

**Wilmstumor- und Metanephrogenese:
Differenzielle Genexpressionsanalysen
und weitere Charakterisierung identifizierter
Kandidatengene**

Dissertation zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

Christian Spangenberg
geboren in Marburg/Lahn

Mainz, 2000

Dekan:

1. Berichtstatter:

2. Berichtstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 12.12.2000

1	EINLEITUNG	1
1.1	Krebs als genetische Erkrankung	1
1.2	Nierenentwicklung und Wilmstumorgene	3
1.2.1	Die Wilmstumorgene als aberrante Form der Nierenentwicklung	3
1.2.2	Die Entwicklung der menschlichen Niere (Metanephrogenese)	8
1.2.3	Molekulare Aspekte der Nierenentwicklung	10
1.3	Das <i>WT1</i>-Gen in der Urogenitalentwicklung und Wilmstumorgene	13
1.3.1	<i>WT1</i> -Mutationen und Expression in <i>WT1</i> -assoziierten Erkrankungen	18
1.4	Ziel der Arbeit	21
2	MATERIAL UND METHODEN	23
2.1	Herkunft der verwendeten humanen Gewebe	23
2.2	DNA und RNA Standardmethoden	24
2.2.1	Isolation von DNA	24
2.2.1.1	<i>Isolation von Plasmid- und PAC-DNA</i>	24
2.2.1.2	<i>Isolation genomischer DNA aus Zellkulturen</i>	25
2.2.1.3	<i>Isolation von Phagen-DNA</i>	25
2.2.2	Isolation von RNA und Entfernung genomischer DNA	26
2.2.3	Quantifizierung von Nukleinsäuren	26
2.2.4	Fällung von DNA	26
2.2.5	Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen	27
2.2.6	Agarose-Gelelektrophorese	27
2.2.7	Wiedergewinnung von DNA aus Agarosegelen	28
2.2.8	Sequenzierung von DNA	28
2.3	Klonierung von DNA-Fragmenten in Plasmidvektoren	29
2.3.1	Vektorvorbereitung	29
2.3.2	Ligation	29
2.3.3	Herstellung kompetenter Bakterien nach Hanahan	30
2.3.4	Transformation und Selektion positiver Klone	30
2.3.5	Herstellung von <i>E. coli</i> -Dauerkulturen	31
2.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	31
2.5	Reverse Transkriptions-PCR (RT-PCR)	32
2.5.1	Erststrang cDNA-Synthese (reverse Transkription)	32
2.5.2	Standard RT-PCR und semiquantitative RT-PCR	32
2.5.3	Quantitative RT-PCR	33
2.6	Radioaktive und nichtradioaktive Markierungstechniken	33
2.6.1	Oligonukleotid- <i>labelling</i>	33
2.6.2	Herstellung einer komplexen cDNA-Sonde	33
2.6.3	Markierung durch Polynukleotidkinase	34
2.6.4	Markierung durch <i>nick</i> -Translation	35
2.7	Hybridisierungstechniken auf Filtern	35
2.7.1	DNA-DNA Hybridisierung nach <i>Southern</i>	35

