Organismus nicht mehr zu kompensieren sein und zur Infertilität führen (s. u.). Der momentane Bestand der Tiere müsste unter diesem Gesichtspunkt, beispielsweise mittels RT-PCR auf RNA-Ebene, erneut auf die basale Expression der eingebrachten cDNA überprüft werden.

Andererseits kann aber auch eine ungünstige Integration des Transgens in essenziellen Genen nicht ausgeschlossen werden, wobei der Effekt nun erst in der Homozygotie der Tiere und einem möglichen Ausfall eines von der Integration des Transgens betroffenen Gens zum Tragen käme. Solange dies nicht geklärt ist, kann die

Erhaltungszucht der Mäuse nur im heterozygoten Status erfolgen, um den Verlust der Linien zu vermeiden. Leider schmälert dies aber auch den Prozentsatz erwünschter Genotypen bei der Generierung doppelt transgener Tiere (*Wt1-tTA/Resp*) auf dem Weg zur konditionalen *Wt1* k.o.-Maus.

4.1.3 *Wt1* k.o. Rescue-Versuche

Die zielgerichtete Generierung doppelt transgener Mäuse für die *Wt1* k.o. Rescue-Verpaarungen ergab erste Schwierigkeiten bei der Zucht der Tiere. Bei der Kreuzung von Mäusen der *Wt1*-Effektor-Linie (*Wt1-tTA*, WE2) mit der *Responder*-Linie (*Wt1-Resp2*) kommt es beim Auszählen der Genotypen zum Auftreten einer auffällig hohen Zahl doppelt transgener Weibchen (*Wt1-tTA/Resp2*) im Verhältnis zu entsprechenden Männchen (19:3 aus 105 Mäusen, s. Kap. 3.2.11). Augenscheinlich ergibt sich eine drastische Verschiebung bei der Geschlechtsentwicklung der Mäuse hin zum weiblichen Phänotyp. Sollte dies eine Folge der *Wt1*-Manipulation der Tiere sein, sind folgende Varianten zu diskutieren:

1) Bei einer Induktion des Transgens durch den tTA kommt es zu einer Beeinträchtigung des endogenen *Wt1*-Expressionsmusters durch einen Überhang an *Wt1*^{+Ex 5;+/-KTS}-Proteinisofomen, hervorgerufen durch die erfolgreiche Expression des Transgens.

2) Dagegen müsste, sollte das Transgen mittlerweile nicht mehr zu regulieren sein (sog. *Silencing* des Transgens, s. u.), das verbliebene endogene *Wt1*-Allel den Verlust von *Wt1*-Proteinisofomen in der Gonadalentwicklung eigentlich kompensieren können. Bisher wurden noch keine Auffälligkeiten im Verhältnis von Männchen und Weibchen bei der Geschlechtsdifferenzierung heterozygoter *Wt1*^{+/-}-Mäuse beschrieben (Kreidberg *et al.* 1993). *Wt1*^{+/-}-Tiere entwickeln sich normal. Langzeitstudien und Zuchten auf anderen genetischen Hintergründen ergaben lediglich eine erhöhte Anfälligkeit dieser Mäuse für Nierendefizite (Glomerulosklerose) und das Auftreten von Sterilität in heterozygoten weiblichen 129/Sv-Mäusen (Menke *et al.* 2003, Kreidberg *et al.* 1999).

Richtet man den Fokus nun zunächst auf die Rolle von WT1 in der Geschlechtsdeterminierung und -differenzierung, liefern beide o. g. Möglichkeiten plausible Erklärungen wie sich die *Wt1*-Transgenintegration in diesen Prozessen auswirkt.

Die Expression von *Wt1* ab Tag 9,5 *dpc* im Mesonephros und der Genitalfalte (beides Vorläufergewebe der späteren Gonaden) sich entwickelnder Mausembryonen bewahrt beide Gewebe vor der Apoptose (Kreidberg *et al.* 1993). Sie bleibt in den sich

differenzierenden Gonaden (deutlich sichtbar ab Tag 12,5 *dpc*) in beiden Geschlechtern in den Nährzellen (Sertoli-Zellen/Hoden und Granulosa-Zellen/Ovar) bis ins adulte Tier erhalten (Pelletier *et al.* 1991b, Armstrong *et al.* 1992, Rackley *et al.* 1993). WT1 scheint also nicht der Schlüsselregulator der Geschlechtsdifferenzierung zu sein, wohl wird ihm aber eine bedeutende Rolle bei der Modulation entscheidender Schritte in der Gonadalentwicklung hin zur Spezifizierung bestimmter Zelltypen (Sertoli- und Granulosa-Zellen) eingeräumt (s. Abb. 4.1, Swain *et al.* 2002, Morrish *et al.* 2002, Park *et al.* 2005 a).

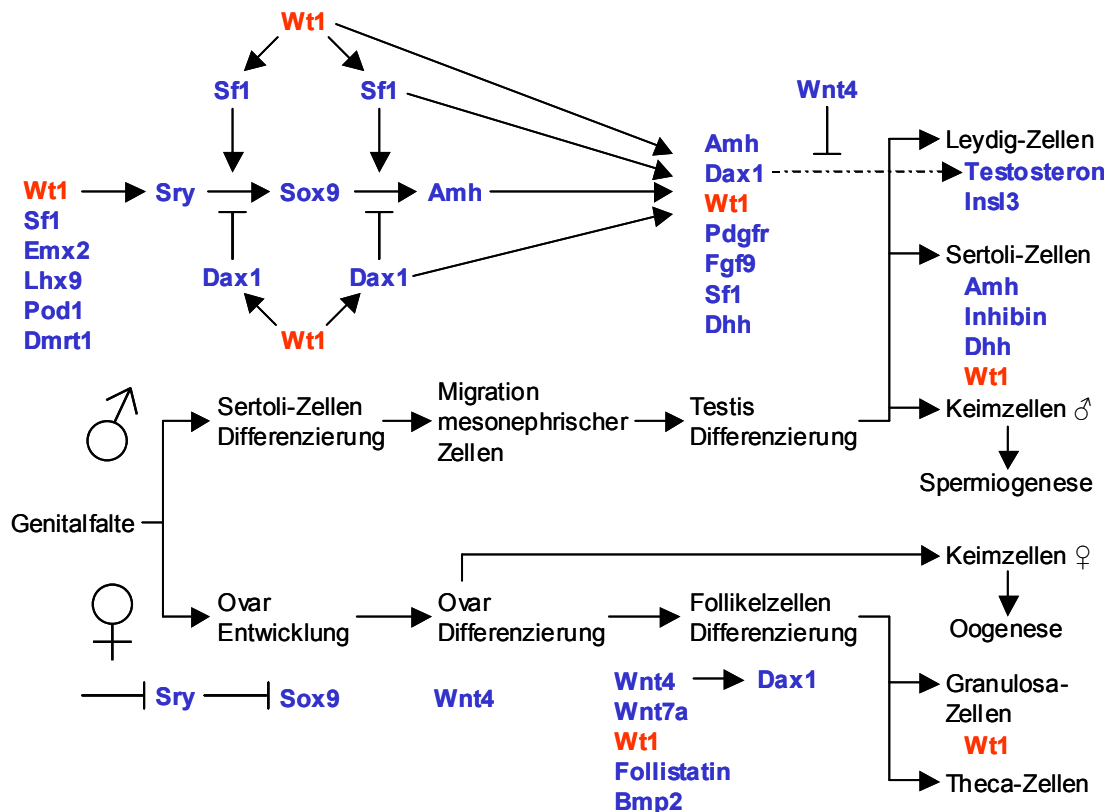


Abbildung 4.1: Vereinfachte Darstellung der in die Gonadalentwicklung involvierten Signalwege.

In der undifferenzierten Gonade (Urogenitalfalte) schafft die Expression von Genen wie *Emx2*, *Lhx9*, *Pod1*, *Dmrt1*, *Wt1* und *Sf1* die Voraussetzung für eine *Sry*-Expression. *Wt1*, *Sf1* und *Dax1* modulieren die durch *Sry*-bedingte Expression von *Sox9* und *Amh* in Sertoli-Zellen, mit deren Determinierung und Differenzierung die männliche Gonadenentwicklung voranschreitet. Zusätzliche Faktoren wie *Pdgfr*, *Fgf9*, *Dhh* sind in die Differenzierung von Sertoli-, Leydig- und Keimzellen involviert. *Dax1* hat direkten Einfluss auf die Expression von Genen zur Steroidhormonbildung. Bei der Entwicklung der weiblichen Gonade kommt es zu einem Block von *Sry* und *Sox9* und einer Aktivierung von *Wnt4*. Weitere Schlüsselfaktoren sind *Fst*, *Bmp2* und *Dax1*. (Abbildung bearbeitet nach Park und Swain.)

Die frühe Expression von *Wt1* in der Genitalfalte scheint u. a. die Expression von *Sry* (*sex determining region on the Y chromosome*), dem Schlüsselgen der männlichen Geschlechtsdifferenzierung, das ausschließlich in der Genitalfalte zu einem genau definierten Zeitpunkt exprimiert wird (Tag 10,5-12,5 *dpc*), zu ermöglichen (Hacker *et al.* 1995, Jeske *et al.* 1995, Shimamura *et al.* 1997, Swain *et al.* 2002, Park *et al.* 2005 a). Dies hat eine erhöhte Expression von *Sox9* (*Sry-related HMG-Box gene 9*), einem mit der

Entwicklung von Sertoli-Zellen assoziierten Zielgenen von Sry zur Folge (Kent *et al.* 1996, Morais da Silva *et al.* 1996). Diese Genkaskade führt zur fortschreitenden Differenzierung der männlichen Gonaden durch die Entwicklung von Sertoli-, Leydig- und Keimzellen und damit zur Expression weiterer geschlechtsdeterminierender Gene, wie *Amh* (*Anti-Mullerian hormone* bzw. *Mis*, *Mullerian-inhibiting substance*) und *Dhh* (*Desert hedgehog*; beide in Sertoli-Zellen), *Testosteron* und *Insl3* (*Insulin-like 3*; beide in Leydig-Zellen). Die Entstehung von Sertoli-Zellen in der Gonadenentwicklung ist ein Schlüsselschritt hin zum männlichen Phänotyp (Swain *et al.* 2002, Morrish *et al.* 2002, Park *et al.* 2005 a).

Sry und Sox9 sind Gene, deren Expression einen bestimmten Schwellenwert überschreiten muss, um funktionell wirksam zu werden. Ihre Regulation wird durch ein fein abgestimmtes Netzwerk von Transkriptionsfaktoren gesteuert. Antagonisten scheinen hier die Produkte von *Sf1* (*Steroidogenic factor 1*, aktivierende Funktion) und *Dax1* (*Dosage-sensitive sex reversal, adrenal hypoplasia congenital critical region on the X chromosome, gene 1*, reprimierende Funktion) zu sein (Ito *et al.* 1997; Lalli *et al.* 1997, Park *et al.* 2005 a). Die Expression beider Gene wird von Wt1 reguliert. Zusätzlich spielt Wt1 höchst wahrscheinlich eine Rolle als transkriptioneller Co-Faktor von Sf1 bei der Modulation wichtiger Schritte der männlichen Geschlechtsentwicklung (Kim *et al.* 1999, Wilhelm *et al.* 2002, Swain *et al.* 2002, Park *et al.* 2005 a). Unterbleibt diese notwendige Determinierung und Differenzierung hin zum männlichen Phänotyp aus irgendeinem Grund, entwickelt sich der Säugerembryo generell als Weibchen.

Der Ausfall eines *Wt1*-Allels durch den *tTA-knock in* verringert die Gesamtmenge an WT1, während die *tgWt1*-Expression durch die eingeführte cDNA das endogene Mengenverhältnis der *Wt1*-Proteinisoformen verschiebt. Dies hat unter Umständen direkten Einfluss auf die notwendigen genauen Expressionsmuster und Signalkaskaden bei der Geschlechtsdifferenzierung und der Gonadalentwicklung und wäre eine Erklärung für die ungleiche Geschlechterverteilung in doppelt transgenen Tieren. Möglicherweise repräsentiert der Phänotyp einer XX/XY-Verschiebung des Geschlechterverhältnisses die milde Form der Verhältnisse, wie sie in den mit *WT1*-Mutationen assoziierten Denys-Drash- (DDS) und Frasier-Syndromen (FS) auftreten (s. Kap. 1.3.2).

Das Denys-Drash-Syndrom wird durch Mutationen in der Zinkfinger-Region von *WT1* hervorgerufen, welche zu trunkierten WT1-Proteinen führen, die durch einen dominant-negativen Effekt eine Reduktion bzw. den Verlust der WT1-Funktion bewirken (Bardeesy *et al.* 1993, Patek *et al.* 1999, Natoli *et al.* 2002, Patek *et al.* 2003). Im Frasier-Syndrom ist die Spleißdonorstelle von Exon 9 von Mutationen betroffen, was zum Verlust der *Wt1*^{+KTS}-Varianten führt (Barboux *et al.* 1997, Klamt *et al.* 1998). In entsprechend veränderten Mäusen kommt es sogar zu einer komplett falschen Ausprägung des

chromosomalen Geschlechts (*XY sex reversal*) und einer Feminisierung durch die Reduktion der *Sry*-Expression (Hammes *et al.* 2001). Beide Syndrome zeigen neben schweren Nierendefekten auch Folgen bei der Geschlechtsdifferenzierung, wie Gonadenfehrentwicklung, XY-Hermaphroditismus (DDS) und XY-Geschlechtsumkehr (FS) (Scott *et al.* 2006).

Der Zustand in *Wt1-tTA^{+/-}/Resp2*-Mäusen entspricht (je nach Situation von *Silencing* oder Expression des Transgens) in nicht ganz so extremer Form der Ausgangslage bei DDS oder FS. Beim *Silencing* der eingeführten *Wt1*-cDNA kommt es zu einer Reduktion von *Wt1*-Isoformen, was allerdings (vgl. heterozygoter *Wt1 k.o.*) keinen Phänotyp zeigen sollte. Kommt es aber bei normaler Expression zu einem falschen Spleißereignis im Transgen (Überspleißen vom -KTS-Zustand zum β -Globin Intron 2, s. Abb. 3.4) und dem Verlust von Exon 10 (gleichbedeutend mit der Ablation des vierten Zinkfingers), entsteht eine trunkierte, transgene *Wt1*-Form, die möglicherweise einen dominant/negativen Effekt ausübt (vgl. DDS). Nimmt man dagegen ein fehlerfreies Spleißen an, wird auch hierbei das Mengenverhältnis hin zu *Wt1^{+Exon 5;+/-KTS}*-Varianten verschoben (vgl. FS), wobei die +KTS-Isoformen scheinbar für die Steuerung der Expression von *Sry*, die -KTS-Formen dagegen für eine korrekte Expression von *Sf1* und *Dax1* verantwortlich sind (Hammes *et al.* 2001, Kim *et al.* 1999, Wilhelm *et al.* 2002). Sollte die Geschlechtsausprägung auf die Wirkung des Transgens zurückzuführen sein, müssten unter den phänotypisch weiblichen Tieren XY-Genotypen (genetische Männchen) sein. Dies wird zur Zeit mit Hilfe einer PCR zur Identifizierung des auf dem Y-Chromosom gelegenen *Sry*-Gens überprüft.

Denkbar ist auch eine Konsequenz für die Fertilität der Mäuse, wenn durch die aberrante *Wt1*-Expression die Regulation von *Sry*, *Sf1* und *Dax1* und als Folge davon entscheidende Zielgene der Keimzellentwicklung fehlgesteuert wären (Chang *et al.* 2004, Jorge *et al.* 2004). Eine Ablation von *Wt1* in Sertoli-Zellen durch einen entsprechenden RNAi-Ansatz (*RNA interference*) führt zur Apoptose der Keimzellen, einer gestörten Spermatogenese und damit zur Beeinträchtigung der Fertilität bei Mäusen (Rao *et al.* 2006).

Als eine weitere Möglichkeit des zahlenmäßig geringeren Auftretens von Männchen muss auch eine erhöhte Letalität beim XY-Genotyp in Betracht gezogen werden.

Bis zum Abschluss dieser Arbeit konnte noch kein *Wt1 k.o.-Rescue* mittels der generierten *Wt1*-Effektor- und *Responder*-Mauslinien erzielt werden. Damit verzögert sich auch der Ansatz zur Herstellung einer konditionalen *Wt1 k.o.*-Maus als mögliches Wilms-Tumormodell. Es wurden bislang vier *Rescue*-Verpaarungen angesetzt (eine mit der Linie *Wt1-Resp1*, drei mit doppelt transgenen Tieren der Linie *Wt1-Resp2*). Nur ein Zuchtpaar

(*Wt1-tTA/Resp2*) davon hatte Nachkommen, woraus kein *Rescue*-Tier resultierte. Über einen Zeitraum von sechs Monaten konnten aus den Verpaarungen keine weiteren Würfe gewonnen werden (s. Kap. 3.2.11).

Bei der Untersuchung der Nieren zweier Zuchtpaare (*Wt1-tTA/Resp1* und *Wt1-tTA/Resp2*) auf RNA-Ebene, konnte kein Nachweis transgener RNA mittels RT-PCR erbracht werden (Daten nicht abgebildet). Dies führt zu der Annahme einer transkriptionellen Stilllegung (*Silencing*) des Transgens in den Linien. Das Auftreten eines unilateralen sporadischen Nierentumors (möglicherweise eines Wilms-Tumors, Daten ebenfalls nicht abgebildet) in einem der Tiere (♀ *Wt1-tTA/Resp2*) unterstützt diesen Befund. Beim *Silencing* des Transgens käme es durch den *knock in* des *tTA* am *Wt1*-Lokus zum Verlust eines Allels. Eine zweite Mutation im verbliebenen endogenen *Wt1*-Allel würde einen kompletten *Wt1-knock out* bedeuten und könnte einen Wilms-Tumor hervorrufen. Die Sequenzierung der *Wt1*-Exone erbrachte keinen Befund hinsichtlich einer Mutation in codierenden Bereichen von *Wt1*. Vielleicht führt aber allein die Verschiebung des Mengenverhältnisses, in dem die *Wt1*-Spleißformen relativ zueinander exprimiert werden, zur Entwicklung des Tumors, wie dies in einer Publikation von Liu *et al.* (1999) bereits beschrieben wurde.

Die Verwendung von Isolatoren aus dem humanen *β-Globin*-Lokus (Fukumura *et al.* 1998, ursprünglich charakterisiert von Fleenor *et al.* 1993) zum Schutz des Transgens vor Positionseffekten am Integrationsort sollte eigentlich helfen, den Effekt des *Silencing* in der *Responder*-Linie *Wt1-Resp1* zu minimieren bzw. zu verhindern (Bell *et al.* 1999 und 2001). Arbeiten von Pikaart *et al.* (1998) zeigen das Potenzial eines *β-Globin*-Isolators (Chung *et al.* 1997) aus dem Huhn, der eine transkriptionelle Inaktivierung des Transgens verhindert. Eingeführte Transgene ohne Isolatoren dagegen zeigen häufig den Verlust eindeutiger Eigenschaften von aktivem Chromatin, wie Nukleasezugänglichkeit, DNA-Hypomethylierung und Histon-Hyperacetylierung. Weitere Experimente an transgenen Zellkulturen ergaben eine durchschnittliche Stilllegung eingeführter Transgene nach 80-100 Tagen in Kultur, wobei gezeigt werden konnte, dass Isolatoren dies verhindern können. Sie fungieren als Blockade gegen *Enhancer*- und *Silencer*-Elemente, sowie als Schutz vor einer Kondensation des Chromatins (Burgess-Beusse *et al.* 2002). Allerdings schützen die Isolatoren nicht zwingend vor einer CpG-Methylierung der verwendeten Promotoren und einer dadurch ausgelösten transkriptionellen Inaktivierung (Bell *et al.* 1999, Mutskov *et al.* 2004).

Beide *Responder*-Mauslinien befinden sich – bedingt durch den Zeitpunkt ihrer Herstellung, Embryotransfer und Rückkreuzungen – mindestens in der zwölften

Generation seit ihrer Herstellung und eine Inaktivierung durch Methylierung der Promotorregion, die eine Bindung des tTA verhindern würde, ist auch für die Linie *Wt1-Resp1* (mit Isolatoren) möglich. Beide Mauslinien sollten zum Abschluss eventuell nochmals auf ihre Induzierbarkeit *in vivo*, beispielsweise durch erneute Verpaarungen den eigenen Effektor-Mäusen, überprüft werden.

Zusätzlich scheinen die doppelt transgenen Tiere von einem Phänomen der relativ frühen Infertilität betroffen zu sein, das ebenfalls für transgene Tiere bekannt ist (Silver 1995, Schenkel 1995). Nur eines von vier Zuchtpaaren hat überhaupt Nachwuchs bekommen, so dass der Zeitpunkt der Zusammenführung der Tiere/Genotypen möglicherweise zu spät erfolgt. Verpaarungen zur Herstellung doppelt transgener Mäuse oder bei der Zucht zum Erhalt der Linien müssen früher angesetzt werden. Auch dies muss bei ergänzenden Versuchen zur Generierung einer konditionalen *Wt1 k.o.*-Maus berücksichtigt werden.

4.2 Wt1-Effektor-Mäuse

4.2.1 Herstellung der Effektor-Linie

Für die Erzeugung einer *Wt1*-Effektor-Mauslinie wurde die cDNA des tetrazyklinabhängigen Transaktivators (*tTA*) durch homologe Rekombination in ES-Zellen unter die Kontrolle des endogenen *Wt1*-Promotors gebracht. Dies sollte eine *Wt1*-spezifische Expression des *tTA* gewährleisten und so die entsprechende zeitliche und räumliche Expressionsregulation eines *tTA*-abhängigen Transgens ermöglichen. In Kombination mit den ebenfalls generierten *tgWt1 Responder*-Mäusen sollte so eine konditionale *Wt1 k.o.*-Maus als Wilms-Tumormodell hergestellt werden, bei der die Expression der transgenen *Wt1*-cDNA gewährleistet, die Phasen der Embryonalentwicklung, in denen *Wt1* eine zentrale Rolle spielt, zu überstehen. Die Letalität des konstitutionalen *Wt1 k.o.* sollte so umgangen werden (Kreidberg *et al.* 1993). Durch Abschalten des *Wt1*-Transgens mittels Doxyzyklin-Applikation sollte der Verlust von *Wt1 in vivo* bewirkt werden und zur Entwicklung eines Wilms-Tumors führen (s. Kap. 1.4, Abb. 1.10)

4.2.2 Effektor-Konstrukt und homologe Rekombination in ES-Zellen

Die zu Beginn der Herstellung des Effektor-Konstruktes beschriebenen Problematiken (s. Kap. 3.2.3), wie nicht etablierbares *ET-Cloning* (Zhang *et al.* 1998,

Angrand *et al.* 1999), teilweise falsche Klone zur Generierung der *Wt1*-Homologiearme sowie ungenügende Informationen zum *Wt1*-Lokus, führten zur schließlich verwendeten Form des Effektor-Konstruktes, welches verschiedene Vorzüge gegenüber dem initial geplanten Konstrukt aufweist (s. Kap. 3.2.5). Der *per se* schon weiterentwickelten und verbesserten Variante des *tTA 61-1* (Urlinger *et al.* 2000) wurden für das neue Konstrukt eine optimierte Kozak-Sequenz (Kozak 1991), ein korrekter *Wt1* 3'-Homologiearm und zur leichteren Identifizierung der Integration in den *Wt1*-Lokus eine veränderte Restriktionsschnittstelle (mutagenisiert von *EcoRV* zu *EcoRI*) beigefügt. Nichtsdestotrotz hat die durch o. g. Umstände bewirkte zeitliche Verzögerung bei der Herstellung der Effektor-Mauslinie negative Konsequenzen für die Herstellung einer konditionalen *Wt1* *k.o.*-Maus: So konnte mit der Verpaarung der Effektor-Mauslinie mit den *Responder*-Linien zur Generierung einer konditionalen *Wt1* *k.o.*-Maus erst sehr spät begonnen werden, was möglicherweise die transkriptionelle Inaktivierung (*Silencing*) der Transgene zur Folge haben könnte (s. o.).

Ebenfalls kritisch zu beurteilen ist der beim zweiten Anlauf aus Zeitdruck erfolgte Verzicht auf die Verwendung der HSV-TK im Effektor-Konstrukt zur Anreicherung tatsächlich homolog-rekombinierter ES-Klone. Die negative Selektion hätte wohl die Anzahl der zu untersuchenden ES-Zellen nach der Transformation reduziert und so den Anteil positiver Klone erhöht. So konnten – trotz großem zeitlichen und materiellen Aufwand – lediglich zwei homolog rekombinierte ES-Zellklone identifiziert und zur Injektion in Blastozysten herangezogen werden (s. Kap. 3.2.6, Tab. 3.2). Dies entspricht einer Frequenz von $1:10^3$, d. h. einem positiven Klon aus 1000 getesteten.

Das Ereignis einer homologen Rekombination ist selten und findet sonst in etwa einer von 10^5 bis 10^9 Zellen statt, wobei die Integration häufiger an einer zufälligen Stelle stattfindet als am gewünschten Ziellokus. Die Ursache dieser Schwankung ist nicht restlos geklärt, allerdings kann die Verwendung einer negativen Selektionskassette die Anzahl positiver Klone um fast das 20-fache erhöhen (Doetschman 1994, Silver 1995, Schenkel 1995). Entscheidenden Einfluss auf die Rekombinationsfrequenz am gewünschten Lokus haben mit Sicherheit die Charakteristiken der verwendeten homologen Sequenzen zur Generierung des *targeting*-Konstrukts. Dabei erhöht die Länge der Homologiearme die Rekombinationsfrequenz ebenso (Thomas *et al.* 1987, Hasty *et al.* 1991), wie der Einsatz genotypisch zur verwendeten ES-Zelllinie identischer DNA bei der Herstellung der Homologiearme (Schenkel 1995). Die genetischen Unterschiede der sich im Umlauf befindlichen 129er-Mauslinien und der aus ihnen generierten ES-Zelllinien können mittlerweile so groß sein, dass davon ein Nachteil für die Rekombinationsfrequenz bei *gene targeting*-Experimenten zu erwarten ist (Simpson *et al.* 1997, Threadgill *et al.* 1997).

Die Verwendung verschiedener ES-Zell-DNAs zur Herstellung des Effektor-Konstruktes kann sicherlich als 'unvorsichtig' bezeichnet werden. Der aus den von Kreidberg *et al.* 1993 benutzten Klonen hergestellte 5'-Homologiearm geht auf eine ES-Zelllinie mit der Bezeichnung D3 (129/SvPas) zurück (Doetschman *et al.* 1985). Die von uns als Matrize zur Amplifikation des 3' *Wt1*-Homologiearmes verwendete ES-Zell-DNA wurde aus der 129er-Sublinie 129/SvJ generiert (Nagy *et al.* 1993). Letztendlich als Ziel-DNA wurde der genetische Hintergrund von W9.5-ES-Zellen (129/Sv.C3) benutzt, in denen dann die homologe Rekombination durchgeführt wurde (Szabó *et al.* 1994). Der genetische Vergleich dieser Sublinien zeigt eine hohe Anzahl von Polymorphismen (SSLP, *simple sequence length polymorphism*) zwischen den Linien, die vermutlich die Rekombinationsfrequenz reduzieren (Simpson *et al.* 1997).

Ebenfalls nachteilig hat sich möglicherweise der undefinierte Status der ES-Zelllinien (die uns von anderen Laboren zur Verfügung gestellt wurden) bei der Etablierung der Methode ausgewirkt. Versuche zur homologen Rekombination durch Transformation der ES-Zellen mittels Elektroporation wurden bis zum Erfolg mit W9.5-Zellen auch mit R1- und I7-ES-Zelllinien durchgeführt (Daten nicht präsentiert). Die Anzahl der Passagen dieser Linien war nicht genau bekannt, was möglicherweise dazu führt, zu alte ES-Zellen zu verwenden, deren Rekombinationsfrequenz bereits durch eine zu hohe Anzahl von Passagen eingeschränkt ist. Sinnvoller wäre sicher gewesen, auf Linien kommerzieller Anbieter, wie ATCC oder Taconic zurückzugreifen, die einen genauen Status ihrer Produkte (ES-Zelllinien) angeben (siehe z. B. Taconic, ES-Zelllinie W4, Auerbach *et al.* 2000).

4.2.3 Verifizierung transformierter ES-Zellen und falsche 3'-Rekombination

Die Identifizierung und Verifizierung korrekt am *Wt1*-Lokus rekombinierter ES-Zellklone sollte in zwei Schritten mittels *Southern Blot*-Hybridisierung und mit Hilfe von HA-überspannenden *Expand*-PCRs erfolgen. Die ES-Zellklone wurden im 96-Well-Format prozessiert und mit dem Restriktionsenzym *EcoRV* verdaut. Die Hybridisierung der Filter nach dem *Southern Blot* erfolgte mit einer 5'-außerhalb des Homologiearmes gelegenen Sonde (5'OP-*Bgl*II, s. Kap. 3.2.6). Eine 3'-außerhalb der HA gelegenen Sonde konnte leider nicht etabliert werden. Alle Versuche zur Etablierung einer solchen Sonde zeigten unspezifische Signale beim Nachweis im Autoradiogramm. Im Hinblick auf eine falsche 3'-Rekombination in den später daraus entstandenen Effektor-Linien WE1 bzw. WE2 ist dies die erste ungünstige Entwicklung bei der Identifizierung eines korrekten, d. h. homologen

Rekombinationsereignisses in den untersuchten ES-Zellen. Zunächst konnten acht ES-Zellklone über die 5'-Hybridisierung als positiv identifiziert werden (s. Kap. 3.2.6, Tab. 3.2). Nach weiteren Verifikationsschritten (s. u.) blieben letztendlich zwei Klone für die Injektion in Blastozysten zur Herstellung chimärer Mäuse. Eine zusätzliche Überprüfung der Klone mit einer 3'-Hybridisierung hätte eine nicht-homologe Rekombination im 3'-Bereich ausschließen können. So muss davon ausgegangen werden, dass der ES-Zellklon I.A11 als falsch-positiv homolog rekombiniert (in der 3'-Region) zur Generierung von Keimbahnchimären herangezogen wurde. Mögliche Gründe für die Auswahl eines solchen 'falschen' Klons sind im Folgenden dargestellt:

Zunächst war die Interpretation der Größe der rekombinanten Restriktionsbande (*EcoRV*-Verdau: 7,2 Kb Wildtyp, 18,6 Kb Rekombinant, s. Kap. 3.2.6, Abb. 3.24) bei der Hybridisierung mit der 5'-Sonde problematisch. Hier ist zu bemerken, dass die Verwendung eines λ -*HindIII*-Größenstandards zur Beurteilung der Produktgrößen ungünstig war, da dieser eine genaue Interpretation im relevanten Größenbereich zwischen 9,5-23 Kb eigentlich nicht zulässt. Diese Situation hätte durch einen weiteren mit einem anderen Restriktionsenzym durchgeführten bzw. durch einen kombinierten Restriktionsverdau mit zwei Enzymen vermieden werden können. Kleinere Produktgrößen hätten die Identifizierung der richtigen Größen bei einer homologen Rekombination erleichtert. Experimente in diese Richtung wurden unternommen, mussten aber auf Grund der beschränkten Auswahlmöglichkeiten sinnvoller Restriktionsenzyme, sowie dem enormen Zeitdruck eingestellt werden.

Parallel dazu erfolgte die Verifizierung der im *Southern Blot* identifizierten Klone mit Hilfe von *Expand*-PCRs mit anschließender Sequenzierung der Produkte (s. Kap. 3.2.6, Abb. 3.25). Dabei wurden die Oligonukleotide jeweils so gewählt, dass ein Amplifikationsprodukt nur bei einer genauen Rekombination in den *Wt1*-Lokus zustande kommt. Die Sequenzierung der Produkte veranschaulicht die Übergänge an den Rekombinationsstellen und identifiziert die eingebrachten Sequenzen von *tTA*- und *Neo*-Kassette ebenso wie die mutagenisierte *EcoRV*/*RI*-Restriktionsschnittstelle (s. Kap. 3.2.6, Abb. 3.26). Mögliche Ursachen für eine falsche Beurteilung der Ergebnisse des Klons I.A11, aus dem die WE1-Effektor-Linie hervorgeht, wären:

Ginge man von einem Mischklon der ES-Zellen aus, das heißt, es lägen sowohl richtig als auch falsch rekombinierte Zellen in diesem ES-Klon vor. Würden die positiven Zellen die Ergebnisse und Interpretationen der Analyse bestimmen, die falsch rekombinierten ES-Zellen aber zur Keimbahnentwicklung der I.A11-Chimären beitragen und so eine falsche 3'-Rekombination in der Effektor-Linie begründen.

Eine andere Variante, bei der es erst in der Keimbahn der Chimäre während der Meiose zur Entstehung der Gameten zu einer fehlerhaften Rekombination kommt, wäre ebenfalls theoretisch denkbar. In diesem Fall wäre die Verifizierung des I.A11-ES-Klons fehlerfrei verlaufen und es käme im Zuge der Chiasmata-Bildung zwischen den homologen Chromosomen im Diplotän (Prophase I) während der ersten meiotischen Teilung zu einer falschen Aneinanderlagerung mit den beschriebenen Folgen.

Als letzte Möglichkeit muss in Betracht gezogen werden, dass es bei der Weitergabe der Koordinaten der ES-Zellklone oder bei der Injektion der ES-Zellen in die Blastozysten zu einem Vertauschen von Zellklonen kam und versehentlich ein falsch-rekombinierter Klon injiziert wurde.

Zusätzlich ungünstig hinsichtlich der Verwendung ausgerechnet des 'falsch rekombinierten' Klons wirkte sich aus, dass der ES-Klon X.F7 durch eine schlechte morphologische Beurteilung aussortiert werden musste und die injizierten ES-Zellen des Klons XI.G1 keine Keimbahntransmission ergaben. So blieb letztendlich nur die Möglichkeit, trotz falscher 3'-Rekombination mit den Linien WE1 bzw. nach der Exzision der Neo-Kassette mit WE2 als Wt1-Effektor-Linie zu arbeiten.

4.2.4 Aufklärung der Rekombination in der Effektor-Linie WE2

Die Architektur des rekombinanten Locus in der Effektor-Linie war zunächst unklar und wurde als eine Deletion im 3'-Bereich angenommen, da der 5'-Bereich korrekt homolog rekombiniert war, die durchgeführte 3' *Expand*-PCR aber nicht das erwartete Produkt ergab (s. Abb. 4.2). Damit wäre ein *Wt1-knock out* gegeben, bei dem die *tTA*-Expression im günstigen Fall nach wie vor *Wt1*-analog erfolgen kann und es nur Unklarheit über die Natur der deletierten Sequenzen gäbe.

Ausgehend von dieser Annahme wurde eine Methode (*Splinkerette*, s. Kap. 2.4 und 3.2.9.2) auf die WE1-Effektor-Linie angewandt, die es ermöglichen sollte, den deletierten Bereich ausgehend von den bekannten *tTA/Neo*-Sequenzen zu ermitteln. Das Resultat lieferte den entsprechenden Bruchpunkt, dessen Sequenzen nach Abgleich mit den Datenbanken allerdings 120 kb 5' von *Wt1* liegen. Ein Zustandekommen dieses Ergebnisses ist nur durch eine Inversion bei der homologen Rekombination oder durch eine falsche *Annotation* der *Wt1*-Region in den Datenbanken zu erklären. Eine anschließende PCR mit Oligonukleotiden, die diesen experimentell ermittelten Bruchpunkt unabhängig bestätigte, lieferte ein starkes Indiz für das Vorliegen einer Inversion. In diesem Fall wäre der am *Wt1*-Translationsstartpunkt integrierte *tTA* (*Wt1* Exon 1 *k.o.*) kurz vor dem Exon 2 vom Rest des *Wt1*-Lokus getrennt und es würden etwa 125 Kb inklusive

regulatorischer *Wt1*-Sequenzen, die ebenfalls von diesem Ereignis betroffen sind, invertiert vorliegen (s. Abb. 4.2). Da die Ergebnisse für eine korrekte homologe Rekombination im 5'-Bereich richtig scheinen, also ein heterozygoter *Wt1-knock out* wahrscheinlich ist und des Weiteren auch der *tTA* komplett vorliegt (s. Kap. 3.2.7, Abb. 3.27), ist eine Verwendung der hergestellten Mauslinie als Effektor in einem induzierbaren System möglich. Voraussetzung hierfür allerdings ist eine *Wt1*-spezifische Expression des *tTA* in den Mäusen (s. u.), trotz der vorliegenden Inversion.

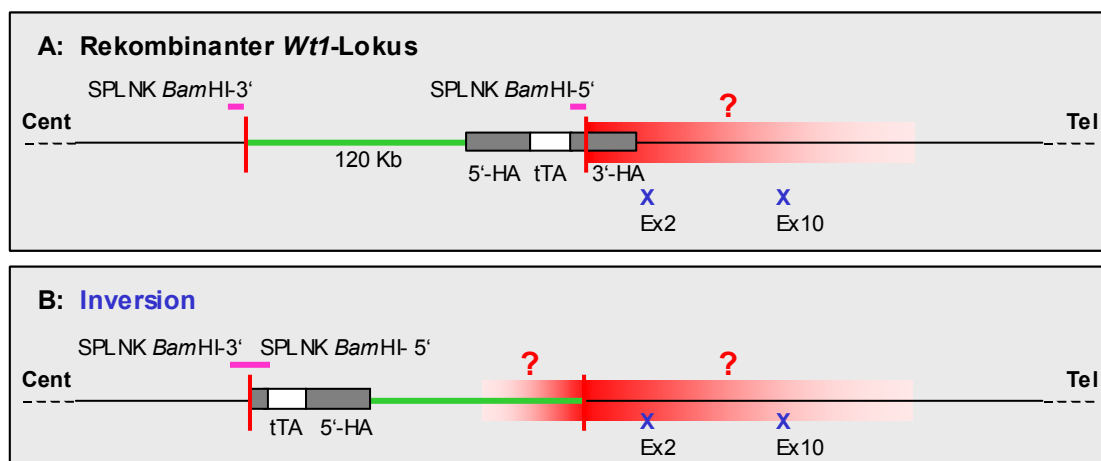


Abbildung 4.2: Rekombinanter *Wt1*-Lokus und mögliche Inversion.

A: Gezeigt ist die Integration des *tTA* am *Wt1*-Translationsstartpunkt durch eine korrekte homologe Rekombination in den ES-Zellen. In den von uns generierten Effektor-Mäusen tritt dagegen eine falsche 3'-Rekombination auf. Die rote Linie im 3'-HA markiert den 3'-BRP. Zunächst wird eine Deletion mit unbekanntem Sequenzverlust im *Wt1*-Lokus (Exon 2-Exon 10) angenommen (rotes Fragezeichen). Die durchgeführte *Splinkerette*-Methode ergibt aber Sequenzen (pink, 5'- und 3'-SPLNK *Bam*HI-Fragmente) hinter dem BRP, die 120 Kb 5'-strangaufwärts von *Wt1* liegen und liefert damit Indizien für eine etwa 125 Kb große Inversion. **B:** Dargestellt ist der Zustand in den Effektor-Linien WE1 bzw. WE2 bei einer vorliegenden Inversion. So wäre das Auftreten eines zusammenhängenden SPLNK-Fragmentes zu erklären. Von der Inversion ist ein Bereich von etwa 125 Kb betroffen, der u. a. wichtige regulatorische Elemente für *Wt1* enthält. Weiterhin bleibt die Frage des Sequenzverlustes, nun auf beiden Seiten des zweiten angenommenen, aber noch nicht identifizierten BRP. Die Hybridisierung dieser Bereiche mit Sonden während einer FISH auf Metaphasen-Chromosomen der Effektor-Mäuse und der daraus resultierenden Ergebnisse deutet wenn überhaupt auf einen geringen Sequenzverlust. Da ein relativ großer Bereich durch die Inversion betroffen ist und der *tTA* nicht von den *Wt1*-regulatorischen Elementen und dem *Wt1*-Promotor getrennt wurde, ist eine *Wt1*-analoge Expression des *tTA* nach wie vor möglich.

Die Wahrscheinlichkeit, dass das Ergebnis auf einem Artefakt, resultierend aus der *Splinkerette*-Methode beruht, ist relativ gering. Die nach dem *Bam*HI-Restriktionsverdau ligierten *Splinkerettes* sind so konzipiert (*hairpin*-Struktur), dass bei einer Amplifikation erst Produkte entstehen, wenn ausgehend von der bekannten Sequenz bereits ein Strang amplifiziert wurde. Dieser dient dann erst dem *Splinkerette*-Primer als Matritze für weitere Amplifikationszyklen (s. Abb. 4.3 und Kap. 2.4).

Zusätzlich wurde nach der Feststellung von Position und Identität der neuen Sequenzinformation zum 3'-Bruchpunkt eine PCR etabliert, die von den *in silico* zusammengesetzten Sequenzen ausgeht und den Bruchpunkt auf jeder Seite mit ~ 500 bp Abstand umfasst. Das 980 bp große Produkt kommt bei einer PCR nur bei

fehlerhaft rekombiniertem Locus zustande und erhärtet damit die Ergebnisse der *Splinkerette*-Methode und den Nachweis einer Inversion.

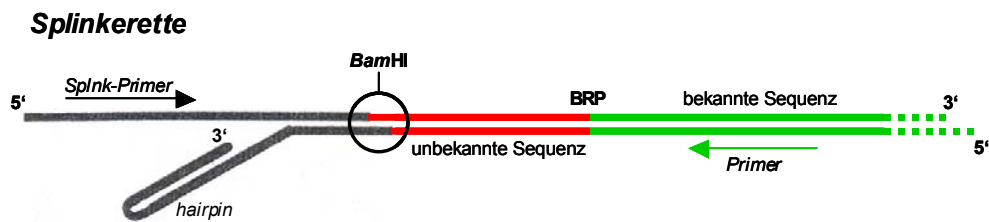


Abbildung 4.3: Splinkerette.

Die Struktur der *Splinkerettes* verhindert die Amplifikation von Artefakten nach der Ligation an den unbekanntem Sequenzbereich. Die *hairpin*-Region, die eine Amplifikation ausgehend vom *Splink-Primer* zunächst nicht erlaubt, verliert ihre Bedeutung, wenn ausgehend vom Primer der bekannten Sequenz über die Ligationsstelle hinaus in die *Splinkerette-Sequenz* bereits ein Strang amplifiziert wurde. Dieser dient dann dem *Splink-Primer* als Matrize für die weiteren Amplifikationsschritte. Das entstandene PCR-Produkt kann sequenziert werden und die unbekanntem Sequenz nach dem BRP wird zugänglich.

Alle zu diesem Zeitpunkt vorhandenen Effektor-Linien (WE1 und WE2), sowie die zu ihrer Herstellung injizierte ES-Zelllinie I.A11 wurden mit dieser PCR überprüft (s. Kap. 3.2.9.2, Abb. 3.34 und 3.35). Beide Effektor-Mauslinien tragen die invertierte Rekombination, nicht aber der als Ursprung anzusehende ES-Zellklon. Das lässt als einzige Gründe für die Verwendung einer falschen ES-Zelllinie übrig: a) Meiose-Rekombinationsfehler oder b) Verwechslung der ES-Zellen bei Injektion (s. o.).

Mit den Mitteln der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) auf Metaphasen-Chromosomen der betroffenen Effektor-Linie WE2 wurde anschließend versucht, die Inversion näher zu charakterisieren. Allerdings scheint die Methode auf Grund ihrer recht groben Auflösung nicht geeignet, um den chromosomalen Zustand in unserem Fall näher zu beschreiben. Die gewählten und eingesetzten BAC-Klone mit einer durchschnittlichen Größe von etwa 200 kb waren hierfür zu groß und überlappen teilweise im aufzuklärenden Bereich. Die Analyse der Signale lässt aber zumindest den Schluss zu, dass keine größeren Deletionen mit dem Inversionsereignis einher gehen (s. Kap. 3.2.9.2, Abb. 3.36). Auch der Einsatz kleinerer Sonden direkt an den Bruchpunkten gelegen (~ 10 Kb, *Ex 2/4*-Sonde, sowie links und rechts vom 5'BRP gelegene 5'/5'- bzw. 5'/3'-Sonde) liefert nur bedingt weitere Informationen (s. Kap. 3.2.9.2, Abb. 3.37). Das Ergebnis der *Ex 2/4*-Sonde zeigt, dass es vermutlich auch im weiteren Verlauf des 3'-Bereichs zu keiner Deletion kommt, da Signale auf beiden Chromosomen eindeutig zu erkennen sind. Die Ergebnisse der FISH mit den Sonden 5'/5' und 5'/3' sprechen eher für das Vorliegen einer Inversion, da ihre Signale nicht konsequent co-lokalisieren. Der Abstand zueinander scheint sich bei der Hybridisierung auf Interphasen-Chromosomen zu verändern. Leider

fehlt eine sinnvolle Kontrollhybridisierung (z. B. mit der Ex 2/4-Sonde), die eine bessere Interpretation dieses Ereignisses ermöglicht hätte.

Ob die Inversion mit kleineren Sonden in der FISH auf Metaphasen-Chromosomen, überhaupt darzustellen ist, bleibt fraglich. Vermutlich müsste eine höher auflösende Methode wie die *Fiber-FISH*-Technik, die ein Strecken der Chromosomen bei der Präparation beinhaltet, dafür gewählt werden. Zur Zeit wird versucht, den zweiten Bruchpunkt durch eine einfache *long range*-PCR-Strategie auf Grundlage der *in silico* zusammengestellten Sequenzen für eine Inversion unter Annahme eines geringen Sequenzverlusts zu erfassen.

4.2.5 Charakterisierung der WE2-Effektor-Linie

Um die generierte *Wt1*-Effektor-Linie trotz Inversion als Effektor für die Herstellung einer konditionalen *Wt1* *k.o.*-Maus nutzen zu können, muss eine *Wt1*-spezifische Expression des *tTA* in den Mäusen gewährleistet sein. Die Analyse der WE2-Effektor-Mauslinie erfolgte auf verschiedenen Ebenen, um eine möglichst umfassende Charakterisierung zu gewährleisten. Dabei sollte zum einen die Inaktivierung des endogenen *Wt1*-Lokus durch die Integration der *tTA*-Sequenzen gezeigt und zum anderen das *Wt1*-spezifische Expressionsmuster des *tTA* sowohl während der Entwicklung als auch in den adulten Mäusen nachgewiesen werden.

Die für die Charakterisierung präsentierten Daten (s. Kap. 3.2.9.1 bis 3.2.10.3) sind in manchen Punkten widersprüchlich, was aber vermutlich Ausdruck methodischer Problematiken ist (s. u.). Natürlich sollte aber bei der Bewertung der Daten die invertierte Integration des *tTA* in den *Wt1*-Lokus nicht außer Acht gelassen werden, da es denkbar ist, dass der Transkriptionsstartpunkt von weiteren wichtigen (z. B. 3'-gelegenen) *Wt1*-regulatorischen Elementen getrennt wurde (Fraizer *et al.* 1994). Generell zeigt die *Wt1*-Effektor-Linie (WE2) jedoch ein *Wt1*-analoges zeitliches und räumliches *tTA*-Expressionsmuster und ist somit höchst geeignet, in einem induzierbaren, reversiblen System in *Wt1*-positiven Geweben als Effektor interessierender Zielgene zu agieren. Die generierte Effektor-Mauslinie kann als Werkzeug zur detaillierten Aufklärung der Rolle von WT1 in den bekannten physiologischen Zusammenhängen eingesetzt werden.