2.7.2	Koloniefilterhybridisierung	35
2.7.3	Plauefilterhybridisierung	36
2.7.4	DNA-RNA Hybridisierung (<i>Northern</i> -Hybridisierung)	37
2.7.5	<i>Reverse Northern</i> -Hybridisierung	38
2.8	Fluoreszenz <i>in situ</i>-Hybridisierung (FISH) auf Metaphasechromosomen	39
2.9	<i>Differential display</i>	40
2.9.1	Erststrang-Synthese (reverse Transkription)	41
2.9.2	Amplifikation der cDNA mittels radioaktiver PCR	42
2.9.3	Auftrennung der radioaktiv markierten PCR-Produkte mittels denaturierender Polyacrylamidgelelektrophorese	43
2.9.4	Fragmentgewinnung und Reamplifikation differenziell exprimierter cDNAs	43
2.10	Untersuchung von Protein/DNA-Interaktionen	44
2.10.1	Herstellung von Proteinextrakten aus Zellkernen	44
2.10.2	Gelretardationsexperimente (<i>band shift</i> /EMSA)	44
2.11	Immunologischer Proteinnachweis	46
2.11.1	Auf Gewebeschnitten (Immunhistochemie)	46
2.11.2	Im <i>Western blot</i>	47
2.11.2.1	<i>Denaturierende diskontinuierliche Polyacrylamidgelelektrophorese</i>	47
2.11.2.2	<i>Transfer gelelektrophoretisch aufgetrennter Proteine auf Membranen und immunologischer Nachweis</i>	48
2.12	Expression und Isolation rekombinanter Proteine in Bakterien	48
2.13	Zellkultur	50
2.13.1	Verwendete Zelllinien	50
2.13.2	Kultivierung	50
2.13.3	Einfrieren und Auftauen von Zellen	50
2.13.4	Transiente Transfektion	51
2.13.5	Stabile Transfektion und Generierung stabil transfizierter Zellklone	51
2.13.6	Reporteranalysen (Luciferase-Assays)	52
2.14	Computergestützte Analyse von DNA- und Proteinsequenzen	52
2.15	Reagenzien und Materialien	53
2.15.1	Puffer, Lösungen und Kulturmedien	53
2.15.2	Enzyme	56
2.15.3	Größenstandards	56
2.15.4	Bakterienstämme	57
2.15.5	Radioisotope	57
2.15.6	Chemikalien	57
2.15.7	Geräte	57
2.15.8	Verwendete Oligonukleotide (<i>primer</i>)	58
3	ERGEBNISSE	61
3.1	Transkriptionelle Regulation des <i>WT1</i>-Gens	61
3.1.1	Gelretardationsanalysen	62
3.1.2	Reporteranalysen (Luciferaseassays)	67

3.2	Differenzielle Genexpressionsanalyse mit der Methode des <i>differential display</i>	75
3.2.1	Darstellung und Analyse differenzieller Genexpression	75
3.2.2	Auswahl differenziell auftretender cDNA-Fragmente	76
3.2.3	Verifikation differenziell auftretender cDNA-Fragmente und weitere Charakterisierung	78
3.2.4	Das Gen <i>TM7SF1</i>	87
3.2.4.1	Die <i>TM7SF1</i> cDNA	87
3.2.4.2	Untersuchungen zur differenziellen und gewebespezifischen Expression	91
3.2.4.3	In silico-Analyse des offenen Leserahmens	93
3.2.4.4	Chromosomale Lokalisierung mittels Fluoreszenz in situ-Hybridisierung (FISH)	94
3.2.4.5	Isolation und Charakterisierung des homologen Gens der Maus (<i>Tm7sf1</i>)	95
3.2.4.6	Interspeziesvergleich auf Nukleotid- und Aminosäureebene	98
3.2.4.7	Generierung <i>TM7SF1-L</i> überexprimierender Zelllinien	101
3.2.4.8	Expression des extrazellulären NH ₂ -Terminus von <i>TM7SF1</i> in <i>E. coli</i>	102
3.2.4.9	Test zweier Kaninchenserum auf α <i>TM7SF1</i> -Antikörper	103
3.2.5	Das Gen <i>TCF2</i> (<i>HNF1β</i> , <i>vHNF1</i> , <i>LFB3</i>)	104
3.2.5.1	Expression von <i>TCF2</i> in verschiedenen Geweben	105
3.2.5.2	Untersuchungen zur <i>TCF2</i> -Expression in einer Zelllinie mit induzierbarer <i>WT1</i> -Expression	108
3.2.5.3	Analyse der zelltypspezifischen Expression des <i>TCF2</i> -Proteins	110
3.2.5.4	Generierung einer Wilmstumorzelllinie mit stabiler <i>TCF2-A</i> -Überexpression	112
3.2.5.5	Mutationsanalyse des proteincodierenden Bereichs von <i>TCF2</i>	113
3.2.6	Das Gen <i>CDT151</i>	115
3.2.6.1	Die <i>CDT151</i> cDNA	115
3.2.6.2	Homologievergleiche	118
3.2.6.3	In silico-Analyse des offenen Leserahmens	121
3.2.6.4	Verifikation der chromosomalen Lokalisierung	122
3.2.7	Das Gen <i>GLI3</i>	124
3.2.7.1	Expression von <i>GLI3</i> in verschiedenen Nierengeweben	124
3.2.7.2	Untersuchungen zur Expression von Mitgliedern der sonic hedgehog (<i>SHH</i>) Signaltransduktionskaskade	128
4	DISKUSSION	131
4.1	Untersuchungen zur transkriptionellen Regulation des <i>WT1</i>-Gens	131
4.2	<i>Differential display</i> als Methode zur Untersuchung differenzieller Genaktivität	138
4.3	Mittels <i>differential display</i> identifizierte Gene und cDNAs	144
4.3.1	Homologievergleiche der Fragmente <i>FE7A3</i> und <i>FE7A5</i>	146
4.3.2	<i>TM7SF1</i>	151
4.3.3	<i>TCF2</i> und familiärer Wilmstumor	158
4.3.4	<i>CDT151</i>	164
4.3.5	<i>GLI3</i> (und ausgewählte Mitglieder der <i>SHH</i> -Signaltransduktionskaskade)	167
4.4	Ausblick	172
5	ZUSAMMENFASSUNG	174
6	LITERATURVERZEICHNIS	176