4.2.5.1 Funktionelle *Wt1*-Inaktivierung (*k.o.*) durch *tTA*-Integration (*k.i.*)

Der angestrebte *knock out* des endogenen *Wt1*-Lokus wurde durch die Integration der *tTA*-Sequenzen erreicht. Die eingesetzten *Southern Blot* und *Expand-PCR*-Analysen zum Nachweis der Rekombination belegen die Integration des *tTA* am Translationsstartpunkt von *Wt1*. Ergänzende *Intercross*-Verpaarungen von heterozygoten *Wt1-tTA*^{+/-}-

Mäusen zur Kontrolle der auftretenden Genotypen der Nachkommen belegen, dass dies zur funktionellen Inaktivierung des *Wt1*-Lokus führt: Die Genotypisierung von 85 Jungtieren dieser Verpaarungen ergibt ein klares 1:2 Verhältnis von wildtypischen zu heterozygoten *Wt1-tTA^{+/-}*-Tieren, wie es bei einem *k.o.* von *Wt1* mit letalen Folgen in der Embryogenese erwartet wird (s. Kap. 3.2.9.1, Abb. 3.31). Der Genotyp *Wt1-tTA^{-/-}* kommt bei lebenden Tieren nicht vor.

Das im Anschluss an dieses Ergebnis durchgeführte *timed mating* zur Bestimmung der Genotypen in Embryonen (Tag E9,5 *dpc*) bestätigt einen *Wt1*-Funktionsverlust ebenfalls. Es können hier Embryonen mit dem *Wt1*-null-Genotyp nachgewiesen werden. Leider kann in diesen PCR-Analysen das erwartete Genotypverhältnis (+/+ 1 : +/- 2 : -/- 1) nicht erzielt werden. So konnten nur drei *Wt1 k.o.*-Embryonen aus 39 untersuchten identifiziert werden. Zwei Gründe können hierfür verantwortlich sein: Zu frühen Zeitpunkten in der Embryonalentwicklung abgestorbene *Wt1*-defiziente Embryonen werden im Uterus resorbiert und entziehen sich so der Analyse an Tag 9,5 *dpc*. Es kommt hier schon zu einer Auswahl zugunsten der lebensfähigen Genotypen und zu einer Verlagerung des Zahlenverhältnisses. Oder aber die Methode der DNA-Gewinnung aus dem Amnion der Embryonen ist zu kontaminationsanfällig bei der Präparation und es kommt zu einer Verschleierung des tatsächlichen Verhältnisses, weil der Genotyp der Mutter die PCR-Ergebnisse verfälscht. Zusätzlich muss berücksichtigt werden, dass die angewandten PCR-Analysen noch getrennt voneinander durchgeführt wurden und nicht wie bei den lebenden Tieren mit einer Kombinations-PCR, die den Verlust von *Wt1*-Sequenzen und gleichzeitig die Integration des *tTA* erfasst. Dies müsste für die Embryonen wiederholt werden.

Unabhängig davon zeigen die klaren Ergebnisse bei der Verpaarung heterozygoter *Wt1-tTA^{+/-}*-Mäuse und der Analyse ihrer Nachkommen deutlich einen *Wt1-knock out* in der Effektor-Mauslinie.

4.2.5.2 *Wt1*-spezifische *tTA*-Expression in WE2-Mäusen

Ein weiterer Schritt zur Charakterisierung der Effektor-Tiere war die Überprüfung der *tTA*-Expression in den Geweben der WE2-Linie. Dies geschah zunächst auf direktem Weg durch den Nachweis von *tTA*-RNA im *Northern Blot* in 16 verschiedenen Geweben von adulten Mäusen. Die Auswahl erfolgte einerseits anhand der bekannten *Wt1*-Expression (*Wt1*-positive Gewebe), andererseits sollte ein möglichst breites Spektrum verschiedener Gewebe vertreten sein. Die in Abb. 3.38 (s. Kap. 3.2.9.3) gezeigten *Northern Blot*-Analysen zeigen eine *tTA*-Expression, die das für *Wt1* publizierte Expressionsmuster in adulten Mäusen rekapituliert.

Die *tTA*-Expressionsorte sind zunächst einmal die *Wt1*-positiven Organe des Urogenitalsystems wie Niere, Ovar, Uterus, Hoden. Dies deckt sich mit den in der Einleitung beschriebenen Orten einer persistierenden *Wt1*-Expression in adulten Lebewesen von Maus und Mensch (s. Kap. 1.3.6, Abb. 1.9, Pritchard-Jones *et al.* 1990, Pelletier *et al.* 1991 b, Buckler *et al.* 1991, Armstrong *et al.* 1992, Rackley *et al.* 1993, Mundlos *et al.* 1993). Hinzu kommt ein starkes Signal in der Harnblase, die bisher noch nicht mit einer *Wt1*-Expression in Verbindung gebracht wurde.

Eine ebenfalls deutliche *tTA*-Expression zeigt die Milz. Abhängig von der Expositionszeit des Filters gelingt auch der Nachweis von *tTA*-Transkripten in Herz, Lunge und Thymus (vgl. Buckler *et al.* 1991). Zusätzlich wird ein Signal im Mesenterium des untersuchten Weibchens detektiert, was ebenfalls – sollte es durch die Aktivität des *Wt1*-Promotors hervorgerufen sein – bisher noch nicht für adulte Mäuse beschrieben wurde. Allerdings gibt es hier wie im Herzen Unterschiede zwischen den Organen der männlichen und weiblichen Tiere, denn Signale sind nur im *Northern Blot* der Organe des weiblichen Tieres zu sehen. Dieser Unterschied könnte auf die Präparation zurückzuführen sein, bei der der Darm vom Mesenterium abgezupft und ein Teil davon dann für die RNA-Präparation verwendet wird. Es kann nicht gewährleistet werden, dass jedes Mal vergleichbare Mengen bzw. Regionen verwendet wurden.

Für den Nachweis einer *Wt1*-abhängigen *tTA*-Expression im Herzen sind vermutlich ebenfalls die Mengen der in die Präparation eingegangenen *Wt1*-positiven Zellen verantwortlich. Die Herzen der präparierten Tiere sind je nach Alter und Geschlecht unterschiedlich groß und auch die für die RNA-Gewinnung eingesetzte Menge an Gewebe sicherlich variierte. In der Regel wurde ein Drittel bis die Hälfte eines Herzens verwendet. Das detektierte Signal könnte hier von Zellen des Epikards stammen. Das Epikard ist das viszerale Blatt des Perikards (Herzbeutel) und bildet die äußerste Oberfläche des Herzens. Es besteht aus einem dünnen Epithel (Mesothel) und einer darunter gelegenen Bindegewebsschicht (*subepicardial mesenchymal cells, SEMC*), die an das Myokard anschließt (Männer *et al.* 2001, Munoz-Chapuli *et al.* 2002, Harvey 2002, Gilbert 2003, Welsch 2006). In beiden Komponenten des Epikards wurde bereits im sich entwickelnden Embryo, sowie in zwei Tage alten Mäusen eine *Wt1*-Expression nachgewiesen (Moore *et al.* 1999). Dies ist auch im Hinblick auf eine mögliche Beteiligung von *Wt1* an der Vaskulogenese interessant (s. u.): Zellen dieser subepikardialen Region wandern ins Myokard ein und bilden unter anderem die glatte Muskulatur der Koronargefäße (Mikawa *et al.* 1996, Dettman *et al.* 1998, Perez-Pomares *et al.* 2002, Wessels *et al.* 2004). Das Epikard ist eine sehr dünne Schicht und Schwankungen bei der Präparationsmenge können eine Erklärung für das Fehlen eines Signals im *Northern Blot* des männlichen Tieres sein.

Die gewebespezifische *tTA*-Expression wurde darüber hinaus auch mit Hilfe von Reporter-Mäusen näher untersucht (s. Kap. 3.2.10). Nach der Verpaarung von WE2-Mäusen mit LC1 (*TetO_{br}-Luc-Cre*)-Reporter-Mäusen, die *tTA*-abhängig *Luziferase* und *Cre-Rekombinase* exprimieren, wurde die Analyse der Gewebe doppelt transgener (dtg) Nachkommen mit einem Luziferase-Assay durchgeführt. Die Ergebnisse bestätigen die *Wt1*-spezifische Expression von *tTA* in Organen des Urogenitalsystems (Niere, Hoden, Ovar und Uterus). Zusätzlich wurde eine sehr starke Luziferase-Aktivität in der Samenblase detektiert. Dies widerspricht teilweise dem Ergebnis der RNA-Analysen, bei denen keine *tTA*-Transkripte im *Northern Blot* in der Samenblase nachgewiesen werden konnten (vgl. Abb. 3.38 und Abb. 3.39, s. Kap. 3.2.9.3). Wahrscheinlich ist die Methode des *Northern Blot* nicht sensitiv genug, um einen Nachweis zu ermöglichen. Trotzdem scheint die Stärke der Luziferase-Aktivität sehr hoch im Vergleich zu nachweislich *Wt1*-positiven Organen, so dass zusätzlich ein Messfehler angenommen werden muss. Weiterhin kann auch die Bestätigung (s. o. *Northern Blot*) einer *tTA*-induzierten *Luziferase*-Expression in der Milz gezeigt werden, obwohl die Luziferase-Aktivität hier nur leicht über den Werten der Kontrollen liegt. Andere *tTA*-positive Gewebe wie Herz, Lunge, Thymus und Mesenterium zeigen keine erhöhten Werte im Vergleich zu den Kontrolltieren.

Zusätzlich liefert der Luziferase-Assay erste Hinweise auf eine Regulierbarkeit der Reporterexpression durch Dox-Applikation. In den Organen der +Dox-Mäuse kann eine deutliche Reduktion der Luziferase-Aktivität gezeigt werden. Ein komplettes Abschalten der Transgenexpression scheint mit dieser Methode aber nicht problemlos nachweisbar zu sein, weil die Tiere weiterhin hohe Messwerte zeigen, die weit über dem Hintergrund der Kontrolltiere liegen. Grund dafür ist vermutlich die Speicherung der Luziferase in den Peroxisomen der Zellen und einer daraus resultierenden hohen Halbwertszeit, so dass selbst bei einer Dox-Applikation über vier Wochen offenbar noch eine starke Restaktivität der Luziferase vorhanden ist (Sambrook *et al.* 1989).

Der im Rahmen der Möglichkeiten des Labors durchgeführte Luziferase-Assay eignet sich so nur bedingt zur Charakterisierung einer Effektor-Linie und birgt zudem methodische Hindernisse. Das Sammeln der für die Versuchsdurchführung geeigneten Genotypen (dtg-Tiere und stg-Kontrolltiere +/-Dox) in ausreichenden Mengen gestaltet sich sehr schwierig und zieht sich über einen langen Zeitraum, was eine gemeinsame zeitnahe Analyse der Gewebe erschwert. Die Gewebe der Tiere werden daher unterschiedlich lange bei -80°C gelagert, was mit Sicherheit die enzymatische Aktivität der Luziferase und damit die Auswertung beeinflusst. Dies könnte eine Erklärung für stark schwankende Werte bei genotypisch gleichen Versuchstieren sein (Daten nicht abgebildet).

4.2.5.3 *tTA*-Expression auf zellulärer Ebene und Dox-abhängige Regulierbarkeit von Reportergenen in adulten Mäusen

Eine detailliertere Darstellung und Charakterisierung der *tTA*-Expressionsorte erfolgte durch X-Gal-Färbung histologischer Schnittpräparate von Organen doppelt transgener (WE2/LZ) Nachkommen aus Verpaarungen der WE2-Linie mit LZ-Reporter-Mäusen (*TetO_{bi}GFP-lacZ*, s. Kap. 3.2.10.2). Diese Untersuchungen liefern ein genaues Bild der *tTA*-Expression auf zellulärer Ebene.

Hinsichtlich der Regulierbarkeit von Tet-responsiven Transgenen zeigen die Tiere eine stringent Dox-abhängige Expression des Reportergens: Nach Dox-Applikation sind keine Farbreaktionen in den normalerweise positiven Geweben doppelt transgener Tiere zu sehen (s. Abb. 3.40-44). Alle anderen untersuchten Gewebe adulter Mäuse sind negativ. Dies gilt auch für die im *Northern Blot* nach langer Expositionszeit *tTA*-positiven Organe Herz, Lunge, Thymus und Mesenterium. Der Nachweis einer LacZ-Expression bleibt in diesen Geweben negativ, da vermutlich nicht alle zellulären Anteile der Organe die *tTA*-cDNA exprimieren, sondern lediglich die Zellen des mesothelialen Überzugs (vgl. Milz). Dies wurde bereits mittels RNA *in situ*-Hybridisierungen in Mausembryonen gezeigt (Rackley et al. 1993). Dieser Überzug ist ein einschichtiges Epithel und die *tTA*-induzierte LacZ-Expression in diesen Zellen ist vermutlich zu schwach, d. h. auf eine sehr dünne Zellschicht beschränkt, um mikroskopisch detektierbar zu werden.

An den Schnitten der Niere wird deutlich, dass sich die *tTA*-Expression auf die Glomeruli beschränkt. Bedingt durch das mikroskopische Auflösungsvermögen lassen sich die Podozyten als Expressionsort jedoch nur vermuten, so dass hier Co-Immunfärbungen mit Podozyten-spezifischen Proteinen letztlich das genaue Gewebekompartiment der *tTA*-Expression bestätigen müssen. Eine Podozyten-spezifische Expression entspräche dem erwarteten Kompartiment in der Niere und würde eine Rekapitulation der *Wt1*-Expression in adulten Mäusen bedeuten. Eine immun-histochemische Färbung gegen *Wt1*, *tTA* und entsprechende spezifische Podozytenmarker wie z. B. Nephryn oder Podocalyxin, könnte hier Klarheit bringen.

Etwas schwieriger als für die Niere gestaltet sich die Interpretation der durch Färbung dokumentierten Expressionsorte in Hoden und Ovar: Beide zeigen nicht das erwartete und in der Literatur für *Wt1* beschriebene eindeutige Expressionsmuster des *tTA* in Sertoli- bzw. Granulosa-Zellen. Im adulten Hoden etwa drei Monate alter Mäuse scheint die *tTA*-Expression auf den Bereich des Interstitiums begrenzt zu sein. Dies ist der Ort der Testosteron-produzierenden Leydig-Zellen, für die bisher keine *Wt1*-Expression beschrieben wurde. Eine *Wt1*-Expression in diesen Zellen, sowohl während der Embryonalentwicklung als auch im adulten Tier erscheint aber auf Grund verschiedener

Befunde durchaus naheliegend. So gibt es deutliche Hinweise auf die Expression von *Dax1* und *Sf1* in Leydig-Zellen. Die Regulation dieser Gene in der Gonadalentwicklung ist wiederum sehr stark *Wt1* abhängig, so dass eine Expression von *Wt1* in Leydig-Zellen logisch wäre (s. Kap. 4.1.3, Abb. 4.1, Meeks *et al.* 2003, Park *et al.* 2005 b). Darüber hinaus könnte der Nachweis einer *LacZ*-Expression in den vereinzelt am Rand der Samenkanälchen liegenden Sertoli-Zellen schwierig sein, da die Expression dort recht schwach ist. Natürlich kann nicht ausgeschlossen werden, dass der fehlende Nachweis einer *tTA*-Expression in Sertoli-Zellen möglicherweise eine Folge der Inversion am *Wt1*-Lokus und dem damit dann einhergehenden Verlust der Expression gerade in diesen Zellen ist.

In der weiblichen Gonade deutet die X-Gal-Färbung auf eine Expression des *tTA* im Stroma des Ovars hin. Die histologische Trennung der Zellen um den Follikel ist nicht einfach und die verschiedenen Zelltypen gehen fließend ins Stroma über. Da aber deutlich die direkt an die Granulosa-Zellen anliegende Zellschicht eine Farbreaktion zeigt, könnte es sich hierbei auch um die hormonproduzierenden Theca-Zellen handeln, die das (ovarielle) Äquivalent der Leydig-Zellen im Hoden sind (Welsch 2006). Zusätzliche Analysen zur eindeutigen Identifizierung des *tTA*-exprimierenden Zelltyps sind notwendig. Im Gegensatz zur Literatur kann keine *Wt1*-spezifische *tTA*-Expression im peritonealen Überzug des Ovars gezeigt werden (Pelletier *et al.* 1991 b). Für beide Organe, Hoden und Ovar, kann die Anwendung immunhistochemischer Färbemethoden zusätzliche Informationen liefern.

Im Uterus zeigen sich neben einer diffusen Färbung im Stroma vor allem deutliche Signale im Myometrium mit seinen Bündeln glatter Muskulatur. Diese entsprechen genau den für die *Wt1*-Expression beschriebenen Regionen im Uterus. Somit kann an dieser Stelle festgehalten werden, dass im Uterus – neben der Niere – bisher am deutlichsten das *Wt1*-Expressionsmuster durch den *tTA* nachvollzogen wird (Pelletier *et al.* 1991 b, Rackley *et al.* 1993).

Im Gegensatz zu den *Northern Blot*-Analysen an einfach transgenen *Wt1-tTA^{+/-}*-Mäusen, aber übereinstimmend mit den Resultaten aus dem Luziferase-Assay, zeigen die Präparate der Samenblase eine starke *tTA*-Expression (bzw. X-Gal-Färbung), die auf die *Tunica Muscularis* beschränkt ist. Diese äußerste Hüllschicht ist durchsetzt mit glatten Muskelzellen, die vermutlich die zellulären Orte der X-Gal-Färbung sind. Auch in diesem Fall könnten immunhistochemische Co-Färbungen mit spezifischen Markern gegen glatte Muskelzellen wie *Smooth muscle α -actin* und Telokin Hinweise auf die Zellidentität geben (Hungerford *et al.* 1999, Mack *et al.* 1999, Herring *et al.* 2001, Owens *et al.* 2004, Yoshida *et al.* 2005). Nimmt man die Ergebnisse der Färbungen im Uterus und der

Samenblase zusammen, so wird deutlich, dass *Wt1* bei der Bildung oder der Homöostase glatter Muskelzellen beteiligt scheint (s. u., Hirschi *et al.* 2004).

Um das *tTA*-Expressionsmuster auch in der Embryonalentwicklung zu überprüfen, wurden die X-Gal-Färbungen auf Schnitten doppelt transgener Embryonen verschiedener Entwicklungsstadien durchgeführt (E12,5 und E14,5 *dpc*, s. Kap. 3.2.10.2; Abb. 3.46; E11,5, 13,5 und 15,5 *dpc* wurden nicht abgebildet). Die Resultate belegen, dass der *tTA* auch in der Embryogenese in einer der *Wt1*-Expression vergleichbaren Art und Weise exprimiert wird. Über den dokumentierten Zeitraum findet man deutliche Farbsignale im sich entwickelnden Urogenitaltrakt, den mesenchymalen Vorläufern der Milz, im Rückenmark, im epithelialen Überzug (den Mesothelien) von Herz, Lunge, Leber und Nebenniere, sowie in der AGM-Region (Aorta-Gonaden-Mesonephros-Region; vgl. Armstrong *et al.* 1992, Rackley *et al.* 1993). Im Bereich des Urogenitaltraktes kann man Färbungen in der Urogenitalfalte, im Mesonephros (entstehend E9,5 *dpc* und degenerierend E12,5-14,5 *dpc*), im Metanephros vom kondensierenden Mesenchym über Komma- und S-förmige Vesikel bis hin zu reifen Glomeruli beobachten. Ebenfalls deutlich angefärbt sind die Gonaden, hier v. a. die Hodenstreifen, welche während der Hodendifferenzierung als Vorläufer der *Tubuli seminiferi* gelten und in denen sich die Sertoli-Zellen entwickeln (Park *et al.* 2005 a).

Im Gegensatz zur Literatur konnte keine *tTA*-Expression im Gehirn (4. Ventrikel), Auge und Zunge oder in den sich entwickelnden Extremitäten dokumentiert werden (vgl. Armstrong *et al.* 1992, Moore *et al.* 1998). Allerdings beruhen diese Arbeiten auf transgenen Tieren mit humanem *WT1*-Lokus, so dass auch für diese Ergebnisse artifizielle Expressionsorte nicht ausgeschlossen werden können.

4.2.5.4 *Wt1*-spezifische *tTA*-Expression in der murinen Ontogenese

Bei dieser Charakterisierung der WE2-Effektor-Linie bzw. der damit gleichzeitig verlaufenden Aufklärung von *Wt1*-Expressionsorten in der murinen Ontogenese wurden ebenfalls X-Gal-Färbungen auf Kryoschnitten der Organe von Reporter-Mäusen durchgeführt (s. Kap. 3.2.10.3). Eingesetzt wurden in diesem Fall dreifach transgene Tiere (WE2/LC1/RLZ), bei denen der *Wt1*-getriebene *tTA* die Expression der *Cre*-Rekombinase, die über das Transgen der LC1-Linie eingebracht wird, reguliert. Die *Cre*-Rekombinase führt zur nicht reversiblen Exzision einer Stop-Kassette vor der am *ROSA26*-Lokus integrierten *LacZ*-cDNA (eingebracht über die RLZ-Linie). So wird jede an Stelle von *Wt1* den *tTA* exprimierende Zelle während der Ontogenese durch die daraus resultierende, konstitutive *LacZ*-Expression irreversibel ‚markiert‘ und ihr Entwicklungs-

schicksal spiegelt sich in den entsprechenden Blaufärbungen der Organe und Gewebe wider.

Wie bereits in den Versuchen mit dtg WE2/LZ-Mäusen zu beobachten war, scheint eine stringente Dox-regulierbare Expression von entsprechenden Transgenen durch die WE2-Linie möglich. Dreifach transgene Tiere ohne Dox-Administration zeigen LacZ-positive Zellen/Gewebe, wohingegen bei Mäusen, die während der Embryonalentwicklung bis hin zur Präparation als adulte Tiere dauerhaft Dox verabreicht bekamen, keine Färbung der Organe zu erkennen ist.

Abweichend von den Erwartungen zeigen zeitweilig induzierte Versuchstiere (+Dox während der Embryogenese und vier Wochen -Dox nach der Genotypisierung) nicht das aus WE2/LZ-Tieren bekannte Expressionsmuster adulter Mäuse. Als Grund hierfür kann die lange Zeit der Dox-Applikation angenommen werden, die von einem relativ kurzen Induktionszeitraum gefolgt wird. Es kann nicht genau gesagt werden, ob und wie lange Doxyzyklin im Körper nachwirkt. Allerdings scheint ein Zeitraum von mehr als 3 Monaten des Dox-Entzugs notwendig, um wieder sichere Färbungen entsprechend der tatsächlichen *tTA*-Expression in adulten Mäusen zu bekommen (persönliche Mitteilung Prof. Dr. J. Hengstler, Toxikologie, Universität Leipzig). Es ist deshalb anzunehmen, dass nach der relativ kurzen Phase ohne Doxyzyklin nur geringe Mengen transgener β -Galactosidase *Wt1*- bzw. *tTA*-abhängig gebildet werden und diese für eine histologische Dokumentation nicht ausreichen. Weder im Uterus, noch in Hoden (inklusive Leydig- und Sertoli-Zellen), der Samenblase und der Milz induzierter Mäuse konnte eine X-Gal-Färbung beobachtet werden (vgl. WE2/LZ).

Die Niere dagegen bestätigt erneut die *Wt1*-spezifische Expression des *tTA* auch in temporär induzierten Tieren. Nach dem Ende der Dox-Applikation beschränkt sich die Expression ausschließlich auf die Glomeruli (vermutlich die Podozyten) der Niere. Ebenfalls ähnlich verhält es sich im Ovar, wo zum ersten Mal eine Blaufärbung in den Granulosa-Zellen zu sehen ist (s. Kap. 3.2.10.3, Abb. 3.50).

Interessant ist nun die Betrachtung und Interpretation von WE2/LC1/RLZ- Mäusen, die keine Dox-Behandlung während der gesamten Entwicklung hatten. Hier dokumentieren die Blaufärbungen jede Struktur, die von einer (*Wt1*-derivierten) *tTA*-positiven Zelle abstammt. Bemerkenswert ist, dass keine komplett blaugefärbten Organe entstehen. Dies wäre aber nach den Beobachtungen von Clipsham *et al.* (2004), die eine starke *Wt1*-Expression im Epiblast von Präimplantationsembryonen an Tag E4,5 *dpc* zeigen, durchaus möglich gewesen. *Wt1* scheint aber nicht ubiquitär exprimiert, sondern in diesem Stadium schon auf bestimmte Zelltypen beschränkt zu sein, oder aber es

handelt sich um eine Beobachtung, die abhängig vom genetischen Hintergrund der Embryonen auftritt und somit nicht allgemein gültig, sondern eher variabel ist.

Die Färbungen lässt die Interpretation zu, dass durch die Akkumulation des Farbstoffes im Lauf der Entwicklung auch Strukturen deutliche Signale aufweisen, die in den zuvor beschriebenen Experimenten nicht oder nur sehr schwach positiv waren. Leider gibt diese experimentelle Variante natürlich keine Auskunft über den momentanen Zustand der *tTA*-Expression im adulten Tier, zeigt dafür aber die Strukturen, in denen *Wt1* entwicklungsrelevant ist.

Es kann in mehreren Organen (u. a. Milz, Pankreas, Hoden) eine Blaufärbung der äußersten Zellschicht gezeigt werden. Unklarheit besteht allerdings darüber, ob es sich dabei um den epithelialen Überzug oder um die bindegewebige Kapsel handelt, die mit glatten Muskelzellen durchsetzt ist (s. Kap. 3.2.10.3, Abb. 3.55). Die diffuse Färbung des Herzens über den Muskelfasern sind möglicherweise Signale durch Zellen des Epikards bzw. durch Zellen, die aus diesem hervorgegangen sind (vgl. Moore *et al.* 1999). Eine genaue Zuordnung ist im Längsschnitt, wie hier zu sehen (Abb. 3.53), nicht möglich. Die Wahl einer anderen Schnittebene (quer) könnte mehr Aufschluss über den Expressionsort geben, wenn die Gewebeschichten des Herzens sich dann deutlicher darstellen.

Dasselbe gilt auch für das Präparat des Hodens. Hier zeigen sich deutliche Signale erneut im Interstitium und erhärten die Vermutung einer *Wt1*-Expression in den Leydig-Zwischenzellen. Zum ersten Mal können auf diesen Schnitten aber auch die Sertoli-Zellen als Orte *Wt1*-analoger *tTA*-Expression nachgewiesen werden. Es könnte also gut sein, dass in Sertoli-Zellen eine *Wt1*-Expression nur während der Entwicklung vorliegt. Wie bereits mehrfach angesprochen, sollten immunhistochemische Co-Färbungen bzw. Immunfluoreszenz-Nachweise Aufschluss über die Identität der β -Galaktosidase-exprimierenden Zellen geben. Dabei müssten zellspezifische Marker, wie z. B. *Ins3* für Leydig- und *Amh* oder *Inhibin* für Sertoli-Zellen, neben Antikörpern gegen *Wt1* und *tTA* verwendet werden (O'Connor *et al.* 2004, Anand-Ivell *et al.* 2006, Rey 2006, Tremblay *et al.* 2005).

Die Niere dreifach transgener Tiere (-Dox) ist bis auf wenige vereinzelte epitheliale Strukturen vollkommen blau. Dies entspricht den Erwartungen, da eine frühe *Wt1*-Expression im uninduzierten metanephrischen Mesenchym (Pritchard-Jones *et al.* 1990, Armstrong *et al.* 1992) bereits alle Zellen ‚markieren‘ sollte, die in der folgenden Nephrogenese ebenfalls durch den von *Wt1* regulierten Mesenchym-Epithel-Übergang (MET) alle weiteren funktionalen Nierenstrukturen hervorbringen. Auch im Präparat zu beobachtende, nicht gefärbte tubuläre Strukturen, sind vermutlich Abkömmlinge der Ureterknospe und gehören zu den Sammelrohren, die während ihrer Entstehung keine

Wt1-Expression aufweisen (s. Kap. 3.2.10.3, Abb. 3. 47, Burrow 2000, Schedl *et al.* 2000, Dressler 2002).

Auch die Resultate der Samenblase bestätigen die Ergebnisse des Luziferase-Assays und die Ergebnisse aus WE2/LZ-Mäusen. Es ist eine starke *tTA*-Expression in der *Tunica muscularis* zu sehen, die erneut auf eine Beteiligung von *Wt1* bei der Entwicklung und Differenzierung von glatter Muskulatur schließen lässt. Weitere ähnlich geartete Ergebnisse stützen diesen Hinweis. So findet man ein ebenfalls sehr starkes Signal in vergleichbaren Gewebestrukturen der Harnblase, sowie des Dünn- und Dickdarms (s. Kap. 3.2.10.3, Abb. 3.52 und 3.53). In diesen Geweben sind jeweils die glatten Muskelzellen für die Kontraktion der Organe bzw. die Peristaltik des Darmes verantwortlich (Welsch 2006). Die teilweise starke Blaufärbung der Gefäße verschiedener Organe (s. Kap. 3.2.10.3, Abb. 3.54) kann vermutlich ebenfalls der Färbung glatter Muskelzellen zugeschrieben werden. Hier ist es wahrscheinlich der Bereich der *Tunica media* der Gefäßwände, der mit einem hohen Anteil glatter Muskelzellen ausgestattet ist (persönliche Mitteilung Dr. A. Weber, Pathologie, Universitätsklinik Mainz). Die potenzielle Beteiligung von *Wt1* an der Entstehung der glatten Muskulatur war durch den Nachweis einer *Wt1*-Expression im Epikard muriner Embryonen bereits angezeigt (s. o., vgl. Moore *et al.* 1998). Abkömmlinge epikardialer Zellen wandern ins Myokard ein und bilden dort die glatte Muskulatur der Koronargefäße (Männer *et al.* 2001, Munoz-Chapuli *et al.* 2002). Die untersuchten WE2-Effektor-Mäuse bestätigen eine solche Funktion auch für die Gefäßbildung in anderen Organen. Dies deutet eine entscheidende Funktion von *Wt1* in der Vaskulogenese an, nämlich nach der initialen Bildung des Endothels für die Entstehung und Differenzierung der Gefäßmuskulatur mitverantwortlich zu sein. Eine Beteiligung von *Wt1* an der Gefäßentwicklung bzw. an der Entstehung der glatten Muskulatur wird in diesem Fall über eine Verbindung zur Retinsäure (Aktive Form des Vitamin A, engl.: *Retinoic acid*) diskutiert (Miano und Berk 2000, Zile 2000). *Retinsäurerezeptor-k.o.*-Mäuse zeigen einen ähnlichen Phänotyp des Herzens wie die ebenfalls letalen *Wt1*^{-/-}-Mäuse, die vermutlich an den Folgen der abnormen Herzentwicklung sterben (Kreidberg *et al.* 1993, Sucov *et al.* 1994, Miano *et al.* 1995, Männer *et al.* 2001). Glatte Muskelzellen sind sowohl in Funktion als auch Differenzierung sehr heterogen, trotz allem leiten sie sich gleichermaßen von wenigen Ursprüngen des Neuroektoderms und des Mesoderms ab, die auch Ausgangsort der Entstehung von *Wt1*-positiven Geweben sind (Gittenberger-de Groot *et al.* 1999, Hirschi und Majesky 2004). Eine weitere Arbeit identifiziert das Serosamesothel des Darms (Orte der *Wt1*-Expression in der Embryogenese) als Ursprung der glatten Muskelzellen der Darmgefäße (Wilm *et al.* 2005).

Die Beurteilung von gefärbten *Zellclustern* in Präparaten von Dünndarm, Kolon und Leber dreifach transgener Tiere (s. Kap. 3.2.10.3, Abb. 3.53) bewegt sich z. Zt. im spekulativen Rahmen. Ursache der dokumentierten Färbungen könnte das vermutete Stammzellpotenzial von *Wt1* sein, durch das in diesen Zellen eine *tTA*-Expression zustande kommt. Seit eine *Wt1*-Expression in einer Subpopulation hämatopoetischer Stammzellen (HSZ, CD34+) gezeigt wurde, wird die Bedeutung und Funktion von *Wt1* in adulten Stammzellen diskutiert (Fraizer *et al.* 1995, Ellison *et al.* 2001, Alberta *et al.* 2003). Beide Organe, Darm wie Leber, haben ein hoch regeneratives Potenzial. Im Darm findet man adulte Stammzellen an der Flanke kurz über der Basis der Krypten. Nach der Proliferation wandern differenzierende Darmzellen in die Zotten, bevor sie durch den natürlichen Verschleiß ins Lumen abgegeben werden (Gregorieff und Clevers 2005). Die Regeneration der Leber beruht dagegen je nach Art der Erneuerung bzw. Art der Schädigung auf drei unterschiedlichen Zelltypen. Hepatozyten proliferieren zur ständigen Gewebserneuerung und bei schwachen Leberschädigungen. Oval-Zellen (Leberstammzellen) werden bei starken und chronischen Leberschäden aktiviert oder bei einer Inhibierung der Proliferation von Hepatozyten. Die dritte Gruppe regenerativer Leberzellen, die z. B. bei einer Leberkarzinogenese aktiv werden, sind mit dem Blutstrom zirkulierende exogene Leberstammzellen, die sich aus hämatopoetischen Stammzellen ableiten (Strain *et al.* 2000, Zhang *et al.* 2003). Interessanterweise findet man in hämatopoetischen Vorläuferzellen ähnliche Zelloberflächenmarker (u. a. CD34) wie in Oval-Zellen (Omori *et al.* 1997). Dies zeigt die Möglichkeit auf, dass HSZ, welche im Knochenmark reifen, in der Leber zu Oval-Zellen differenzieren, mit dem weiteren Potenzial, Hepatozyten hervorzubringen (Petersen *et al.* 1999).

Die erhöhte Expression von *Wt1* nach experimentellem myokardialen Infarkt in Herzen von Ratten deutet ebenfalls auf eine ähnliche Funktion von *Wt1* bei der Neo-Vaskulogenese zur Reparatur des geschädigten Gewebes hin (Wagner *et al.* 2002). Dabei sind alle aufgeführten Beispiele bisher nur Hinweise für eine mögliche Rolle von *Wt1* in undifferenzierten Zellpopulationen bzw. eventuell dedifferenzierten Zellen. Es gibt keinen Beleg für eine Expression von *Wt1* in embryonalen Stammzellen. So ist das beschriebene Potenzial für Regenerations- oder Erneuerungsvorgänge eher im Bereich der multipotenten adulten Stammzellen zu finden, die als ‚Reserve‘-Vorläuferzellen, abhängig von der jeweiligen gewebespezifischen Mikro-Umgebung, die entsprechenden Zelltypen für den kontinuierlichen Organerhalt oder die Reparatur der Gewebe hervorbringen (Young und Black 2004, Kopper und Hajdu 2004).

Natürlich können auch Artefakte nicht ausgeschlossen werden. Das bedeutet, wenn es zu einer fehlerhaften Exzision der Stop-Kassette durch die Cre-Rekombinase in nur

wenigen Zellen kommt, könnten solche Zellnester ebenfalls entstehen. Die Experimente müssen deshalb zur Überprüfung der Resultate mit mehr Tieren wiederholt werden.

Die Charakterisierung der *Wt1*-Effektor-Mauslinie WE2 zeigt ein deutliches *Wt1*-spezifisches Expressionsmuster für den *tTA* in den untersuchten Geweben. Die WE2 Effektor-Mäuse bieten deshalb ein enormes Potenzial zur Analyse von Vorgängen der Differenzierung, Homoöstase und Pathogenese in *Wt1*-positiven Organen und Geweben. Bereits die Charakterisierung der WE2-Linie ermöglicht auf Grund der Rekapitulation des *Wt1*-Expressionsmusters durch den *tTA* die Beurteilung der Rolle von *Wt1* in der murinen Embryogenese. Zur Unterstützung der gewonnenen Daten sollten jedoch ergänzende Versuche zur Zellspezifität der Expressionsorte durchgeführt werden (s. Kap. 4.3). Dies könnte auch helfen, vordergründig widersprüchliche Ergebnisse aus den verschiedenen Charakterisierungsansätzen besser einzuordnen oder gegebenenfalls auszuräumen. Zur Zeit können keine Folgen für die *tTA*-Expression resultierend aus der Inversion mit Sicherheit identifiziert werden, wenngleich diese Tatsache nicht aus den Augen verloren werden darf.

4.2.6 Überlegungen zur Rolle von *Wt1* in fetalen und adulten Geweben

Die Wahl des endogenen *Wt1*-Lokus und seiner regulatorischen Elemente für die Expression eines *tTA* führt – wie in dieser Arbeit gezeigt – zu einem *Wt1*-spezifischen Expressionsmuster und lässt durch die Interpretation der gewonnenen Ergebnisse im Gegenzug Rückschlüsse zur Funktion von *Wt1* bei der Entwicklung der entsprechenden Organe und Gewebe zu. Die Charakterisierung der WE2-Linie bestätigt die Expression von *Wt1* in Derivaten v. a. des intermediären und lateralen (splanchnischen) Mesoderms sowie des Neuroektoderms (Buckler *et al.* 1991, Armstrong *et al.* 1992, Rackley *et al.* 1993). Es gibt keine Hinweise für eine Beteiligung von *Wt1* an der Entstehung von Geweben mit endodermaler Herkunft.

Die Betrachtung der Resultate erlaubt eine vorsichtige Beurteilung der Rolle von *Wt1* in den verschiedenen Geweben zu verschiedenen Zeiten innerhalb der Ontogenese aber auch im adulten Organismus.

Die Bedeutung von *Wt1* in der Entstehung des Urogenitalsystems wird durch das stringente *tTA*-Expressionsmuster in den verschiedenen Entwicklungsstufen bis zur Etablierung der Niere und der Gonaden sichtbar (vgl. Pritchard-Jones *et al.* 1990, Pelletier *et al.* 1991 b, Mundlos *et al.* 1993). Exemplarisch liefert die Nephrogenese

möglicherweise einen Überblick der verschiedenen Funktionen von Wt1 bei der Entstehung eines Organismus.

In frühen undifferenzierten Zellen (metanephrisches Mesenchym) wirkt Wt1 anti-apoptotisch und verhindert ein Zugrundegehen der Vorläuferzellen (Kreidberg *et al.* 1993, Dressler 2002). In der anschließenden Differenzierung spielt Wt1 die Rolle eines entscheidenden Regulators zur Entstehung epithelialer (Mesenchym-Epithel-Übergang, MET) und damit funktionaler Strukturen in der Niere (Pritchard-Jones *et al.* 1990, Armstrong *et al.* 1992, Rackley *et al.* 1993). Dies führt in direkter Linie zur Entstehung der Podozyten, in denen eine *Wt1*-Expression auch im adulten Organismus erhalten bleibt (Pelletier *et al.* 1991 b, Mundlos *et al.* 1993). Zu diesem Zeitpunkt trägt Wt1 aber durch die Regulation Podozyten-spezifischer Gene wie *Nephrin* und *Podocalyxin* zur Homöostase, d. h. zum Funktionserhalt und somit zur Zellintegrität der Podozyten in den Glomeruli bei (Pavenstädt 2000, Palmer *et al.* 2001, Wagner *et al.* 2004).

Vergleicht man diese dreistufige systematische Einordnung mit den Gegebenheiten bei der Entstehung der Gonaden und den vorliegenden Erkenntnissen zur Hämatopoese, ergeben sich durchaus Gemeinsamkeiten:

Der Verlust von Wt1 in konstitutiven *Wt1*^{-/-} k.o.-Mäusen führt zur Apoptose der relevanten Zellen einer Gonadalentwicklung: Es können sich in diesen Tieren keine Keimdrüsen bilden (Kreidberg *et al.* 1993). Die anti-apoptotische Wirkweise von Wt1 muss zu diesem Zeitpunkt der Entwicklung unbedingt gegeben sein. Später dann in der Embryogenese steuert Wt1 im Zusammenspiel mit anderen Genen die geschlechtsspezifische Differenzierung der Gonaden, v. a. in Richtung männlicher Geschlechtsbildung durch die Entstehung der Hodenkanälchen und Sertoli-Zellen (s. Kap. 4.1.3, Abb. 4.1), um letztendlich in den Sertoli- wie in Granulosa-Zellen im adulten Tier aktiv zu sein (Homöostase; Pelletier *et al.* 1991 b, Mundlos *et al.* 1993, Shimamura *et al.* 1997, Kim *et al.* 1999, Wilhelm *et al.* 2002 Swain *et al.* 2002, Park *et al.* 2005 a).

Die genaue Bedeutung von WT1 in der Hämatopoese ist dagegen weniger gut aufgeklärt, ist aber ein Feld intensiver Forschung und die bisherigen Ergebnisse weisen ebenfalls in Richtung der oben beschriebenen Einordnung von WT1 (Übersicht: Algar 2002, Yoder 2004). Zum einen wurde die Expression von WT1 in einer Subpopulation undifferenzierter (CD34+/CD38-) hämatopoetischer Vorläuferzellen (HSZ, Kapazitätserhalt) nachgewiesen (Fraizer *et al.* 1995, Baird *et al.* 1997, Menssen *et al.* 1997, Ellison *et al.* 2001). Diese können sowohl myeloische als auch lymphatische Nachkommen hervorbringen (Berardi *et al.* 1995, Gothot *et al.* 1998). Zum anderen findet man WT1 aber auch in sich differenzierenden CD11b+ Zellen der myeloischen Linie (Granulozyten) und in einer Population ausdifferenzierter CD19+ B-Zellen

(Ellison *et al.* 2001). Die wenn auch relativ schwache Expression von WT1 an Orten der Hämatopoese – wie dem Dottersack, dem Knochenmark und der Leber – erhärten die Hinweise einer Funktion von WT1 bei der Entwicklung des Blutsystems (Fraizer *et al.* 1995). Die Analyse der WE2-Effektor-Linie liefert eine diffuse Färbung der AGM-Region (Aorta-Gonaden-Mesonephros), die etwa während der Embryonalstadien E8 *dpc* und E14 *dpc* ebenfalls einen Beitrag zur Entwicklung und Kolonisierung des Blutsystems leistet (Speck *et al.* 2002).

Möglicherweise lässt sich die Rolle von Wt1 in den verschiedenen Organen und Geweben grundsätzlich als tri-funktionaler Regulator mit Einfluss auf Kapazitätserhalt (Anti-Apoptose), Differenzierung und Homöostase von Zellen beschreiben (s. Abb. 4.4).

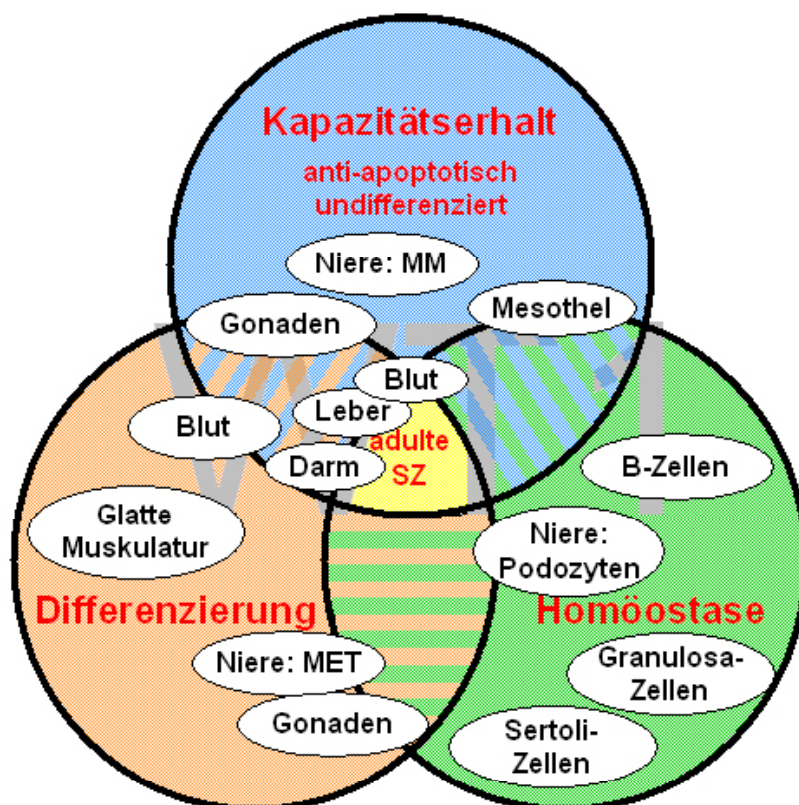


Abbildung 4.4: Funktion von WT1 im Organismus.

Die Darstellung ist das Resultat des Versuchs einer systematischen Gruppierung der Funktionen von WT1 in fetalen und adulten Geweben. Möglicherweise trifft die postulierte dreistufige Wirkungsweise – Kapazitätserhalt, Differenzierung, Homöostase – auf alle Organe zu, die unter der Beteiligung von WT1 entstehen. Die Einordnung der Rolle von WT1 in den Organen Niere, Gonaden und Blut (bzw. bei deren Entstehung) ergibt sich aus dem Text (s. o.). Eine Bedeutung von WT1 in adulten Stammzellen wird bisher nur vermutet und wurde aufgrund der entsprechenden Publikationen und Hinweise aus der eigenen Arbeit ins Schaubild aufgenommen.

(MET): Mesenchyme-Epithelial-Transmission, (MM): Metanephrisches Mesenchym, (SZ): Stammzellen.

Ausgehend von dieser systematischen Klassifizierung lassen sich dann auch Hypothesen zu den molekularen Mechanismen einer Wt1-vermittelten Pathogenese

ableiten: Je nachdem, zu welchem Zeitpunkt/Stadium der Entwicklung und der zu diesem Zeitpunkt eingenommenen Rolle/Funktion von WT1 (s. Abb. 4.4, Kompartimente der Einteilung) eine aberrante Expression des Transkriptionsfaktors entsteht, ließe sich der daraus resultierende Pathomechanismus ableiten:

Betrachtet man beispielsweise die Funktion von WT1 bei der Entstehung von Wilms-Tumoren, aus der seine Einordnung als Tumorsuppressor resultiert, würde man die Bedeutung des Verlusts von WT1 im Zeitraum seiner Rolle als Differenzierungsgen in der Niere suchen. Diese Einschätzung ergibt sich aus der Tatsache, dass – läge der WT1-Funktionsverlust früher in der Entwicklung und damit in der Phase des WT1-vermittelten Kapazitätserhalts – durch Apoptose des metanephrischen Mesenchyms (MM) keine Nieren angelegt würden (vgl. *Wt1* k.o.-Maus, Kreidberg *et al.* 1993). Der bereits beschriebene WT1-Pathomechanismus, dass WTs aus sogenannten nephrogenen Resten (Beckwith *et al.* 1990, Park *et al.* 1993 a) – Nester persistierender undifferenzierter Zellen des Nierenblastems –, entstehen, passt zur Einschätzung, dass WT1 bei der WT-Pathogenese als Regulator der Differenzierung verloren geht.

Neben seiner Funktion als Tumorsuppressor verweisen neuere Arbeiten immer öfter auch auf das onkogene Potenzial von WT1, was scheinbar im Konflikt mit der ursprünglichen, weil historisch früher aufgeklärten tumorsupprimierenden Funktion von WT1 steht. Erste Hinweise dafür kamen aus den Beobachtungen, dass *WT1* in 80 % lymphatischer und in 90 % myeloischer Leukämien exprimiert ist (Miwa *et al.* 1992, Miyagi *et al.* 1993, Bergmann *et al.* 1997, Algar 2002). Der hier zugrunde liegende WT1-Pathomechanismus ist vermutlich der dysregulierte, WT1-vermittelte Kapazitätserhalt und entfaltet sich möglicherweise durch die Regulation von Proto-Onkogenen wie *MYC* und *BCL2* zu bestimmten Zeitpunkten und in einem definierten zellulären Kontext (Han *et al.* 2004, Mayo *et al.* 1999). Gerade der regulatorische Effekt auf das anti-apoptotisch wirkende *BCL2* und das pro-apoptotische *BAK* scheint hierbei eine wichtige Rolle zu spielen (Karakas *et al.* 2002, Morrison *et al.* 2005). Für die Modulation einer *BCL2*-Expression, sei es aktivierend oder reprimierend, wird eine Interaktion von WT1 mit dem bereits in der Einleitung (s. Kap. 1.3.4) genannten *PAR4* als Co-Modulator diskutiert. Diese Wechselwirkung scheint u. a. über die Exon 5-Sequenzen von WT1 vermittelt zu werden und hat in diesem Fall eine reprimierende Wirkung auf *BCL2*. Mutationen im entsprechenden 5'-Bereich von *WT1* verhindern die notwendige Interaktion für diese Repression und es kommt zu einer aberranten *BCL2*-Expression (Johnstone *et al.* 1996, Richard *et al.* 2001, Cheema *et al.* 2003).