7	ANHANG	196
7.1	Lebenslauf	196
7.2	Publikationen	198
7.3	Danksagung	200

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungen:

Abb. 1.1	Vorläufiges Mehrschrittmodell für die Wilmstumorgengese und involvierte genomische Loci	8
Abb. 1.2	Schematische Darstellung der Lage nierenentwicklungsrelevanter Gewebe im Embryo	9
Abb. 1.3	Schematische Darstellung der Metanephrogenese auf zellulärer Ebene	10
Abb. 1.4	Molekulare Vorgänge während der reziproken Induktion von Ureterknospe und metanephrischem Mesenchym	13
Abb. 1.5	Schematische Darstellung der mRNA- und Proteinstruktur von WT1	15
Abb. 1.6	Genotyp-Phänotyp-Korrelation von WT1-Veränderung und assoziierten Erkrankungen	20
Abb. 2.1	Darstellung des Versuchsablaufs beim <i>differential display</i>	41
Abb. 3.1	Übersicht über die in den Gelretardationsanalysen verwendeten <i>WT1</i> -Promotorfragmente	63
Abb. 3.2	Bindung von SP-Faktoren an die CTC-Sequenzwiederholung im <i>WT1</i> -Promotor	64
Abb. 3.3	Bindung von SP-Faktoren an eine GT-Box im PvuI/XbaI-Fragment des <i>WT1</i> -Promotors	65
Abb. 3.4	Bindung von SP1 und SP3 an die GC-Boxen des XbaI/TaqI- Promotorfragments	66
Abb. 3.5	Quantifizierung der SP1- und SP3-Menge in 293- und WCCS1-Zellen	67
Abb. 3.6	Übersicht über die klonierten Deletionskonstrukte des <i>WT1</i> -Promotors in pGL2-basic	68
Abb. 3.7	Luciferaseaktivität der Promotor-Deletionsreihe in WCCS1- und 293-Zellen	70
Abb. 3.8	Stimulierbarkeit des <i>WT1</i> -Promotors durch SP-Faktoren	71
Abb. 3.9	Wirkung von SP3 auf die SP1-vermittelte Transaktivierung am <i>WT1</i> -Promotor	73
Abb. 3.10	Effekt des Retinoblastom-Genprodukts auf den <i>WT1</i> -Promotor	74
Abb. 3.11	Autoradiogramm eines denaturierenden PAA-Gels mit aufgetrennten DD-PCR-Produkten	76
Abb. 3.12	Schematische Darstellung des Verlaufs der durchgeführten <i>differential display</i> -Analysen	77
Abb. 3.13	<i>Reverse Northern</i> -Hybridisierung von cDNA-Fragmentfiltern mit komplexen cDNA-Sonden aus adulter- und fetaler Nieren-cDNA	79
Abb. 3.14	Ergebnisse semiquantitativer RT-PCR-Experimente zur Verifikation differenziell exprimierter cDNA-Fragmente	81
Abb. 3.15	Schematische Darstellung der <i>TM7SF1</i> -cDNA	88
Abb. 3.16	cDNA- und abgeleitete Aminosäuresequenz von TM7SF1	89
Abb. 3.17	Exon-Intron-Grenzen der alternativ gespleißten Exons	90
Abb. 3.18	<i>Northern</i> -Hybridisierung <i>TM7SF1</i> (Transkriptgröße und differenzielle Expression)	90
Abb. 3.19	<i>Northern blot</i> -Experimente zur Untersuchung der gewebespezifischen Expression von <i>TM7SF1</i>	92
Abb. 3.20	Sekundärstrukturvorhersage für TM7SF1 mit dem <i>DAS Transmembrane Prediction Algorithm</i>	93
Abb. 3.21	Schematische Darstellung der TM7SF1-Struktur (Modell)	94
Abb. 3.22	Fluoreszenz <i>in situ</i> -Hybridisierung des PAC-Klons 43C3 auf humanen Metaphasechromosomen	95
Abb. 3.23	<i>Northern blot</i> -Experimente (I) zur Untersuchung der Transkriptgröße und gewebespezifischen Expression von <i>Tm7sf1</i>	96
Abb. 3.24	<i>Northern blot</i> -Experiment (II) zur Untersuchung der gewebespezifischen Expression von <i>Tm7sf1</i>	97
Abb. 3.25	Chromosomale Lokalisation von <i>Tm7sf1</i> im Mausgenom	98
Abb. 3.26	Nukleotidsequenzvergleich von <i>TM7SF1</i> und <i>Tm7sf1</i>	99
Abb. 3.27	Aminosäuresequenzvergleich von TM7SF1(-L) und Tm7sf1	100
Abb. 3.28	Das Expressionsplasmid CMV-TM7SF1L	101
Abb. 3.29	Hybridisierung einer <i>TM7SF1</i> -spezifischen Sonde auf Gesamtzell-RNA stabil transfizierter 293- und WCCS1-Zellen	102
Abb. 3.30	Das Expressionsplasmid GST-TM7	103
Abb. 3.31	Immunoblots mit Antiserum 5539	104
Abb. 3.32	Vergleich der <i>TCF2</i> -Expression verschiedener Normalnieren- und WT-Gewebe	105
Abb. 3.33	Quantifizierung der <i>TCF2</i> -Expression durch <i>Northern</i> Hybridisierung eines RNA-Arrays	107
Abb. 3.34	Kontrolle der <i>WT1</i> -Expression in 293tetCTL- bzw. 293tetWT1-Zellen	109
Abb. 3.35	Abhängigkeit der <i>TCF2</i> -Transkription von <i>WT1</i>	110

Abb. 3.36	Immunhistochemischer Nachweis der TCF2-Expression auf Gewebeschnitten humaner Niere	111
Abb. 3.37	Das Expressionsplasmid CMV-TCF2A	112
Abb. 3.38	Test der stabil transfizierten WCCS1-Zellklone auf <i>TCF2</i> -Expression	113
Abb. 3.39	Schematische Darstellung der <i>CDT151</i> -cDNA (vor Sequenzerweiterung)	115
Abb. 3.40	Schematische Darstellung der cDNA-Klonierungsstrategie von <i>CDT151</i>	116
Abb. 3.41	cDNA- und abgeleitete Aminosäuresequenz von CDT151	117
Abb. 3.42	Vergleich der Aminosäuresequenzen von CDT151 und CGI-55	119
Abb. 3.43	Ergebnisse der Datenbankrecherchen mit der cDNA- bzw. der abgeleiteten Aminosäuresequenz von <i>CDT151</i>	120
Abb. 3.44	Schematische Darstellung der aus den Homologievergleichen und Strukturvorhersagen abgeleiteten Proteinmotive von CDT151 (Modell)	122
Abb. 3.45	Genomische PCRs zur Verifikation der chromosomalen Lokalisation von <i>CDT151</i>	123
Abb. 3.46	Vergleichende Untersuchung der <i>GLI3</i> -Expression in verschiedenen Normalnieren- und Tumorgewebe mittels sqRT-PCR (Multiplex-PCR)	125
Abb. 3.47	Autoradiogramm gelelektrophoretisch aufgetrennter Produkte radioaktiver RT-PCR-Reaktionen zur Quantifizierung der relativen Expressionsstärke von <i>GLI3</i>	126
Abb. 3.48	Grafische Darstellung der relativen Expressionsstärke von <i>GLI3</i> in den untersuchten Geweben	127
Abb. 3.49	Autoradiogramme gelelektrophoretisch aufgetrennter Produkte radioaktiver RT-PCR-Reaktionen zur Quantifizierung der relativen Expressionsstärke von <i>PTCH</i> , <i>SMOH</i> , <i>IGF2</i>	128
Abb. 3.50	Grafische Darstellung der Expressionsquantifizierung von <i>PTCH</i> , <i>SMOH</i> und <i>IGF2</i>	129
Abb. 4.1	Zeitliches Expressionsprofil der Proteine Pax-2, Pax-8 und Wt1 während der Metanephrogenese	133
Abb. 4.2	Schematische Darstellung des <i>WT1</i> -Promotors (Deletionsreihe) und Aktivitätsverteilung	137
Abb. 4.3	Schematische Darstellung des aus <i>FE7A3</i> abgeleiteten putativen Proteins	147
Abb. 4.4	Mitglieder der Cadherin-Proteinfamilie	148
Abb. 4.5	Ausschnitt aus der Annotation zum <i>unigene</i> -Datenbankeintrag Hs. 155575	150
Abb. 4.6	Schematische Darstellung der TM7SF1-Struktur (Modell)	152
Abb. 4.7	Funktionsprinzip G Protein-gekoppelter Rezeptoren	153
Abb. 4.8	Schematische Darstellung der Isoformen von HNF1 und TCF2	161
Abb. 4.9	Schematische Darstellung der aus den Homologievergleichen und Strukturvorhersagen abgeleiteten Proteinmotive von CDT151 (Modell)	166
Abb. 4.10	Schematische Darstellung der HH-Signaltransduktionskaskade	170