Ungeklärt und die entscheidende Frage dabei ist, ob die *WT1*-Expression notwendiger Teil einer malignen Transformation der Tumor-Zellen ist, oder ob sie einfach die ursprüngliche Beteiligung undifferenzierter *Wt1*-exprimierender Vorläuferzellen widerspiegelt (Algar 2002). Ausgehend von einer anti-apoptotischen Funktion von *WT1* in frühen Zellstadien (s. Abb. 4. 4, Kapazitätserhalt) scheint es möglich, dass beide Bedingungen zutreffen: Da *WT1* zum Kapazitätserhalt beiträgt, möglicherweise sogar (zumindest im hämatopoetischen Kompartiment) der 'Stammzellfaktor' ist, ist die aktive *WT1*-Expression gleichzeitig Ausdruck des 'ursprünglichen Charakters' und notwendige Voraussetzung für die maligne Transformation (durch die pathologische Vermehrung des Stammzellkompartiments). Gerade unter dem Gesichtspunkt, dass es für einen Organismus vermutlich 'leichter' ist undifferenzierte Vorläuferzellen mit bestimmten pluripotenten/multipotenten Eigenschaften in den Geweben zu erhalten (adulte Stammzellen), als bei der Krankheitsentstehung diese Potenziale und Programme in bereits differenzierten Zellen wieder zu reaktivieren (Dedifferenzierung) (Kopper und Hajdú 2004).

Viele Fragen zur Verifizierung des oben vorgeschlagenen Systems für eine generelle Einordnung der *WT1*-Funktionen sind allerdings noch zu klären. Um die Vorgänge in der Entwicklung zum jeweiligen Zeitpunkt und in definierten Zellverbänden *in vivo* aufzuschlüsseln, erfordert es geeignete induzierbare Tiermodelle. Die in dieser Arbeit generierte *Wt1*-spezifische *WE2 (Wt1-tTA^{+/-})*-Effektor-Mauslinie schafft aufgrund der durchgeführten Charakterisierung die Grundlage, z. B. über die Möglichkeit zur Regulation interessanter Zielgene, diese Fragestellungen zu beantworten.

4.3 Ausblick

Die Komplexität der Rolle von *WT1* in der Embryonalentwicklung sowie im adulten Lebewesen macht den Einsatz muriner konditionaler Modellsysteme unerlässlich, um die verschiedenen Funktionen von *WT1* sukzessive aufzuklären. Die hier präsentierte Arbeit liefert dazu einen wichtigen Beitrag, da sie Möglichkeiten und Probleme transgener *Wt1*-Modelle aufzeigt und gleichzeitig ein Werkzeug für die Entschlüsselung *Wt1*-relevanter Fragestellungen liefert. Hierfür sollen relativ zeitnah einerseits noch offene entscheidende Charakterisierungen zu den generierten Mauslinien abgeschlossen und andererseits neue Projekte in Zusammenhang mit der *Wt1-tTA* Effektor-Linie in Angriff genommen werden. Auf beides wird im Folgenden kurz eingegangen:

Im Falle der **Responder-Linien** (*Wt1-Resp1* und *Wt1-Resp2*) ist abschließend zu klären, ob die Transgene tatsächlich transkriptionell still gelegt wurden oder ob eine der Linien noch zu induzieren ist. Dies ist entscheidend, da bei einer Inaktivierung diese Mauslinien unbrauchbar sind. Sollte allerdings das Transgen auf RNA-Ebene weiterhin regulierbar nachweisbar sein, wird einer erneuter Versuch eines *Rescue* des *Wt1-knock outs* unternommen. Dabei steht im Vordergrund, ob das generierte Konstrukt mit den möglichen *Wt1*-Proteinisoformen hierzu imstande ist oder ob es zu einem anders gearteten Phänotyp wie bei der oben aufgezeigten Verschiebung des Geschlechterverhältnisses kommt. Zur Zeit wird mittels einer spezifischen PCR zur Detektion des Y-chromosomal lokalisierten *Sry*-Gens versucht unter den phänotypisch doppelt transgenen ♀ (*Wt1-tTA/Resp2*) genotypische ♂ nachzuweisen.

Zusätzlich wurde während dieser Arbeit eine weitere transgene *Responder*-Linie (DDS 4) hergestellt, in der in die *musWt1*^{+Ex 5; +/-KTS}-cDNA eine Punktmutation eingeführt wurde, die an Position 394 von *Wt1* zu einem AS-Austausch von Arginin zu Glutamin führt (R394Q). Diese typische DDS-ähnliche Mutation wurde als zweiter *Hit* in einem Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML) mit einer t(8;21)-Translokation (AML/ETO, s. Kap. 1.3.6) gefunden und führt möglicherweise zu einem dominant/negativ-wirkenden *Wt1*-Protein (Miyagawa *et al.* 1999). Die Verpaarung mit *Wt1-tTA*^{+/-} Effektor-Mäusen könnte zu einem *Wt1*-spezifischen *knock out* mit den zu erwartenden Folgen führen. Eine zusätzliche Verpaarung mit transgenen *AML/ETO*-Mäusen (Yuan *et al.* 2001) liefert möglicherweise ein dem obigen Patienten ähnliches Modell zur Untersuchung von AML in Mäusen (vgl. Nishida *et al.* 2006).

Die Schwierigkeiten transgener *Wt1*-Mausmodelle, die über eingeführte cDNAs nur Teile der benötigten *Wt1*-Isoformen exprimieren und damit keinen *Rescue* des *Wt1-knock outs* erzielen bzw. nur Ausschnitte der kompletten *Wt1*-Funktionen ersetzen können, legen die Anwendung einer neueren Technik zur Erzeugung eines konditionalen murinen *Wt1 k.o.*-Modells nahe: Eine sinnvolle Ergänzung der vorhandenen *Wt1*-Effektor-Mäuse wäre eine *Responder*-Linie, die induzierbar eine *Wt1*-spezifische *siRNA* exprimiert. Die Methode der *RNA interference* (RNAi; Übersicht: Lenz 2005, Dorsett und Tuschl 2004) hat ihre Funktionalität im Säugersystem, trotz verschiedener Probleme, bereits bewiesen (McCaffrey *et al.* 2002). Arbeiten von Davies *et al.* (2004) und Rao *et al.* (2006) mit einer *Wt1*-*siRNA* zeigen einen deutlichen *knock down* von endogenem *Wt1* und entsprechend starke pathologische Phänotypen in Gewebekulturen der Niere und im Hoden von transgenen Mäusen. Die Verwendung dieser *Wt1*-spezifischen *siRNA* in Kombination mit regulierbaren Vektoren auf Basis des *Tet on/off*- (Wetering *et al.* 2003) bzw. des *Cre/lox*-Systems (Ventura *et al.* 2004) befinden sich in Vorbereitung.

Für die **Wt1-tTA^{+/-}-Effektor-Linie** ist es das vordringlichste Ziel, die aus den Charakterisierungen mit Reporter-Mäusen gewonnenen Erkenntnisse hinsichtlich der zellulären Expressionsorte des tTA durch immunhistochemische Färbemethoden zu verifizieren. Nur so lässt sich das Potenzial der generierten Effektor-Linie als Treiber für interessante Zielgene in der Nephrogenese, der Gonadalentwicklung, der Vaskulogenese oder aber in Pathogeneseprozessen dieser Organe/Gewebe beschreiben.

Um die Funktionalität des Wt1-Effektors in einem definierten Tumor-Mausmodell zu testen, wurden *Wt1-tTA^{+/-}/LC1*-Effektor-Mäuse mit *Pten^{fllox}*-Mäusen (Suzuki *et al.* 2001) unter Dox-Applikation verpaart. *Pten* ist ein hochaktives Tumorsuppressorgen, dessen Verlust für verschiedene Tumore, u. a. Brust-, Prostata- und Ovarialkrebs, bereits beschrieben wurde (Übersicht: Leslie und Downes 2004, Kishimoto *et al.* 2003). Ohne Dox-Administration kommt es in *Wt1-tTA^{+/-}/LC1/Pten^{fllox}*-Mäusen zu einem Funktionsverlust von *Pten* in Wt1-positiven Organen. Es konnte bisher ein Tier mit Lymphomen im Leisten- und Halsbereich identifiziert werden. Ob die Tumorinduktion auf den Wt1-Effektor zurückzuführen ist, wird zur Zeit untersucht. Allerdings konnte bereits gezeigt werden, dass im Tumorgewebe die Exzision der geflochtenen *Pten*-Sequenzen stattgefunden hat.

In einem weiteren Projekt wird die Wt1-Effektor-Mauslinie erneut zur Generierung eines murinen Wilms-Tumormodells eingesetzt. Grundlage hierbei ist, dass sich bei Wilms-Tumoren zwei Entitäten – eine mit funktioneller Inaktivierung des WT1 Tumorsuppressorproteins und eine ohne diesen Befund – unterscheiden lassen. Untersuchungen an Wilms-Tumorproben ergaben zunächst einen Anteil von 15 % mit Mutationen im *β-Catenin*-Gen (*CTNNB1*). Die identifizierten *Missense*-Mutationen bzw. kleineren Deletionen betreffen vor allem die für die Phosphorylierung vorgesehenen Aminosäuren in Exon 3 (s. Kap. 1.3.4, Koesters *et al.* 1999, Kusafuka *et al.* 2002). Entsprechend führen sie zur Stabilisierung und Akkumulation von *β-Catenin* und folglich zu einer konstitutiven Expression von WNT-Zielgenen wie *MYC* und *Cyclin D1* (*CCND1*). Eine weitere Studie stützt diese Ergebnisse und findet darüber hinaus eine starke Korrelation von *WT1* und *β-Catenin* Mutationen in WT (Maiti *et al.* 2000): Mindestens 75 % der WT mit *WT1*-Mutationen zeigen aktivierende Mutationen in *CTNNB1*. Weitere gefundene Läsionen zeigen einen *LOH* in 5q21, der das *APC*-Gen betrifft und den angegebenen Prozentsatz von Tumoren mit aberranter WNT-Signalkaskade möglicherweise noch erhöht (Hoban *et al.* 1997, Mannens *et al.* 1990). Diese Beobachtungen deuten auf eine Aktivierung der WNT-Signalkaskade in der Gruppe der WT1-defizienten WT hin, während WT, deren Pathogenese anscheinend nicht auf der Inaktivierung des WT1-Proteins beruht, diese Mutationen nicht zeigen. Die offenbar im WT-Gewebe auftretende Selektion maligner, entarteter Zellen, welche kein funktionelles

WT1-Protein, jedoch entsprechend stabilisiertes β -Catenin aufweisen, ist vermutlich auf die Überexpression einer Vielzahl von Transkriptionsfaktoren und Signalmolekülen zurückzuführen. Ihre Dysregulation scheint den Funktionsverlust von *WT1* in den betroffenen Zellen zu kompensieren, diese der Apoptose zu entziehen und so die Voraussetzung für die klonale Expansion *WT1*-defizienter Tumorzellen im Rahmen der *WT*-Progression zu ermöglichen (Li *et al.* 2004). Die Expression von stabilisiertem β -Catenin in *Wt1*-positiven Geweben soll durch die Verpaarung von *Wt1-tTA^{+/-}/LC1*-Mäusen mit *Catnb(floxEx3)*-Mäusen erreicht werden. Diese Linie *Catnb(floxEx3)* trägt das Exon 3 flankiert von *loxP*-Sequenzen, die bei Anwesenheit der Cre-Rekombinase zu dessen Exzision führen (Harada *et al.* 1999). Damit werden im entsprechenden Protein die Aminosäuren entfernt, deren Phosphorylierung durch die Glykogen-Synthasekinase 3 (GSK3) die Ubiquitin-vermittelte Degradation von β -Catenin kontrolliert (Morin *et al.* 1997, Rubinfeld *et al.* 1997). Die daraus resultierende Stabilisierung von β -Catenin führt zur Expression von Wnt-Zielgenen wie *Cyclin D1*, *c-Myc* und *Id2* (He *et al.* 1998, Shtutman *et al.* 1999, Rockman *et al.* 2001) und sollte – insbesondere auf einem *Wt1^{+/-}*-Hintergrund – Wilms-Tumore induzieren.

Parallel hierzu wird in Kooperation mit Dr. V. Huff (Anderson Cancer Center, Houston/Texas, USA) eine ähnliche Verpaarung mit der gleichen Zielsetzung der Induktion von Wilms-Tumoren bzw. der Analyse *Wt1*-relevanter Entwicklungsstörungen vorgenommen: So sollen in diesem Projekt zunächst *Wt1^{flox}/tTA/LC1*-Mäuse erzeugt werden, in denen durch Dox-Entzug die Exzision der geflochten *Wt1*-Exons 8 und 9 (s. Kap. 1.3.7: *Wt1*-Mausmodelle, Gao *et al.* 2006) zu einem homozygoten *Wt1-knock out* führt. Wahlweise soll dies mit der zusätzlichen Expression von stabilisiertem β -Catenin durch das Einkreuzen von *Catnb(floxEx3)*-Mäusen (s. o.) erfolgen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Der Wilms-Tumor (WT, Nephroblastom) ist ein embryonaler Nierentumor, der durch die maligne Transformation von undifferenziertem Nierengewebe, sog. nephrogenen Resten, entsteht. WT treten mit einer Inzidenz von 1 in 10.000 Lebendgeburten auf. Das Hauptmanifestationsalter, der normalerweise einseitig und sporadisch auftretenden Tumore, liegt zwischen dem 3. und 4. Lebensjahr. Etwa 10 % der Patienten entwickeln jedoch bilaterale Tumore. In diesen Fällen ist eine Assoziation mit komplexen genetischen Krankheitsbildern (u. a. WAGR-, Denys-Drash-, Frasier- und Beckwith-Wiedemann-Syndrom) festzustellen. In 2 % aller WT-Fälle ist ein familiärer Hintergrund nachgewiesen.

In 15 % der sporadischen WT sind Mutationen im *WT1* (*Wilms-Tumor 1*)-Gen beschrieben. *WT1* besteht aus zehn Exons und weist typische Merkmale von Transkriptionsfaktoren (z. B. vier Zinkfinger) auf. Zwei alternative Spleißereignisse betreffen Exon 5 (+/-Exon 5) und Exon 9 (Transkripte mit bzw. ohne die codierenden Sequenzen für die AS Lysin-Threonin-Serin; +/-KTS). Die Lage der drei alternativ vorhandenen AS zwischen den Zinkfingern 3 und 4 bestimmt die verschiedenen Funktionen der WT1-Proteine (4 Isoformen) als Transkriptionsfaktor (-KTS) bzw. als RNA-bindendes Protein (+KTS). Das zunächst im Zusammenhang mit WT als Tumorsuppressorgen identifizierte *WT1* ist ein Entwicklungsgen mit einem sehr komplexen Expressionsmuster in der Embryonalentwicklung. Dabei ist v. a. die Bedeutung in der Urogenitalentwicklung entscheidend. Konstitutive, homozygote *Wt1*^{-/-} k.o.-Mäuse sind embryonal (~ E13,5 dpc) letal und bilden u. a. keine Gonaden und keine Nieren. Aus diesem Grund existiert bisher kein Wilms-Tumormodell.

Die Herstellung eines konditionalen murinen Tiermodells auf Basis des *Tet on/off*-Systems zur Untersuchung der Nierenentwicklung bzw. zur Analyse der Wilms-Tumorpathogenese war Ziel dieser Arbeit. Hierfür wurden drei Mauslinien generiert:

Zwei transgene sog. *Responder*-Linien, die eine chimäre spleißbare *Wt1*-cDNA der Variante *musWt1*^{+Exon 5; +/-KTS} unter der Kontrolle eines Tet-responsiven Promotors im Genom tragen. Dieses tTA/Dox-abhängig regulierbare *Wt1*-Transgen (tg*Wt1*) sollte (exogen regulierbar) die Expression des endogenen *Wt1*-Lokus ausreichend nachahmen, um die kritischen Phasen der Embryogenese zu überwinden und lebensfähige Tiere zu erhalten. Parallel dazu wurde die *Wt1*-Effektor-Mauslinie (WE2) generiert. Diese trägt einen tetrazyklinabhängigen Transaktivator (tTA) zur Steuerung Tet-regulierbarer Transgene unter der Kontrolle des endogenen *Wt1*-Promotors. Die durch homologe Rekombination in ES-Zellen erreichte Integration des tTA direkt am Translationsstartpunkt des *Wt1*-Lokus hat in den Tieren einen heterozygoten *Wt1 knock out/tTA knock in* zur Folge. Die bisher vorgenommenen Verpaarungen doppelt transgener *Wt1-tTA*^{+/-}/*Resp-*

Mäuse ergaben keinen *Rescue* des letalen *Wt1* *k.o.* und es konnten bislang keine Wilms-Tumore induziert werden.

Alle im Verlauf der Arbeit generierten Mauslinien wurden umfassend charakterisiert. So konnte für die Tiere der *Responder*-Linien *Wt1-Resp1* (mit zusätzlichen Isolator-Sequenzen zum Schutz des Transgens vor Positionseffekten) und *Wt1-Resp2* (ohne Isolatoren) konnte die Tet-induzierbare Expression und die Spleißbarkeit des tg*Wt1* in MEF-Assays und mittels Effektor-Mäusen auf RNA-Ebene nachgewiesen werden.

Die genomische Charakterisierung der WE2-Linie ergab eine ungeklärte etwa 120 kb große Inversion am *Wt1*-Lokus, die alle 5'-regulatorischen Sequenzen mitsamt des tTA vom Rest von *Wt1* trennt. Tiere dieser Linie weisen aber dennoch einen funktionalen *Wt1* *k.o.* auf: Unter den Nachkommen aus *Intercross*-Verpaarungen von *Wt1-tTA^{+/-}*-Mäusen lassen sich auf Grund der Letalität keine *Wt1^{-/-}*-Genotypen nachweisen. Die Charakterisierung der Effektor-Linie auf RNA-Ebene und mittels Reporter-Mäusen liefert ein *Wt1*-analoges tTA-Expressionsmuster: So findet man eine deutliche tTA-Expression u. a. in Niere (Glomeruli), Uterus, Ovar und Testis. Die hier vorgestellten Experimente ergeben darüber hinaus eindeutige Hinweise einer Beteiligung von *Wt1* in der Entstehung der glatten Muskulatur bzw. in der Vaskulogenese.

6. LITERATUR

- Adams, J. M., Harris, A. W., Pinkert, C. A., Corcoran, L. M., Alexander, W. S., Cory, S., Palmiter, R. D., Brinster, R. L. (1985): The c-myc oncogene driven by immunoglobulin enhancers induces lymphoid malignancy in transgenic mice. *Nature* 318: 533-538
- 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: 2570-2574
- Algar, E. (2002): A review of the Wilms' tumor gene (WT1) and its role in hematopoiesis and leukemia. *Journal of Hematotherapy & Stem Cell Research* 11: 589-599
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D. J. (1997): Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25: 3389-3402
- Alwine, J. C., Kemp, D. J., Stark, G. R. (1977): Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74 (12): 5350-5354
- Anand-Ivell, R. J., Relan, V., Balvers, M., Coiffec-Dorval, I., Fritsch, M., Bathgate, R. A. (2006): Expression of the insulin-like peptide 3 (INSL3) hormone receptor (LGR8) system in the testis. *Biology of Reproduction* 74 (5): 945-953
- Angrand, P. O., Daigle, N., van der Hoeven, F., Schöler, H. R., Stewart, A.F. (1999): Simplified generation of targeting constructs using ET recombination. *Nucleic Acids Research* 27 (17): e16
- Armstrong, J. F., Pritchard-Jones, K., Bickmore, W. A., Hastie, N. D., Bard, J. B. L. (1992): Expression of the Wilms' tumour gene, WT1, in the developing mammalian embryo. *Mechanisms of Development* 40: 85-97
- Atchley, W. R., Fitch, W. M. (1991): Gene trees and the origins of inbred strains of mice. *Science* 254: 554-558
- Auerbach, W., Dunmore, J. H., Fairchild-Huntress, V., Fang, Q., Auerbach, A. B., Huszar, D., Joyner, A. L. (2000): Establishment and chimera analysis of 129/SvEv- and C57BL/6- derived mouse embryonic stem cell lines. *BioTechniques* 29 (5): 1024-1032
- Baird, P., Simmons, P. (1997): Expression of the Wilms' tumor gene WT1 in normal hematopoiesis. *Experimental Hematology* 25: 312-320
- Barboux, S., Niaudet, P., Gubler, M. C., Grunfeld, J. P., Jaubert, F., Kuttann, F., Fekete, C. N., Souleyreautherville, N., Thibaud, E., Fellous, M., McElreavey, K. (1997). Donor splice-site mutations in WT1 are responsible for Fraiser-syndrome. *Nature genetics* 17: 467-470
- Bardeesy, N., Zabel, B., Schmitt, K., Pelletier, J. (1994): WT1 mutations associated with incomplete Denys-Drash syndrome define a domain predicted to behave in a dominant-negative fashion. *Genomics* 21: 663-665
- Bardeesy, N., Falkoff, D., Petruzzi, M. J., Nowak, N., Zabel, B., Adam, M., Aguiar, M. C., Grundy, P., Shows, T., Pelletier, J. (1994): Anaplastic Wilms' tumour, a subtype displaying poor prognosis, harbours P53 gene mutations. *Nature Genetics* 7: 91-97
- Bardeesy, N., Beckwith, J. B., Pelletier, J. (1995): Clonal expansion and attenuated apoptosis in Wilms' tumor are associated with P53 gene mutations. *Cancer Research* 55: 215-219.
- Barinaga, M. (1994): Knockout mice: Round two. *Science* 265: 26-28
- Beck, J. A., Lloyd, S., Hafezparast, M., Lennon-Pierce, M., Eppig, J. T., Festing, M. F. W., Fisher, E. M. C. (2000): Genealogies of mouse inbred strains. *Nature Genetics* 24: 23-25

- Beckwith, J. B., Kiviat, N. B., Bonadio, J. F. (1990): Nephrogenic rests, nephro-blastomatosis, and the pathogenesis of Wilms' tumor. *Pediatric Pathology* 10: 1-36
- Beckwith, J. B. (1997): New developments in the pathology of Wilms tumor. *Cancer Investigation* 15: 153-162
- Beckwith, J. B. (1998): Nephrogenic Rests and the pathogenesis of Wilms Tumor: Developmental and clinical considerations. *American Journal of Medical Genetics* 79: 268-273
- Bejsovec, A. (2005): Wnt pathway activation: New relations and locations. *Cell* 120: 11-14
- Bell, A. C., Felsenfeld, G. (1999): Stopped at the border: boundaries and insulators. *Current Opinion in Genetics & Development* 9: 191-198
- Bell, A. C., West, A. G., Felsenfeld, G. (2001): Insulators and boundaries: Versatile regulatory elements in the eukaryotic genome. *Science* 291: 447-450
- Berardi, A. C., Wang, A., Levine, J. D., Lopez, P., Scadden, D. T. (1995): Functional isolation and characterization of human hematopoietic stem cells. *Science* 267: 104-108
- Bergmann, L., Miething, C., Maurer, U., Brieger, J., Karakas, T., Weidemann, E., Hoelzer, D. (1997): High levels of Wilms' tumor gene (*wt1*) mRNA in acute myeloid leukemias are associated with a worse long-term outcome. *Blood* 90: 1217-1225
- Beuken, E., Vink, C., Bruggemann, C. A. (1998): One-step procedure for screening recombinant plasmids by size. *Biotechniques* 24: 748-750
- Bishop, C. E., Boursot, P., Baron, B., Bonhomme, F., Hatat, D. (1985): Most classical *Mus musculus domesticus* laboratory mouse strains carry a *Mus musculus musculus* Y chromosome. *Nature* 315: 70-72
- Bockamp, 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. *Physiological Genomics* 11: 115-132
- Boguski, M.S. (2002): The mouse that roared. *Nature* 420: 515-516
- 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
- Bouma, G. J., Hart, G. T., Washburn, L. L., Recknagel, A. K., Eicher, E. M. (2004): Using real time RT-PCR analysis to determine multiple gene expression patterns during XX and XY mouse fetal gonad development. *Gene Expression Patterns* 5 (1): 141-149
- Bowers, B. J., Owen, E. H., Collins, A. C., Abeliovich, A., Tonegawa, S., Wehner, J. M. (1999): Decreased ethanol sensitivity and tolerance development in gamma-protein kinase C null mutant mice is dependent on genetic background. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 23 (3): 387-97
- Bradley, A. (2002): Mining the mouse genome. *Nature* 420: 512-514
- Braselmann, M., Graninger, P., Busslinger, M. (1993): A selective transcriptional induction system for mammalian cells based on Gal4-estrogen receptor fusion proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 1657-1661
- Breslow, N., Olshan, A., Beckwith, B., Green, D. M. (1993): Epidemiology of Wilms tumor. *Medical and Pediatric Oncology* 21: 172-181
- Breslow, N. E., Olson, J., Moksness, J., Beckwith, J. B., Grundy, P. (1996): Familial Wilms' tumor: a descriptive study. *Medical and Pediatric Oncology* 27: 398-403

- Brinster, R. L., Chen, H. Y., Messing, A., van Dyke, T., Levine, A. J., Palmiter, R. D. (1984): Transgenic mice harboring SV40 t-antigen genes develop characteristic brain tumors. *Cell* 37: 367-379
- Brown, K. W., Malik, K. T. A. (2001): The molecular biology of Wilms' tumor. *Expert Reviews in Molecular Medicine* 14 May: 1-16
- Bruening, W., Bardeesy, N., Silverman, B. L., Cohn, R. A., Machin, G. A., Aronson, A. J., Housman, D., Pelletier, J. (1992): Germline intronic and exonic mutations in the Wilms' tumor gene (WT1) affecting urogenital development. *Nature Genetics* 1:144-148
- Bruening, W., Winnett, E., Pelletier, J. (1995): Wilms' Tumor: A paradigm for insights into development and cancer. *Cancer Investigation* 13(4): 431-443
- Bruening, W., Pelletier, J. (1996): A non-AUG translational event generates novel WT1 isoforms. *The Journal of Biological Chemistry* 271(15): 8646-8654
- Bucan, M., Abel, T. (2002): The mouse: genetics meets behaviour. *Nature Reviews Genetics* 3(2): 114-123.
- Buchholz, F., Refaeli, Y., Trumpp, A., Bishop, J. M. (2000): Inducible chromosomal translocation of AML1 and ETO genes through Cre/loxP-mediated recombination in the mouse. *EMBO Reports* 1 (2): 133-139
- Buckler, A. J., Pelletier, J., Haber, D. A., Glaser, T., Housman, D. E. (1991): Isolation, characterization, and expression of the murine Wilms' Tumor gene (WT1) during kidney development. *Molecular and Cellular Biology* 11 (3): 1707-1712
- Burgess-Beusse, B., Farrell, C., Gaszner, M., Litt, M., Mutskov, V., Recillas-Targa, F., Simpson, M., West, A., Felsenfeld, G. (2002): The insulation of genes from external enhancers and silencing chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 99 (Suppl. 4) : 16433-16437
- Burrow, C. R. (2000): Regulatory molecules in kidney development. *Pediatric Nephrology* 14: 240-253
- 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
- Chang, C., Chen, Y.-T., Yeh, S.-D., Xu, Q., Wang, R.-S., Guillou, F., Lardy, H., Yeh, S. (2004): Infertility with defective spermatogenesis and hypotestosteronemia in male mice lacking the androgen receptor in Sertoli cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 101: 6876-6881
- 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
- Cheema, S. K., Mishra, S. K., Rangnekar, V. M., Tari, A. M., Kumar, R., Lopez-Berestein, G. (2003): Par-4 Transcriptionally Regulates Bcl-2 through a WT1-binding Site on the *bcl-2* Promoter. *Journal of Biological Chemistry* 278 (22): 19995-20005
- Chin, L., Tam, A., Pomerantz, J., Wong, M., Holash, J., Bardeesy, N., Shen, Q., O'Hagan, R., Pantginis, J., Zhou, H., Horner II, J. W., Cordon-Cardo, C., Yancopoulos, G. D., Depinho, R. A. (1999): Essential role for oncogenic Ras in tumour maintenance. *Nature* 400: 468-472
- Chung, J. H., Bell, A. C., Felsenfeld, G. (1997): Characterization of the chicken β -globin insulator. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 94: 575-580
- Clipsham, R., Niakan, K., McCabe, E. R. (2004): Nr0b1 and its network partners are expressed early in murine embryos prior to steroidogenic axis organogenesis. *Gene Expression Patterns* 4 (1): 3-14

- 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., Huff, V., Pelletier, J. (1993): Denys-Drash syndrome: relating a clinical disorder to genetic alterations in the tumor suppressor gene WT1. *Journal of Pediatrics* 123: 673-678
- Crawley, J. N., Belknap, J. K., Collins, A., Crabbe, J. C., Frankel, W., Henderson, N., Hitzemann, R. J., Maxson, S. C., Miner, L. L., Silva, A. J., Wehner, J. M., Wynshaw-Boris, A., Paylor, R. (1997): Behavioral phenotypes of inbred mouse strains: implications and recommendations for molecular studies. *Psychopharmacology* 132: 107-124
- Curran, R. C., Crocker, J. (2001) : Atlas der Histopathologie. 5. Auflage. Springer-Verlag Berlin
- 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
- Davies, J. A. , Lodomery, M., Hohenstein, P., Michael, L., Shafe, A., Hastie, N. (2004): Development of an siRNA-based method for repressing specific genes in renal organ culture and its use to show that the WT1 tumor suppressor is required for nephron differentiation. *Human Molecular Genetics* 13 (2): 235-246
- Decker, J., Zabel, B. (2000): Familiäre Tumorerkrankungen. In: Wullich, B., Zang, K. (Hrsg.): *Genetik von Krankheiten des Urogenitalsystems*. Springer-Verlag. 275-302
- Dettman, R. W., Denetclaw, W. Jr., Ordahl, C. P., Bristow, J. (1998): Common epicardial origin of coronary vascular smooth muscle, perivascular fibroblasts, and intermyocardial fibroblasts in the avian heart. *Developmental Biology* 193 (2): 169-181
- Devon, R. S. , Porteous, D. J. , Brookes, A. J. (1995): Splinkerettes – improved vectorettes for greater efficiency in PCR walking. *Nucleic Acids Research* 23 (9): 1644-1645
- Doetschman, T., Eistetter, H., Katz, M., Schmidt, W., Kemler, R. (1985): The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *Journal of Embryology and Experimental Morphology* 87: 27-45
- Doetschman, T., Gregg, R. G., Maeda, N., Hooper, M. L., Melton, D. W., Thompson, S., Smithies, O. (1987): Targetted correction of a mutant HPRT gene in mouse embryonic stem cells. *Nature* 330: 576-578
- Doetschman, T. (1994): *Transgenic Animal Technology. A Laboratory Handbook* (Hrsg: Pinkert, C. A.), Academic Press Inc., San Diego
- Donehower, L. A, Harvey, M., Slagle, B. L., McArthur, M. J., Montgomery Jr, C. A., Butel, J. S., Bradley, A. (1992): Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* 356: 215-221
- Dorsett, Y., Tuschl, T. (2004): siRNAs: Applications in functional genomics and potentials as therapeutics. *Nature Reviews in Drug discovery* 3: 318-329
- Dressler, G. R. (2002): Development of the excretory system. In: *Mouse development*, Rosant, J., Tam, P. P. L. (Hrsg.), Academic Press: 395-420
- Dymecki, S. M. (1996): Flp recombinase promotes site-specific DNA recombination in embryonic stem cells and transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 93: 6191-6196
- Dyson, E., Sucov, H. M., Kubalak, S. W., Schmid-Schonbein, G. W., Delano, F. A., Evans, R. M., Ross, J., Chien, K. R. (1995): Atrial-like phenotype is associated with embryonic ventricular failure in retinoid X receptor a $-/-$ mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 7386-7390

- 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. *The EMBO Journal* 20 (8): 1897-1909
- Felsher, D. W., Bishop, J. M. (1999): Reversible tumorigenesis by MYC in hematopoietic lineages. *Molecular Cell* 4: 199-207
- Ferris, S. D., Sage, R. D., Wilson, A. C. (1982): Evidence from mtDNA sequences that common laboratory strains of inbred mice are descended from a single female. *Nature* 295: 163-165
- Fisher, G. H., Wellen, S. L., Klimstra, D., Lenczowski, J. M., Tichelaar, J. W., Lizak, M. J., Whitsett, J. A., Koretsky, A., Varmus, H. E. (2001): Induction and apoptotic regression of lung adenocarcinomas by regulation of a K-Ras transgene in the presence and absence of tumor suppressor genes. *Genes & Development* 15: 3249-3262
- Fleenor, D. E., Kaufman, R. E. (1993): Characterization of the Dnase I hypersensitive site 3' of the human β globin gene domain. *Blood* 81 (10): 2781-2790
- Fleming, S. (1997): Genetics of renal tumours. *Cancer and Metastasis Reviews* 16: 127-140
- Fraizer, G. C., Wu, Y.-J., Hewitt, S. M., Maity, T., Ton, C. C. T., Huff, V., Saunders, G. F. (1994): Transcriptional regulation of the human Wilms' Tumor gene (WT1). *The Journal of Biological Chemistry* 269 (12): 8892-8900
- Fraizer, G. C., Patmasiriwat, P., Zhang, X., Saunders, G. F. (1995): Expression of the tumor suppressor gene WT1 in both human and mouse bone marrow. *Blood* 86 (12): 4704-4706
- Fukumura, D., Xavier, R., Sugiura, T., Chen, Y., Park, E., Lu, N., Selig, M., Nielsen, G., Taksir, T., Jain, R. K., Seed, B. (1998): Tumor induction of VEGF promoter activity in stromal cells. *Cell* 94: 715-725
- 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
- Gao, F., Maiti, S., Alam, N., Zhang, Z., Deng, J. M., Behringer, R. R., Léclureuil, C., Guillou, F., Huff, V. (2006): The Wilms tumor gene, *Wt1*, is required for *Sox9* expression and maintenance of tubular architecture in the developing testis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 11987-11992
- Gardner, D. P., Byrne, G. W., Ruddle, F. H., Kappen, C. (1996): Spatial and temporal regulation of a lacZ reporter transgene in a binary transgenic mouse system. *Transgenic Research* 5(1): 37-48
- Gessler, M., Poustka, A., Cavenee, W., Neve, R. L., Orkin, S. H., Bruns, G. A. P. (1990): Homozygous deletion in Wilms tumors of a zinc-finger gene identified by chromosome jumping. *Nature* 343: 774-778
- Gessler, M., König, A., Bruns, G. A. (1992): The genomic organization and expression of the WT1 gene. *Genomics* 12 (4): 807-813
- Gilbert, S. F. (2003): *Developmental Biology*. (7. Ausgabe), Sinauer Associates, Inc.
- Gittenberger-de Groot, A. C. de Ruyter, M. C., Bergwerff, M., Poelmann, R. E. (1999): Smooth muscle cell origin and its relation to heterogeneity in development and disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 19: 1589-1594
- Giovannini, M., Robanus-Maandag, E., van der Valk, M., Niwa-Kawakita, M., Abramowski, V., Goutebroze, L., Woodruff, J. M., Berns, A., Thomas, G. (2000): Conditional biallelic Nf2 mutation in the mouse promotes manifestations of human neurofibromatosis type 2. *Genes & Development* 14: 1617-1630

- Gommersall, L. M., Arya, M., Mushtaq, I., Duffy, P. (2005): Current challenges in Wilms' tumor management. *Nature Clinical Practice Oncology* 2(6): 298-304
- Gordon, J. W., Scangos, G. A., Plotkin, D. J., Barbosa, J. A., Ruddle, F. H. (1980): Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 7380-7384
- Gossen, M., Bujard, H. (1992): Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 5547-5551
- Gossen, M., Freundlieb, S., Bender, G., Müller, G., Hillen, W., Bujard, H. (1995): Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science* 268: 1766-1769
- Gothot, A., van der Loo, J. C., Clapp, D. W., Srour, E. F. (1998): Cell cycle-related changes in repopulating capacity of human mobilized peripheral blood CD34+ cells in non-obese diabetic/severe combined immune-deficient mice. *Blood* 92: 2641-2649
- Graf, N., Reinhard, H. (2003): Nephroblastome. *Onkologie* 3: 39-49
- Gregorieff, A., Clevers, H. (2005): Wnt signalling in the intestinal epithelium: from endoderm to cancer. *Genes and Development* 19: 877-890
- Gross, I., Morrison, D. J., Hyink, D. P., Georgas, K., English, M. A., Mericskay, M., Hosono, S., Sassoon, D., Wilson, P. D., Little, M., Licht, J. D. (2003): The receptor tyrosine kinase regulator Sprouty1 is a target of the tumor suppressor WT1 and important for kidney development. *Journal of Biological Chemistry*. 78: 41420-41430
- 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 Research* 54: 2331-2333
- Guo, J. K., Menke A. L., Gubler, M.-C., Clarke, A. R., Harrison, D., Hammes, A., Hastie, N. D., Schedl, A. (2002): WT1 is a key regulator of podocyte function: reduced expression levels cause crescentic glomerulonephritis and mesangial sclerosis. *Human Molecular Genetics* 11 (6): 651-659
- 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
- Hacker, A., Capel, B., Goodfellow, B., Lovell-Badge, R. (1995): Expression of Sry, the mouse sex determining gene. *Development* 121: 1603-1614
- Hahn, W. C., Weinberg, R. A. (2002): Modelling the molecular circuitry of cancer. *Nature Reviews Cancer* 2: 331-339
- Hammes, A., Guo, J. K., Lutsch, G., Leheste, J. R., Landrock, D., Ziegler, U., Gubler, M. C., Schedl, A. (2001): Two splice variants of the Wims' Tumor 1 gene have distinct functions during sex determination and nephron formation. *Cell* 106: 319-329
- Han, Y., San-Marina, S., Liu, J., Minden, M. D. (2004): Transcriptional activation of c-myc proto-oncogene by WT1 protein. *Oncogene* 23: 6933-6941
- Hanahan, D. (1985): Techniques for transformation in Escherichia coli. *DNA cloning I*: 109-135
- Hanahan, D. (1985): Heritable formation of pancreatic β -cell tumours in transgenic mice expressing recombinant insulin/simian virus 40 oncogenes. *Nature* 315: 115-122

- Hanahan, D., Weinberg, R. A. (2000): The hallmarks of cancer. *Cell* 100: 57-70
- 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 β -catenin gene. *The EMBO Journal* 18 (21): 5931-5942
- Harms, D., Zeidler, H. (1981): Histologie der Nephroblastome. *Klinische Pädiatrie* 193: 206-212
- Harms, D., Schmidt, D. (1997): Tumoren des Kindesalters. In: Pathologie. Remmler, W. (Hrsg.), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York: 501-550
- Harvey, R. P. (2002): Molecular determinants of cardiac development and congenital disease. In: Mouse development, Rosant, J., Tam, P. P. L. (Hrsg.), Academic Press: 331-370
- Hasan, M. T., Schönig, K., Berger, S., Graewe, W., Bujard, H. (2001): Long-term, noninvasive imaging of regulated gene expression in living mice. *Genesis* 29: 116-122
- Hastie, N. D. (1994): The genetics of Wilms' tumor – a case of disrupted development. *Annual Reviews in Genetics* 28: 523-558
- Hasty, P., Rivera-Pérez, J., Bradley, A. (1991): The length of homology required for gene targeting in embryonic stem cells. *Molecular and Cellular Biology* 11 (11): 5586-5591
- Hatada, I., Ohashi, H., Fukushima, Y., Kaneko, Y., Inoue, M., Komoto, Y., Okada, A., Ohishi, S., Nabetani, A., Morisaki, H., Nakayama, M., Niikawa, N., Mukai, T. (1996): An imprinted gene $p57^{KIP2}$ is mutated in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Nature Genetics* 14: 171-173
- He, T. C., Sparks, A. B., Rago, C., Hermeking, H., Zawel, L., da Costa, L. T., Morin, P. J., Vogelstein, B., Kinzler, K. W. (1998): Identification c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* 281: 1509-1512
- Hees, H., Sinowatz, F. (1992): Histologie – Kurzlehrbuch der Zytologie und mikroskopischen Anatomie. Deutscher Ärzte-Verlag, Köln
- 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 hybridisation. *Cytogenetics and Cell Genetics* 70(1-2): 68-70
- Henneveld, H. T., van Lingen, R. A., Hamel, B. C. J., Stolte-Dijkstra, I., van Essen, A. J. (2002): Perlman syndrome: Four additional cases and review. *American Journal of Medical Genetics* 86 (5): 403-506
- Herring, B. P., Lyons, G. E., Hoggatt, A. M., Gallagher, P.J. (2001): Telokin expression is restricted to smooth muscle tissues during mouse development. *American Journal of Physiology – Cell Physiology* 280: C12–C21
- Hersh, J. H., Cole, T. R., Bloom, A. S., Bertolone, S. J., Hughes, H. E. (1992): Risk of malignancy in Sotos syndrome. *The Journal of Pediatrics* 120: 572-574
- 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., Saunders, G. F. (1996): Differentially spliced Exon 5 of the Wilms' tumor gene *WT1* modifies gene function. *Anticancer Research* 16: 621-626
- Hirschi, K. K., Majesky, M. W. (2004): Smooth muscle stem cells. *The Anatomical Record Part A* 276A: 22-33
- Hoban, P. R., Cowen, R. L., Mitchell, E. L., Evans, D. G., Kelly, M., Howard, P. J., Heighway, J. (1997): Physical localisation of the breakpoints of a constitutional translocation $t(5;6)(q21;q21)$ in a child with bilateral Wilms' tumour. *Journal of Medical Genetics* 34: 343-345

- Huang, A., Campbell, C. E., Bonetta, L., McAndrews-Hill, M. S., Chilton-MacNeill, S., Coppes, M. J., Law, D. J., Feinberg, A. P., Yeger, H., Williams, B. R. G. (1990): Tissue, developmental, and tumor-specific expression of divergent transcripts in Wilms tumor. *Science* 250: 991-994
- Hungerford, J. E., Little, C. D. (1999): Developmental biology of the vascular smooth muscle cell: building a multilayered vessel wall. *Journal of Vascular Research* 36: 2-27
- Hussong, J., Crussi, F. G., Chou, P. M. (1997): Gonadoblastoma: Immunohistochemical localization of Mullerian-inhibiting substance, inhibin, WT-1, and p53. *Modern Pathology* 10 (11): 1101-1105
- Ito, M., Yu, R. Jameson, J. L. (1997): DAX-1 inhibits SF-1-mediated transactivation via a carboxy-terminal domain that is deleted in adrenal hypoplasia congenita. *Molecular and Cellular Biology* 17 (3): 1476-1483
- Jacks, T., Fazeli, A., Schmitt, E. M., Bronson, R. T., Goodell, M. A., Weinberg, R. A. (1992): Effects of an Rb mutation in the mouse. *Nature* 359: 295-300
- Jacob, H. J., Jacob, M. (1990): Entwicklung der Harnorgane. In: Human-Embryologie. Hinrichsen, K.V. (Hrsg.), Springer Verlag: 734-744
- Jeske, Y. W., Bowles, J., Greenfield, A., Koopman, P. (1995): Expression of a linear Sry transcript in the mouse genital ridge. *Nature genetics* 10: 480-482
- Johnstone, R. w., See, R. H., Sells, S. F., Wang, J., Muthukkumar, S., Englert, C., Haber, D. A., Licht, J. D., Sugrue, S. P., Roberts, T., Rangnekar, V. M., Shi, Y. (1996): A novel repressor, par-4, modulates transcription and growth suppression functions of the Wilms' tumor suppressor WT1. *Molecular and Cellular Biology* 16 (12): 6945-6956
- Jorgez, C. J., Klysiak, M., Jamin, S. P., Behringer, R. R., Matzuk, A. M. (2004): Granulosa cell-specific inactivation of Follistatin causes female fertility defects. *Molecular Endocrinology* 18 (4): 953-967
- Karakas, T., Miething, C. C., Maurer, U., Weidmann, E., Ackermann, H., Hoelzer, D., Bergmann, L. (2002): The coexpression of the apoptosis-related genes bcl-2 and wt1 in predicting survival in adult acute myeloid leukemia. *Leukemia* 16 (5): 846-854
- Kent, J., Coriat, A. M.; Sharpe, P. T., Hastie, N. D., van Heyningen, V. (1995): The evolution of WT1 sequence and expression pattern in the vertebrates. *Oncogene* 11 (9): 1781-1792
- Kent, J., Wheatley, S. C., Andrews, J. E., Sinclair, A. H., Koopman, P. (1996): A male-specific role for SOX9 in vertebrate sex determination. *Development* 122: 2813-2822
- Kiernan, A. E., Erven, A., Voegeling, S., Peters, J., Nolan, P., Hunter, J., Bacon, Y., Steel, K. P., Brown, S. D. M., Guénet, J.-L. (2002): ENU mutagenesis reveals a highly mutable locus on mouse Chromosome 4 that affects ear morphogenesis. *Mammalian Genome* 13(3): 142-148
- Kishimoto, H., Hamada, H., Saunders, M., Backman, S., Sasaki, T., Nakano, T., Mak, T. W., Suzuki, A. (2003): Physiological functions of Pten in mouse tissues. *Cell Structure and Function* 28: 11-21
- Kikuchi, A., Kishida, S., Yamamoto, H. (2006): Regulation of Wnt signalling by protein-protein interaction and post-translational modifications. *Experimental and Molecular Medicine* 38 (1): 1-10
- Kim, J., Prawitt, D., Bardeesy, N., Torban, E., Vicaner, C., Goodyer, P., Zabel, B., Pelletier, J. (1999): The Wilms' tumor suppressor gene (wt1) product regulates Dax-1 gene expression during gonadal differentiation. *Molecular and Cellular Biology* 19 (3): 2289-2299
- 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