Tabellen:

Tab. 1.1	Liste putativer WT1-Zielgene	17
Tab. 3.1	Übersicht über differenzielle Expression, vorliegende Homologien zu Datenbankeinträgen und chromosomale Lokalisation der verifizierten cDNA-Fragmente	85

Abkürzungsverzeichnis:

A	Adenin
Abb.	Abbildung
bp	Basenpaare
C	Cytosin
ca.	zirka
Ci	Curie
cpm	<i>counts per minute</i>
DD	<i>differential display</i>
Dig	Digoxygenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNaseI	Desoxyribonuklease I
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
Fa.	Firma
G	Guanin
h	Stunde
HE	Hämatoxylin-Eosin
Kap.	Kapitel
kDa	Kilodalton
min	Minute
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
sec	Sekunde
T	Thymin
u.a.	unter anderem
ü.N.	über Nacht
upm	Umdrehungen pro Minute
vgl.	vergleiche
z.B.	zum Beispiel

1 EINLEITUNG

1.1 Krebs als genetische Erkrankung

Die maligne Entartung normaler Körperzellen ist das Resultat eines mehrstufigen Prozesses, der in Veränderungen des Erbguts seine Ursache hat. Heute ist klar, dass es sich bei den verantwortlichen genetischen Defekten – seien dies chromosomale Aberrationen oder Punktmutationen – um zahlreiche Ereignisse handelt, die von der Tumorprädisposition über die Tumorentstehung und Progression bis hin zum malignen Phänotyp führen. Zytogenetische wie molekulargenetische Daten bestätigen dieses Konzept der Akkumulation verschiedener Veränderungen des Genoms (*multi-step* oder *multi-hit* Konzept). Es beschreibt die Tumorentstehung als klonale Evolution von Tumorzellen, angetrieben durch Mutagenese (Nowell, 1976; Vogelstein und Kinzler, 1993). Die Auswirkungen der Mutationen auf die Zellphysiologie sind dabei vermutlich in allen Tumortypen ähnlich wenn nicht gar gleich. Es wird diskutiert, dass alle Tumorzellen bis zur malignen Entartung die folgenden sechs zellphysiologischen Merkmale aufweisen: (1) Unabhängigkeit von exogenen Wachstumssignalen, (2) Nichtansprechen auf wachstumshemmende Signale, (3) Unterdrückung der Apoptose, (4) uneingeschränkte Teilungsfähigkeit, (5) Fähigkeit zur Induktion der Angiogenese und (6) Invasivität und Metastasierung (Hanahan und Weinberg, 2000). Die Identifikation der durch Mutation oder chromosomale Aberration betroffenen Gene (Kandidatengene), die für die genannten biologischen Endpunkte verantwortlich zeichnen, ist dabei im Fokus des Interesses der Tumorforschung. Für die kolorektale Karzinogenese, der molekulargenetisch zur Zeit vermutlich bestverstandenen Tumorerkrankung des Menschen, konnte die sequenzielle Veränderung von Kandidatengenen mit den entsprechenden Stadien der Tumorentstehung und der Tumorentwicklung (über verschiedene Adenomstadien) bis hin zum Karzinom korreliert werden (Fearon und Vogelstein, 1990; Kinzler und Vogelstein, 1996).