- Klamt, B., Koziell, A., Poulat, F., Wieacker, P., Scambler, P., Berta, P., Gessler, M. (1998): Frasier syndrome is caused by defective alternative splicing of WT1 leading to an altered ratio of WT1 +/- KTS splice isoforms. *Human Molecular Genetics* 7 (4): 709-714
- Knight, J., Abbott, A. (2002): Full house. *Nature* 417: 785-786
- Knudson, A. G. (1971): Mutation and cancer: Statistical study of Retinoblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68: 820-823
- Knudson, A. G., Strong, L. C. (1972): Mutation and cancer: A model for Wilms' Tumor of the kidney. *Journal of the National Cancer Institute* 48 (2): 313-324
- 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 Research* 59: 3880-3882
- Koller, B. H., Smithies, O. (1989): Inactivating the β 2-microglobulin locus in mouse embryonic stem cells by homologous recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 8932-8935
- Kopper, L., Hajdú, M. (2004): Tumor stem cells. *Pathology Oncology Research* 10 (2): 69-73
- Koufos, A., Grundy, P., Morgan, K., Aleck, K. A., Hadro, T., Lampkin, B. C., Kalbakji, A., Cavenee, W. K. (1989): Familial Wiedemann-Beckwith syndrome and a second Wilms tumor locus both map to 11p15.5. *American Journal of Human Genetics* 44: 711-719
- Kozak, M. (1991): Structural features in eukaryotic mRNAs that modulate the initiation of translation. *The Journal of Biological Chemistry* 266 (30): 19867-19870
- 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* 23 (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
- Kreidberg, J. A., Natoli, T. A., McGinnis, L., Donovan, M., Biggers, J. D., Amstutz, A. (1999): Coordinate action of Wt1 and a modifier gene supports embryonic survival in the oviduct. *Molecular Reproduction and Development* 52: 366-375
- Krestel, H. E., Mayford, M. R., Seeburg, P. H., Sprengel, R. (2001): A GFP-equipped bidirectional expression module well suited for monitoring tetracycline-regulated gene expression in mouse. *Nucleic Acids Research* 29(7): 39-44
- Kuehn, M. R., Bradley, A., Robertson, E. J., Evans, M. J. (1987): A potential animal model for Lesch-Nyhan syndrome through introduction of HPRT mutations into mice. *Nature* 326: 295-298
- Kuhn, R., Schwenk, F., Aguet, M., Rajewsky, K. (1995): Inducible gene targeting in mice. *Science* 269: 1427-1429
- Kuraguchi, M., Cook, H., Williams, E. D., Thomas, G. A. (2001): Differences in susceptibility to colonic stem cell somatic mutation in three strains of mice. *The Journal of Pathology* 193: 517-521
- Kusafuka, T., Miao, J., Kuroda, S., Udatsu, Y., Yoneda, A. (2002): Codon 45 of the β -catenin gene, a specific mutational target site of Wilms' tumor. *International Journal of Molecular Medicine* 10 (4): 395-399
- Ladomery, M. R., Slight, J., Mc Ghee, S., Hastie, N. D. (1999): Presence of WT1, the Wilm's tumor suppressor gene product, in nuclear Poly(A)⁺ ribonucleoprotein. *Journal of Biological Chemistry* 274: 36520 - 36526

- Laity JH, Dyson HJ, Wright PE. (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., Westphal, H. (1992): Targeted oncogene activation by site-specific recombination in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 6232-6236
- Lalli, E., Bardoni, B., Zazopoulos, E., Wurtz, J.-M., Strom, T.M., Moras, D., Sassone-Corsi, P. (1997): A transcriptional silencing domain in DAX-1 whose mutation causes adrenal hypoplasia congenita. *Molecular Endocrinology* 11 (13): 1950-1960
- Larsson SH, Charlier JP, Miyagawa K, Engelkamp D, Rassoulzadegan M, Ross A, Cuzin F, van Heyningen V, Hastie ND. (1995): Subnuclear localization of WT1 in splicing or transcription factor domains is regulated by alternative splicing. *Cell* 81: 391-401
- Lee, G., Connell, C. R., Woo, S. L., Cheng, R. D., McArdle, B. F., Fuller, C. W., Halloran, N. D., Wilson, R. K. (1992): DNA sequencing with dye-labeled terminators and T7 DNA polymerase: effect of dyes and dNTPs on incorporation of dye-terminators and probability analysis of termination fragments. *Nucleic Acids Research* 20: 2471-2483
- 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
- Lee, S. B., Haber, D. A. (2001): Wilms Tumor and the WT1 gene. *Experimental Cell Research* 264: 74-99
- Lenz, G. (2005): The RNAi interference revolution. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 38: 1749-1757
- Leslie, N. R., Downes, C. P. (2004): PTEN function: how normal cells control it and tumor cells lose it. *The Biochemical Journal* 382: 1-11
- Li, C. M., Guo, M., Borczuk, A., Powell, C. A., Wei, M., Thaker, H. M., Friedman, R., Klein, U., Tycko, B. (2002): Gene expression in Wilms' tumor mimics the earliest committed stage in the metanephric mesenchymal-epithelial transition. *American Journal of Pathology* 160:2181-2190
- Li, C. M., Kim, C. E., Margolin, A. A., Guo, M., Zhu, J., Mason, J. M., Hensle, T. W., Murty, 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 genes in WT1-mutant Wilms' tumors. *American Journal of Pathology* 165: 1943-1953
- Li, W., Kessler, P., Williams, B. R. (2005): Transcript profiling of Wilms tumors reveals connections to kidney morphogenesis and expression patterns associated with anaplasia. *Oncogene* 24: 457-468
- 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.
- Liu, J. J., Wang, Z.-Y., Deuel, T. F., Xu, Y.-H. (1999): Imbalanced expression of functionally different WT1 isoforms may contribute to sporadic unilateral Wilms' tumor. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 254 (1): 197-199
- Loeb, D. M., Evron, E., Patel, C. B., Sharma, P. M., Niranjana, B., Buluwela, L., Weitzman, S. A., Korz, D., Sukumar, S. (2001): Wilms' tumor suppressor gene (*WT1*) is expressed in primary breast tumors despite tumor-specific promoter methylation. *Cancer Research* 61: 921-925
- Löbber, R. W., Klemm, G., Grüttner, H. P., Harms, D., Winterpacht, A., Zabel, B. U. (1998): Novel WT1 mutation, 11p LOH, and t(7;12)(p22;q22) chromosomal translocation identified in a Wilms' tumor case. *Genes, Chromosomes and Cancer* 21: 347-350

- Ludwig, D. L., Stringer, J. R., Wright, D. C., Doetschman, H. C., Duffy, J. J. (1996): FLP-mediated site-specific recombination in microinjected murine zygotes. *Transgenic Research* 5 (6): 385-395
- Macgregor, H. C., Mizuno, S. (1976): In situ hybridization of 'nick-translated' 3H-ribosomal DNA to chromosomes from salamanders. *Chromosoma* 54, 15-25
- Mack, C. P.; Owens, G. K. (1999): Regulation of SM alpha-actin expression in vivo is dependent upon CArG elements within the 5' and first intron promoter regions. *Circulation Research* 84: 852-861
- Männer, J., Pérez-Pomares, J. M., Macías, D., Muñoz-Chápuli, D. R. (2001): The origin, formation and developmental significance of the epicardium: a review. *Cells Tissues Organs* 169 (2): 89-103
- Maiti, S., Alam, R., Amos, C. I., Huff, V. (2000): Frequent association of β -Catenin and WT1 mutations in Wilms' tumors. *Cancer Research* 60: 6288-6292
- Makalowski, W., Boguski, M. S. (1998): Evolutionary parameters of the transcribed mammalian genome: an analysis of 2,820 orthologous rodent and human sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 95: 9407-9412
- Mannens, M., Devilee, P., Blik, J., Mandjes, I., de Kraker, J., Heyting, C., Slater, R. M., Westerveld, A. (1990): Loss of heterozygosity in Wilms' tumors, studied for six putative tumor suppressor regions, is limited to chromosome 11. *Cancer Research* 50: 3279-3283
- Mansour, S. L., Thomas, K. R., Capecchi, M. R. (1988): Disruption of the proto-oncogene int-2 in mouse embryo-derived stem cells: a general strategy for targeting mutations to non-selectable genes. *Nature* 336: 348-352
- Marchuck, D., Drumm, M., Saulino, A., Collins, F. S. (1990): Construction of T-vectors, a rapid and general system for direct cloning of unmodified PCR products. *Nucleic Acids Research* 19: 1154-1155
- Markus, M. A., Heinrich, B., Raitskin, O., Adams, D. J., Mangs, H., Goy, C., Ladomery, 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, Epub ahead of print*
- Mason, P. J., Enver, T., Wilkinson, D., Williams, D. J. (1993): Assay of gene transcription in vivo. In: *Gene Transcription : A practical approach*. Oxford University Press
- 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. *The EMBO Journal* 18 (14): 3990-4003
- McCaffrey, A. P., Meuse, L., Pham, T. T. T., Conklin, D. S., Hannon, G. J., Kay, M. A. (2002): RNA interference in adult mice. *Nature* 418:38-39
- McCrea, P. D., Turck, C. W., Gumbiner, B. (1991): A homolog of the armadillo protein in *Drosophila* (plakoglobin) associated with E-cadherin. *Science* 254: 1359-1361
- McDonald, J. M., Douglass, E. C., Fisher, R., Geiser, C. F., Krill, C. E., Strong, L. C., Virshup, D., Huff, V. (1998): Linkage of familial Wilms' tumor predisposition to chromosome 19 and a two-locus model for the etiology of familial tumors. *Cancer Research* 58: 1387-1390
- 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

- Menke, A. L., Ijpenberg, A., Fleming, S., Ross, A., Medine, C. N., Patek, C. E., Spraggon, L., Hughes, J., Clarke, A. R., Hastie, N. D. (2003): The Wt1-heterozygous mouse; a model to study the development of glomerular sclerosis. *Journal of Pathology* 200: 667-674
- Mensen, H., Renkl, H., Entezami, M., Thiel, E. (1997): Wilms' tumor gene expression in human CD34+ hematopoietic progenitors during fetal development and early clonogenic growth. *Blood* 89: 3486-3487
- Miano, J. M., Berk, B. C. (2000): Retinoids: Versatile biological response modifiers of vascular smooth muscle phenotype. *Circulation Research* 87: 355-362
- Mikawa, T., Gourdie, R. G. (1996): Pericardial mesoderm generates a population of coronary smooth muscle cells migrating into the heart along with ingrowth of the epicardial organ. *Developmental Biology* 174 (2): 221-232
- Miller, R. W., Young, J. L., Novakovic, B. (1994): Childhood cancer. *Cancer* 75 (Suppl. 1): 395-405
- Miozzo, M., Perotti, D., Minoletti, F., Mondini, P., Pilotti, S., Luksch, R., Fossati-Bellani, F., Pierotti, M. A., Sozzi, G., Radice, P. (1996): Mapping of a putative tumor suppressor locus to proximal 7p in Wilms' tumors. *Genomics* 37: 310-315.
- Miwa, H., Beran, M., Saunders, G. (1992): Expression of the Wilms tumor gene (WT1) in human leukemias. *Leukemia* 6: 405-409
- 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
- Miyagi, T., Ahuja, H., Kubota, T., Kubonishi, I., Koeffler, H., Miyoshi, I. (1993): Expression of the candidate Wilm's tumor gene, WT1, in human leukemia cells. *Leukemia* 7 (7): 970-977
- Miyoshi, Y., Ando, A., Egawa, C., Taguchi, T., Tamaki, Y., Tamaki, H., Sugiyama, H., Noguchi, S. (2002): High expression of Wilms' tumor suppressor gene predicts poor prognosis in breast cancer patients. *Clinical Cancer Research* 8: 1167-1171
- Moffett, P., Bruening, W., Nakagama, H., Bardessy, N., Housman, D., 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 Wilms' tumor 1 gene activity in the proliferating coelomic epithelium, developing diaphragm and limb. *Mechanisms of Development* 79: 169-184
- Moore, A. W., McInnes, L., Kreidberg, J., Hastie, N. D., Schedl, A. (1999): YAC complementation shows a requirement for Wt1 in the development of epicardium, adrenal gland and throughout nephrogenesis. *Development* 126: 1845-1857
- Moorthy, A. V., Chesney, R. W., Lubinsky, M., Opitz, J. M., Bernstein, J. (1987): Chronic renal failure and XY gonadal dysgenesis: 'Frasier' syndrome - a commentary on reported cases. *American Journal of Medical Genetics (Suppl. 3)*: 297-302
- Morais da Silva, S., Hacker, A., Harley, V., Goodfellow, P., Swain, A., Lovell-Badge, R. (1996): Sox9 expression during gonadal development implies a conserved role for the gene in testis differentiation in mammals and birds. *Nature genetics* 14: 62-68
- Morin, P. J., Sparks, A. B., Korinek, V., Barker, N., Clevers, H., Vogelstein, B., Kinzler, K. W. (1997): Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science* 275: 1787-1790
- Morse, H. C. (1978): *Origins of Inbred Mice*. (Academic, New York)

- Morrish, B. C., Sinclair, A. H. (2002): Vertebrate sex determination: many means to an end. *Reproduction* 124: 447-457
- Morrison, D. J., English, M. A., Licht, J. D. (2005): WT1 induces apoptosis through transcriptional regulation of the proapoptotic Bcl-2 family member Bak. *Cancer Research* 65 (18): 8174-8182
- Mundlos, S., Pelletier, J., Darveau, A., Bachmann, M., Winterpacht, A., Zabel, B. (1993): Nuclear localization of the protein encoded by the Wilms' tumor gene WT1 in embryonic and adult tissues. *Development* 119: 1329-1341
- Munoz-Chapuli, R., Macias, D., Gonzalez-Iriarte, M., Carmona, R., Atencia, G., Perez-Pomares, M. (2002): The epicardium and epicardial-derived cells: Multiple functions in cardiac development. *Revista Espanola de Cardiologia* 55 (10): 1070-1082
- Mutskov, V., Felsenfeld, G. (2004): Silencing of transgene transcription precedes methylation of promoter DNA and histone H3 lysine 9. *The EMBO Journal* 23: 138-149
- Nadeau, J. H. (2002): Tackling complexity. *Nature* 420: 517-5518
- Nagy, A., Rossant, J., Nagy, R., Abramow-Newerly, W., Roder, J. C. (1993): Derivation of completely cell culture-derived mice from early passage embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 8424-8428
- National Wilms' Tumor Study Committee (1990): Wilms' tumor: Status report. *Journal of Clinical Oncology* 9 (5): 877-887
- Natoli, T. A., McDonald, A., Alberta, J. A., Taglienti, M. E., Housman, D. E., Kreidberg, J. A. (2002 a): A mammal-specific exon of WT1 is not required for development or fertility. *Molecular and Cellular Biology* 22(12): 4433-4438
- Natoli, T. A., Liu, J., Eremina, V., Hodgens, K., Li, C., Hamano, Y., Mundel, P., Kaluri, R., Miner, J. H., Quaggin, S. E., Kreidberg, J. A. (2002 b): A mutant form of the Wilms' tumor suppressor gene WT1 observed in Denys-Drash syndrome interferes with glomerular capillary development. *Journal of the American Society of Nephrology* 13: 2058-2067
- Nature (2002) 420: 456-460 Mouse Genome Issue
- Niaudet P., Gubler, M.-C. (2006): WT1 and glomerular diseases. *Pediatric Nephrology*, *Epub ahead of print*
- Nishida, S., Hosen, N., Shirakata, T., Kanato, K., Yanagihara, M., Nakatsuka, S., Hoshida, Y., Nakazawa, T., Harada, Y., Tatsumi, N., Tsuboi, A., Kawakami, M., Oka, Y., Oji, Y., Aozasa, K., Kawase, I., Sugiyama, H. (2006) : AML1-ETO rapidly induces acute myeloblastic leukemia in cooperation with the Wilms tumor gene, WT1. *Blood* 107 (8): 3303-3312
- No, D., Yao, T. P., Evans, R. M. (1996): Ecdysone-inducible gene expression in mammalian cells and transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 3346-3351
- Nollet, T., Berx, G., Molemans, F., van Roy, P. (1996): Genomic organization of the human beta-catenin gene (CTNNB1). *Genomics* 32(3): 413-424
- Nucifora, G., Rowley, J. D. (1994): The AML1 and ETO genes in acute myeloid leukaemia with a t(8;21). *Leukemia Lymphoma* 14: 353-362
- O'Connor, A. E., De Kretster, D. M. (2004): Inhibins in normal male physiology. *Seminars in Reproductive Medicine* 22 (3): 177-185
- Ohlsson, R., Nyström, A., Pfeifer-Ohlsson, S., Töhönen, V., Hedborg, F., Schofield, P., Flam, F., Ekström, T. J. (1993): IGF2 is parentally imprinted during human embryogenesis and in the Beckwith-Wiedemann syndrome. *Nature Genetics* 4: 94-97

- Omori, N., Omori, M., Evarts, R. P., Teramoto, T., Miller, M. J., Hoang, T. N., Thorgeirsson, S. S. (1997): Partial cloning of rat CD34 cDNA and expression during stem cell- dependent liver regeneration in the adult rat. *Hepatology* 26 (3): 720-727
- 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
- Owens, G. K., Kumar, M. S., Wamhoff, B. R. (2004): Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiological Reviews* 84: 767-801
- 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. *Current Biology* 11: 1805-1809
- Palmiter, R. D., Chen, H.Y., Brinster, R. L. (1982 a): Differential regulation of metallothionein-thymidine kinase fusion genes in transgenic mice and their offspring. *Cell* 29 (2): 701-710
- Palmiter, R. D., Brinster, R. L., Hammer, R. E., Trumbauer, M. E., Rosenfeld, M. G., Birnberg, N. C., Evans, R. M. (1982 b): Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. *Nature* 300 (16): 611-615
- Park, S., Bernard, A., Bove, K. E., Sens, D. A., Hazen-Martin, D. J., Garvin, A. J., Haber, D. A. (1993 a): Inactivation of WT1 in nephrogenic rests, genetic precursors to Wilms' tumor. *Nature Genetics* 5: 363-367
- Park, S., Schalling, M., Bernard, A., Maheswaran, S., Shipley, G. C., Roberts, D., Fletcher, J., Shipman, R., Rheinwald, J., Demetri, G., Griffin, J., Minden, M., Housman, D. E., Haber, D. A. (1993 b): The Wilms tumor gene WT1 is expressed in murine mesoderm-derived tissues and mutated in a human mesothelioma. *Nature genetics* 4: 415-420
- Park, S. Y., Jameson, J. L. (2005 a): Transcriptional regulation of gonadal development and differentiation. *Endocrinology* 146 (3): 1035-1042
- Park, S. Y., Meeks, J. J., Raverot, G., Pfaff, L. E., Weiss, J., Hammer, G. D., Jameson, J. L. (2005 b): Nuclear receptors Sf1 and Dax1 function cooperatively to mediate somatic cell differentiation during testis development. *Development* 132: 2415-2423
- Patek, C. E., Little, M. H., Fleming, S., Miles, C., Charlieu, J.-P., Clarke, A. R., Miyagawa, K., Christie, S., Doig, J., Harrison, D. J., Porteous, D. J., Brookes, A. J., Hooper, M. L., Hastie, N. D. (1999): A zinc finger truncation of murine WT1 results in the characteristic urogenital abnormalities of Denys-Drash syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 2931-2936
- Patek, C. E., Fleming, S., Miles, C. G., Bellamy, C. O., Lodomery, M., Spraggon, L., Mullins, J., Hastie, N. D., Hooper, M. L. (2003): Murine Denys–Drash syndrome: evidence of podocyte de-differentiation and systemic mediation of glomerulosclerosis. *Human Molecular Genetics* 12 (18): 2379-2394
- Pavenstädt, H. (2000): Roles of the podocyte in glomerular function. *The American Journal of Physiology – Renal Physiology* 278: F173-F179
- Pelletier, J., Bruening, W., Li, F. P., Haber, D. A., Glaser, T., Housman, D. E. (1991 a): 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. E. (1991 b): Expression of the Wilms' tumor gene WT1 in the murine urogenital system. *Genes and Development* 5: 1345-1356
- 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., Silverman, B. L., Haber, D. A., Housman, D. E. (1991 c): Germline mutations in the Wilms' tumor suppressor gene are associated with abnormal urogenital development in Denys-Drash syndrome. *Cell* 67: 437-447

- Pérez-Pomares, J.-M., Carmona, R., González-Iriarte, M., Atencia, G., Wessels, A., Muñoz-Chápuli, R. (2002): Origin of coronary endothelial cells from epicardial mesothelium in avian embryos. *The International Journal of Developmental Biology*. 46 (8): 1005-1013
- Petersen, W. E., Bowen, W. C., Patrene, K. D., Mars, W. M., Sullivan, A. K., Murase, N., Boggs, S. S., Greenberger, J. S., Goff, J. P. (1999): Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 284 (5417): 1168-1170.
- Pikaart, M. J., Recillas-Targa, F., Felsenfeld, G. (1998): Loss of transcriptional activity of a transgene is accompanied by DNA methylation and histone deacetylation and is prevented by insulators. *Genes & Development* 12: 2852-2862
- Pilia, G., Hughes-Benzie, R. M., MacKenzie, A., Baybayan, P., Chen, E. Y., Huber, R., Neri, G., Cao, A., Forabosco, A., Schlessinger, D. (1996): Mutations in GPC3, a glypican gene, cause the Simpson-Golabi-Behmel overgrowth syndrome. *Nature Genetics* 12: 241-247
- Plesko, I., Kramarova, E., Stiller, C. A., Coebergh, J. W., Santaquilani, M., EURO CARE Working groupe (2001): Survival of children with Wilms' tumour in Europe. *European Journal of Cancer* 37 (6): 736-743
- Powlesland, R. M., Charles, A. K., Malik, K. T. A., Reynolds, P. A., Pires, S., Boavida, M., Brown, K. W. (2000): Loss of heterozygosity at 7p in Wilms' tumour development. *British Journal of Cancer* 82 (2): 323-329
- Prager, E. M., Orrego, C., Sage, R. D. (1998): Genetic variation and phylogeography of central Asian and other house mice, including a major new mitochondrial lineage in Yemen. *Genetics* 150: 835-861
- Pritchard-Jones, K., Fleming, S., Davidson, D., Bickmore, W., Porteous, D., Gosden, C., Bard, J., Buckler, A., Pelletier, J., Housman, D., Van Heyningen, V., Hastie, N. (1990): The candidate Wilms' tumour gene is involved in genitourinary development. *Nature* 346: 194-197
- Quaggin, S. E. (2002): Transcriptional regulation of podocyte specification and differentiation. *Microscopy Research and Technique* 57 (4): 208-211
- Rackley, R. R., Flenniken, A. M., Kuriyan, N. P., Kessler, P. M., Stoler, M. H., Williams, B. R. G. (1993): Expression of the Wilms' Tumor suppressor gene WT1 during mouse embryogenesis. *Cell Growth and Differentiation* 4: 1023-1031
- Rahman, N., Arbour, L., Tonin, P., Renshaw, J., Pelletier, J., Baruchel, S., Pritchard-Jones, K., Stratton, M. R., Narod, S. A. (1996): Evidence for a familial Wilms' tumor gene (FWT1) on chromosome 17q12-21. *Nature Genetics* 13: 461-463
- Ramirez-Solis, R., Liu, P., Bradley, A. (1995): Chromosome engineering in mice. *Nature* 378:720-724
- Rao, M. K., Pham, J., Imam, J. S., MacLean, J. A., Murali, D., Furuta, Y., Sinha-Hikim, A. P., Wilkinson, M. F. (2006): Tissue-specific RNAi reveals that WT1 expression in nurse cells controls germ cell survival and spermatogenesis. *Genes & Development* 20: 147-152
- 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
- Reddy, J. C., Morris, J. C., Wang, J., English, M. A., Haber, D. A., Shi, Y., Licht, J. D. (1995): WT1-mediated transcriptional activation is inhibited by dominant negative mutant proteins. *Journal of Biological Chemistry* 270(18): 10878-10884
- Reeve, A. E., Sik, S. A., Raizis, A. M., Feinberg, A. P. (1989): Loss of allelic heterozygosity at a second locus on chromosome 11 in sporadic Wilms' tumour cells. *Molecular and Cellular Biology* 9 (4): 1799-1803

- Reid, S., Renwick, A., Seal, S., Baskcomb, L., Barfoot, R., Jayatilake, H., Pritchard-Jones, K., Stratton, M. R., Ridolfi-Lüthy, A., Rahman, N. (2005): Biallelic BRCA2 mutations are associated with multiple malignancies in childhood including familial Wilms tumour. *Journal of Medical Genetics* 42 (2): 147-151
- Rey, R. (2006): Anti-Mullerian hormone in disorders of sex determination and differentiation. *Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia* 49 (1): 26-36
- Reya, T., Clevers, H. (2005): Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* 434: 843-850
- 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
- Rivera, M. N., Haber, D. A. (2005): Wilms' tumour: Connecting tumorigenesis and organ development in the kidney. *Nature Reviews Cancer* 5: 699-712
- Rockman, S. P., Currie, S. A., Ciavarella, M., Vincan, E., Dow, C., Thomas, R. J., Phillips, W. A. (2001): Id2 is a target of the β -catenin/T-cell factor pathway in colon carcinoma. *Journal of Biological Chemistry* 276: 45113-45119
- 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
- Rubinfeld, B., Robbins, P., El-Gami, M., Albert, I., Porfiri, E., Polakis, P. (1997): Stabilization of β -catenin by genetic defects in melanoma cell lines. *Science* 275: 1790-1792
- Rubera, I., Poujeol, C., Bertin, G., Hasseine, L., Counillon, L., Poujeol, P., Tauc, M. (2001): Specific Cre/Lox Recombination in the mouse proximal tubule. *Journal of the American Society of Nephrology* 15: 2050-2056
- Ruteshouser, E. C., Huff, V. (2004): Familial Wilms tumor. *American Journal of Medical Genetics* 129C: 29-34
- Saam, J. R., Gordon, J. I. (1999): Inducible gene knockouts in the small intestinal and colonic epithelium. *The Journal of Biological Chemistry* 274 (53): 38071-38082
- 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 a 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.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 5463-5467.
- Sato, T. N., Loughna, S. (2002): Vasculogenesis and Angiogenesis. In: *Mouse development*, Rosant, J., Tam, P. P. L. (Hrsg.), Academic Press: 211-233
- Satoh, Y., Nakadate, T., Higashimoto, 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
- Scharnhorst, V., Dekker, P., van der Eb, A. J., Jochemsen, A. G. (1999): Internal translation initiation generates novel WT1 protein isoforms with distinct biological properties. *Journal of Biological Chemistry* 274 (33): 23456-23462
- Scharnhorst, 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 & Development* 10: 543-549
- Schenkel, J. (1995): *Transgene Tiere*. (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg)
- Scholz, H., Kirschner, K. M. (2005): A role for the Wilms' tumor protein WT1 in organ development. *Physiology* 20: 54-59
- Scott, R. H., Stiller, C. A., Walker, L., Rahman, N. (2006): Syndromes and constitutional chromosomal abnormalities associated with Wilms tumour. *Journal of Medical Genetics* May 11: Epub ahead of print
- Shtutman, M., Zhurinsky, J., Simcha, I., Albanese, C., D'Amico, M., Pestell, R., Ben Ze'ev, A. (1999): The cyclin D1 gene is a target of the β -catenin/Lef-1 pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 5522-5527
- Sharma, P. M., Bowman, M., Madden, S. L., Rauscher, F. J. III, Sukumar, S. (1994): RNA editing in the Wilms' tumor susceptibility gene, WT1. *Genes & Development* 8: 720-731
- Shibata, H., Toyama, K., Shioya, H., Ito, M., Hirota, M., Hasegawa, S., Matsumoto, H., Takano, H., Akiyama, T., Toyoshima, K., Kanamaru, R., Kanegae, Y., Saito, I., Nakamura, Y., Shiba, K., Noda, T. (1997): Rapid Colorectal Adenoma Formation Initiated by Conditional Targeting of the Apc Gene. *Science* 278: 120-123
- Shimamura, R., Fraizer, G. C., Trapman, J., Lau, Y. F. C., Saunders, G. F. (1997): The Wilms' tumor gene WT1 can regulate genes involved in sex determination and differentiation: SRY, Mullerian-inhibiting substance, and the androgen receptor. *Clinical Cancer Research* 3: 2571-2580
- Shin, M. K., Levorse, J. M., Ingram, R. S., Tilghman, S. M. (1999): The temporal requirement for endothelin receptor-B signalling during neural crest development. *Nature* 402: 496-501
- Silberstein, G. B., Van Horn, K., Strickland, P., Roberts, C. T. Jr., Daniel, C. W. (1997): Altered expression of the WT1 wilms tumor suppressor gene in human breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 8132-8137
- Silver, L. M. (1995): *Mouse Genetics*. (Oxford University Press, Oxford)
- Simpson, E. M., Linder, C. C., Sargent, E. E., Davisson, M. T., Mobraaten, L. E., Sharp, J. J. (1997): Genetic variation among 129 substrains and its importance for targeted mutagenesis in mice. *Nature Genetics* 16: 19-27
- Smith, A. J. H., De Sousa, M. A., Kwabi-Addo, B., Heppell-Parton, A., Impey, H., Rabbitts, P. (1995): A site-directed chromosomal translocation induced in embryonic stem cells by Cre-loxP recombination. *Nature Genetics* 9: 376-385
- Sobotta, J. (2005): *Atlas Histologie*. (Hrsg.: Welsch, U.), 7. Auflage. Elsevier, Urban & Fischer Verlag, München
- Soriano, P. (1999): Generalized *lacZ* expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nature genetics* 21: 70-71
- Southern, E. M. (1975): Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology* 98: 503-517.
- Spangenberg, C. (2000): *Wilmstumor- und Metanephrogenese: Differenzielle Genexpressionsanalysen und weitere Charakterisierung identifizierter Kandidatengene*. Dissertation im Fachbereich Biologie der Johannes Gutenberg Universität Mainz.
- Speck, N., Peeters, M., Dzierzak, E. (2002): Development of the vertebrate hematopoietic system. In: *Mouse development*, Rosant, J., Tam, P. P. L. (Hrsg.), Academic Press: 191-210

- Srivastava, A. K., Mohan, S., Wergedal, J. E., Baylink, D. J. (2003): A genomewide screening of N-ethyl-N-nitrosourea-mutagenized mice for musculoskeletal phenotypes. *Bone* 33: 179-191
- Stewart, T. A., Pattengale, P. K., Leder, P. (1984): Spontaneous mammary adenocarcinomas in transgenic mice that carry and express MTV/myc fusion genes. *Cell* 38: 627-637
- Stiller, A. C. (2004) Epidemiology and genetics of childhood cancer. *Oncogene* 23 (38): 6429-6444
- Strain, A. J., Crosby, H. A. (2000): Hepatic stem cells. *Gut* 46: 743-745
- Sucov, H. M., Dyson, E., Gumeringer, C. L., Price, J., Chien, K. R., Evans, R. M. (1994): RXR alpha mutant mice establish a genetic basis for vitamin A signaling in heart morphogenesis. *Genes & Development* 8 (9): 1007-10018
- Suzuki, A., Yamaguchi, M. T., Ohteki, T., Sasaki, T., Kaisho, T., Kimura, Y., Yoshida, R., Wakeham, A., Higuchi, T., Fukumoto, M., Tsubata, T., Ohashi, P. S., Koyasu, S., Penninger, J. M., Nakano, T., Mak, T. W. (2001): T Cell-specific loss of Pten leads to defects in central and peripheral tolerance. *Immunity* 14: 523-534
- Swain, A., Lovell-Badge, R. (2002): Sex determination and differentiation. . In: *Mouse development*, Rosant, J., Tam, P. P. L. (Hrsg.), Academic Press: 371-393
- Szabó, P., Mann, J. R. (1994): Expression and methylation of imprinted genes during in vitro differentiation of mouse parthenogenetic and androgenetic embryonic stem cell lines. *Development* 120: 1651-1660
- Takeda, T., Hosokawa, M., Higuchi, K. (1991): Senescence-accelerated mouse (SAM): a novel murine model of accelerated senescence. *Journal of the American Geriatrics Society* 39 (9): 911-919
- Taketo, M., Schroeder, A. C., Mobraaten, L. E., Gunning, K. B., Hanten, G., Fox, R. R., Roderick, T. H., Stewart, C. L., Lilly, F., Hansen, C. T., Overbeek, P. A. (1991): FVB/N: An inbred mouse strain preferable for transgenic analyses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 2065-2069
- Tarantino, L. M., Bucan, M. (2000): Dissection of behavior and psychiatric disorders using the mouse as a model. *Human Molecular Genetics* 9 (6): 953-65
- Tenen, D. G., Hromas, R., Licht, J. D., Zhang, D.-E. (1997): Transcription factors, normal myeloid development, and leukemia. *Blood* 90 (2): 489-519
- Thomas, P. S. (1980): Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 (9): 5201-5205
- Thomas, K. R., Capecchi, M. R. (1987): Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* 51: 503-512
- Threadgill, D. W., Yee, D., Matin, A., Nadeau, J. H., Magnuson, T. (1997): Genealogy of the 129 inbred strain: 129/SvJ is a contaminated inbred strain. *Mammalian Genome* 8 (6): 390-393
- Tischkowitz, M. D., Hodgson, S. V. (2003): Fanconi anaemia. *Journal of Medical Genetics* 40 (1): 1-10
- Ton, C. C. T., Hirvonen, H., Miwa, H., Weil, M. M., Monaghan, P., Jordan, T., van Heyningen, V., Hastie, N. D., Meijers-Heijboer, H., Drechsler, M., Royer-Pokora, B., Collins, F., Swaroop, A., Strong, L. C., Saunders, G. F. (1991): Positional cloning and characterization of a paired box- and homeobox-containing gene from the aniridia region. *Cell* 67: 1059-1074
- Tremblay J. J., Robert, N. M. (2005): Role of nuclear receptors in INSL3 gene transcription in Leydig cells. *Annals of the NY Academy of Science* 1061: 183-189
- Tucker, P. K., Lee, B. K., Lundrigan, B. L., Eicher, E. M. (1992): Geographic origin of the Y chromosomes in 'old' inbred strains of mice. *Mammalian Genome* 3 (5): 254-261

- Tuna, M., Chavez-Reyes, A., Tari, A. M. (2005) : HER2/neu increases the expression of Wilms' tumor 1 (WT1) protein to stimulate S-phase proliferation and inhibit apoptosis in breast cancer cells. *Oncogene* 24: 1648-1652
- 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. Sci. USA* 97: 7963-7968
- Utomo, A. R. H., Nikitin, A. Y., Lee, W. H. (1999): Temporal, spatial, and cell type-specific control of Cre-mediated DNA recombination in transgenic mice. *Nature Biotechnology* 17: 1091-1096
- Vainio, S., Lin, Y. (2002): Coordinating early kidney development: Lessons from gene targeting. *Nature Reviews Genetics* 3: 533-543
- Valencik, M. L., McDonald, J. A. (2001): Codon optimisation markedly improves doxycycline regulated gene expression in the mouse heart. *Transgenic Research* 10: 269-275
- Varanasi, R., Bardeesy, N., Ghahremani, M., Petrucci, M. J., Nowak, N., Adam, M. A., Grundy, P., Shows, T. B., Pelletier, J. (1994): Fine structure analysis of the WT1 gene in sporadic Wilms tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 3554-3558
- Ventura, A., Meissner, A., Dillon, C. P., McManus, M., Sharp, P. A., van Parijs, L., Jaenisch, R., Jacks, T. (2004): Cre-lox-regulated conditional RNA interference from transgenes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 (28): 10380-10385
- Vidal, F., Sage, J., Cuzin, F., Rassoulzadegan, M. (1998): Cre expression in primary spermatocytes: A tool for genetic engineering of the germ line. *Molecular Reproduction and Development* 51: 274-280
- Wade, C. M., Kulbokas, E. J., Kirby, A. W., Zody, M. C., Mullikin, J. C., Lander, E. S., Lindblad-Toh, K., Daly, M. J. (2002): The mosaic structure of variation in the laboratory mouse genome. *Nature* 420: 574-578
- Wagner, D., Englert, C. (2002): The Wilms tumor suppressor WT1 regulates early gonad development by activation of *Sf1*. *Genes & Development* 16: 1839-1851
- Wagner, K. D., Wagner, N., Bondke, A., Nafz, B., Flemming, B., Theres, H., Scholz, H. (2002): The Wilms' tumor suppressor *Wt1* is expressed in the coronary vasculature after myocardial infarction. *The FASEB Journal* 16: 1117-1119
- Wagner, N., Wagner, K. D., Xing, Y., Scholz, H., Schedl, A. (2004): The major podocyte protein Nephron is transcriptionally activated by the Wilms' tumor suppressor WT1. *Journal of the American Society of Nephrology* 15: 3044-3051
- Wakayama, T., Perry, A. C., Zuccotti, M., Johnson, K. R., Yanagimachi, R. (1998): Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature* 394: 369-374
- Walker, C., Rutten, F., Yuan, X., Pass, H., Mew, D. M., Everitt, J. (1994): Wilms' tumor suppressor gene expression in rat and human mesothelioma. *Cancer Research* 54 (12): 3101-3106
- Wang, Z., Qiu, 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
- Welsch, U., Sobotta, J. (2006): *Lehrbuch Histologie – Zytologie, Histologie, mikroskopische Anatomie*. Elsevier, Urban & Fischer Verlag, München
- Wessels, A., Perez-Pomares, J.-M. (2004): The epicardium and epicardially derived cells (EPDCs) as cardiac stem cells. *The Anatomical Record. Part A* 276A: 43-57

- Wetering, M. van de, Oving, I., Muncan, V., Tjon Pon Fong, M., Brantjes, H., van Leenen, D., Holstege, F. C. P., Agami, R., Clevers, H. (2003): Specific inhibition of gene expression using stably integrated, inducible small-interfering-RNA vector. *EMBO reports* 4 (6): 609-615
- Wheelan, S. J., Boguski, M. S., Duret, L., Makalowski, W. (1999): Human and nematode orthologs-lessons from the analysis of 1800 human genes and the proteome of *Caenorhabditis elegans*. *Gene* 238(1): 163-70
- Wiedemann, H. (1983): Tumor and hemihypertrophy associated with Wiedemann-Beckwith syndrome. *European Journal of Pediatrics* 141(2): 129
- Wilm, B., Ipenberg, A., Hastie, N. D., Burch, J. B., Bader, D. M. (2005): The serosal mesothelium is a major source of smooth muscle cells of the gut vasculature. *Development* 132 (23): 5317-5328
- Wodarz, A., Nusse, R. (1998): Mechanisms of WNT Signaling in development. *Annual Reviews in Cell and Developmental Biology* 14: 59-88
- Yonekawa, H., Moriwaki, K., Gotoh, O., Watanabe, J., Hayashi, J.-I., Miyashita, N., Petras, M. L., Tagashira, Y. (1980): Relationship between laboratory mice and subspecies *Mus musculus domesticus* based on restriction endonuclease cleavage patterns of mitochondrial DNA. *Japan Journal of Genetics* 55: 289-296
- Yonekawa, H., Moriwaki, K., Gotoh, O., Hayashi, J.-I., Watanabe, J., Miyashita, N., Petras, M. L., Tagashira, Y. (1981): Evolutionary relationships among five subspecies of *Mus musculus* based on restriction enzyme cleavage patterns of mitochondrial DNA. *Genetics* 98: 801-816
- Yoshida, T., Owens, G. K. (2005): Molecular determinants of vascular smooth muscle cell diversity. *Circulation Research* 96: 280-291
- Young, H. E., Black, A. C. (2004): Adult stem cells. *The Anatomical record Part A* 276A: 75-102
- Yuan, Y., Zhou, L., Miyamoto, T., Iwasaki, H., Harakawa, N., Hetherington, C. J., Burel, S. A., Lagasse, E., Weissman, I. L., Akashi, K., Zhang, D.-E. (2001): AML1-ETO expression is directly involved in the development of acute myeloid leukemia in the presence of additional mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 10398-10403
- Zapata-Benavides, P., Tuna, M., Lopez-Berestein, G., Tari, A. M. (2002): Downregulation of Wilms' tumor 1 protein inhibits breast cancer proliferation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 295 (4): 784-790
- Zhang, Y., Tycko, B. (1992): Monoallelic expression of the human H19 gene. *Nature Genetics* 1: 40-44
- Zile, M. H. (2001): Function of Vitamin A in vertebrate embryonic development. *The Journal of nutrition* 131 (3): 705-708
- Zhang, Y., Buchholz, F., Muirers, J. P. P., Stewart, F. (1998): A new logic for DNA engineering using recombination in *Escherichia coli*. *Nature Genetics* 20: 123-128
- Zhang, Y., Bai, X.-F., Huang, C.-X. (2003): Hepatic stem cells: Existence and origin. *World Journal of Gastroenterology* 9 (2): 201-204
- Zhou, J., Rauscher, F. J., Bondy, C. (1993): Wilms' tumor (WT1) gene expression in rat decidua differentiation. *Differentiation* 54: 109-114

7. ANHANG

7.1 Lebenslauf

Name: Stephan Axel **Fees**-Leopold
 Geboren am: 06.05.1970 in Heilbronn
 Familienstand: verheiratet

Adresse:

E-Mail:

Telefon:

Beruflicher Werdegang

01/2000 bis heute

Beginn der experimentellen Doktorarbeit im molekular-genetischen Labor der Universitätskinderklinik Mainz.

Thema:

Ansatz zur Generierung einer konditionalen, reversiblen *Wt1* k.o.-Maus.

Dabei von 1/2000- 9/2002 **Stipendiat** des Graduiertenkollegs ‚Molekulare und zelluläre Mechanismen der Pathogenese‘ an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz.

Fertigstellung der Promotion:

11/2006

Hochschulausbildung

08/1999 bis 11/1999

Diplom-Biologe

Fächer: Zoologie, Genetik, Botanik, Immunologie
 Johannes Gutenberg-Universität Mainz

05/1998 bis 05/1999

Experimentelle Diplomarbeit:

Durchgeführt im molekulargenetischen Labor der Universitätskinderklinik.

Thema:

Untersuchungen an der Maus-Mutante ‚short digits‘ (Dsh)

SS 1998

Betreuung des tierphysiologischen Praktikums.

10/1991 bis 03/1998 Studium der Biologie an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz (Diplom).

Weitere Qualifikationen

2004 Fortbildung: Versuchstierkundliches Praktikum der ZVTE Mainz

Zivildienst

06/1989 bis 01/1991 Versöhnungskirchengemeinde Ingelheim im Gemeindedienst, Altenbetreuung und Jugendarbeit

Schulische Ausbildung

1980 bis 1989 Allgemeine Hochschulreife
Zunächst Albert Schweitzer-Gymnasium Neckarsulm,
dann Stefan George-Gymnasium Bingen am Rhein:

1976 bis 1980 Wilhelm Mayer-Grundschule Neckarsulm

Weitere Tätigkeiten und Hobbies:

Fechten

10/2005 bis 01/2006 Engagement im Staatstheater Mainz zur Choreographie von Fechtkämpfen in den Produktionen ‚Tochter des Piraten‘ und ‚Don Giovanni‘

1995 bis 2004 Dozent für Bühnenfechten an der Schauspielschule Mainz

1990 bis 2000 Als Fecht-Trainer (B-Trainerlizenz des Deutschen Fechterbundes) tätig bei den Vereinen TGM Mainz-Gonsenheim, TUS Ober-Ingelheim und KHC Bad Kreuznach

7.2 Publikationen

Artikel

Spangenberg, C., Lausch, E. U., Trost, T. M., Prawitt, D., May, A., Keppler, R., **Fees, S. A.**, Reutzel, D., Bell, C., Schmitt, S., Schiffer, I. B., Weber, A., Brenner, W., Hermes, M., Sahin, U., Türeci, Ö., Koelbl, H., Hengstler, J. G., Zabel, B. U. (2006): ERBB2-mediated transcriptional up-regulation of the $\alpha 5\beta 1$ Integrin Fibronectin Receptor promotes tumor cell survival under adverse conditions. *Cancer Research* 66: 3715-3725.

Prawitt, D., Enklaar, T., Gärtner-Rupprecht, B., Spangenberg, C., Lausch, E., Reutzel, D., **Fees, S.**, Korzon, M., Brozek, I., Limon, J., Housman, D. E., Pelletier, J., Zabel, B. (2005): Microdeletion and IGF2 loss of imprinting in a cascade causing Beckwith-Wiedemann syndrome with Wilms' tumor. *Nature Genetics* 37: 785 – 786.

Niedermaier, N., Schwabe, G. C., **Fees, S.**, Helmrich, A., Brieske, N., Seemann, P., Hecht, J., Seitz, V., Stricker, S., Leschik, G., Schrock, E., Selby, P. B., Mundlos, S. (2005): An inversion involving the mouse *Shh* locus results in brachydactyly through dysregulation of *Shh* expression. *Journal of Clinical Investigation* 115: 900-909.

Prawitt, D., Enklaar, T., Gärtner-Rupprecht, B., Spangenberg, C., Oswald, M., Lausch, E., Schmidtke, P., Reutzel, D., **Fees, S.**, Lucito, M., Korzon, M., Brozek, I., Limon, J., Housman, D. E., Pelletier, J., Zabel, B. (2005): Microdeletion of target sites for insulator protein CTCF in a chromosome 11p15 imprinting center in Beckwith-Wiedemann syndrome and Wilms' tumor. *Proc Natl Acad Sci USA* 102 (11): 4085-4090.

Trost, T. M., Lausch, E. U., **Fees, S. A.**, Schmitt, S., Enklaar, T., Reutzel, D., Brixel, L. R., Schmidtke, P., Maringer, M., Schiffer, I. B., Heimerdinger, C. K., Hengstler, J. G., Fritz, G., Bockamp, E. O., Prawitt, D., Zabel, B. U., Spangenberg, C. (2004): Premature senescence is a primary fail-safe mechanism of ERBB2-driven tumorigenesis in breast carcinoma cells. *Cancer Research* 65 (3): 840-849.

Bockamp, 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. *Physiological Genomics* 11: 115-132.

Krüger, M., Mennerich, D., **Fees, S.**, Schäfer, R., Mundlos, S., Braun, T. (2001): Sonic hedgehog is a survival factor for hypaxial muscles during mouse development. *Development* 128 (5): 743-752.

Zabel, B., Prawitt, D., **Fees, S.**, Spangenberg, C. (2000): Genetik des Wilms' Tumors. *Monatsschrift Kinderheilkunde* 148: 420.

Kongressbeiträge

Zabel, B. **Fees, S.**, Prawitt, D., Enklaar, T., Lausch, E., Spangenberg, C.: Pränatale Entstehungsmechanismen von Neoplasien am Beispiel des Wilms-Tumors. *Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kinder- und Jugendmedizin 2006 (Mainz)*

Prawitt, D., Enklaar, T., Gärtner-Rupprecht, B., Spangenberg, C., Oswald, M., Reutzel, D., **Fees, S.**, Brixel, L., Lausch, E., Korzon, M., Brozek, I., Limon, J., Pelletier, J., Zabel, B.: A two step imprinting defect involving CTCF binding sites results in Beckwith-Wiedemann syndrome and Wilms' Tumor. *Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik 2005 (Halle)*.

Spangenberg, C., **Fees, S.**, Trost, T. M., Enklaar, T., Reutzel, D., Klemm, G., Blattner, S., Langer, A., Lausch, E., Prawitt, D., Zabel, B. U. : Molecular refinement of the breakpoints in a Wilms' Tumor cell line with a translocation t(7;12)(p22;q22).
European Human Genetics Conference 2004 (München)

Trost, T. M., Lausch, E., **Fees, S.**, Prawitt, D., Hengstler, J. G., Türeci, Ö., Sahin, U., Schmidtke, P., Zabel, B. U., Spangenberg, C. : Consequences of reversible ERBB2-expression in breast carcinoma cells: Molecular analyses of intracellular signaling cascades and regulated target genes.
Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik 2003 (Marburg).

Spangenberg, C., Trost, T., **Fees, S.**, Lausch, E., Prawitt, D., Trübenbach, J., Wildhardt, G., Zepp, F., Spranger, J., Zabel, B. : Genetic factors studied in a family with autosomal dominant autoimmune disease.
Conference of the American Society of Human Genetics 2002 (Baltimore, USA)

Brixel, L. R., Enklaar, T., Thesker, M., Spangenberg, C., **Fees, S.**, Higgins, M., Prawitt, D., Zabel, B. U. : Characterization of a novel TRP-gene from the BWS-WT2 critical region on chromosome 11p15.5.
International Congress of Human Genetics 2001 (Wien)

Prawitt, D., Bahn, A., Enklaar, T., **Fees, S.**, Hauser, H., Brixel, L., Spangenberg, C., Quondamatteo, F., Hillemann, A., Herken, R., Burckhardt, G., **Zabel, B. U.**: hOAT1, a novel organic anion transporter in kidney.
Conference of the American Society of Human Genetics 2000 (San Diego, USA)

7.3 Danksagung

7.4 Erklärung

Ich versichere hiermit, die vorliegende Arbeit selbständig und nur mit den angegebenen Quellen und Hilfsmitteln angefertigt zu haben.

Stephan Fees-Leopold