Kandidatengene für die Tumorentstehung und/oder die Tumorentwicklung fallen in eine von zwei funktionellen Genklassen, deren Mitglieder sich in letzter Konsequenz auf die Zellhomöostase eines Zellverbandes auswirken: Onkogene, die eine Vermehrung des Zellmaterials bewirken und Tumorsuppressorgene, die die Vermehrung des Zellmaterials verhindern bzw. die Zellzahl durch aktive Prozesse, wie z.B. die Apoptose, vermindern. Das koordinierte Zusammenwirken der physiologischen Produkte beider Genklassen führt zu einer ausgewogenen Bilanz von Zellerneuerung und Zelltod im Gewebe. Onkogene sind Gene, deren Produkte durch funktionelle Mutation oder dysregulierte Expression eines Protoonkogens (der funktionell normalen Variante eines Onkogens) aktiv an der malignen

Transformation von Zellen beteiligt sind. Durch die dominante Wirkung von Onkogenen auf die Zellphysiologie ist bereits die Veränderung eines Allels eines Protoonkogens ausreichend, Zellen einen (weiteren) Schritt in der Tumorgenese vollziehen zu lassen. Ein gutes Beispiel für ein Protoonkogen ist das *ERBB2*-Gen, das für einen Rezeptor des epidermalen Wachstumsfaktors (HER2:= *human epidermal growth factor receptor 2*) codiert. Seine onkogene Form kann entweder durch Punktmutationen innerhalb der rezeptoreigenen extrazellulären Domäne oder der Transmembrandomäne generiert werden (Bargmann *et al.*, 1986; Siegel und Muller, 1996), oder aber durch Amplifikation des genomischen Locus und daraus resultierender Überexpression in Tumorzellen entstehen (Di Fiore *et al.*, 1987; Park *et al.*, 1989). Beide Szenarien haben zur Konsequenz, dass der Rezeptor in Abwesenheit des Liganden EGF (*epidermal growth factor*) aktiv ist und die Wachstumsfaktor-unabhängige Proliferation der betroffenen Zelle(n) stimuliert. Die genetische Veränderung des Protoonkogens zum Onkogen führt somit zu einem Funktionsgewinn des codierten Genprodukts (*gain of function*).

Im Gegensatz zu den Onkogenen tragen Tumorsuppressorgene erst durch Veränderung beider Allele zur malignen Transformation eukaryontischer Zellen bei (man spricht daher auch von „rezessiven Onkogenen“). Diese genetischen Veränderungen bedingen bei Tumorsuppressorgenen einen Funktionsverlust des Genproduktes (*loss of function*), der zum Wegfall negativ-regulatorischer Komponenten der Proliferationskontrolle oder positiv-regulatorischer Komponenten der Apoptose führt. Ein Beispiel für ein Tumorsuppressorgen ist das Retinoblastomgen *RB1*, das neben seiner funktionellen Inaktivierung in Retinoblastomen in verschiedenen Tumoren von Mutationen betroffen ist (Horowitz *et al.*, 1990). Im Zellzyklus verhindert das Genprodukt (RB) abhängig vom Phosphorylierungszustand die Passage des sogenannten „Restriktionspunktes“ (*restriction point, point of no return*) in der späten G1-Phase. Hier ist das Verhältnis mitogener und antiproliferativer Signale für die Progression von Zellen im Zellzyklus entscheidend und auf Ebene des RB-Proteins kommt es zur Integration der exogenen Signale. Reversible Interaktionen von RB mit Proteinkinasen und Transkriptionsfaktoren sind es u.a., die das kontrollierte Durchlaufen des Zellzyklus auf molekularer Ebene garantieren (Übersichtsartikel: Weinberg, 1995; Hanahan und Weinberg, 2000).

Etablierte Methoden der Krebsbehandlung, wie z.B. die chirurgische Entfernung, Bestrahlung oder Chemotherapie können nur lokal eingesetzt werden und/oder zeichnen sich durch eine geringe Selektivität und den damit verbundenen starken Nebenwirkungen aus. Darüber hinaus weisen verschiedene Neoplasieformen eine unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber bestimmten Therapieformen auf. Daher ist eine Korrelation von molekularem Status der Krebserkrankung und entsprechender Therapie

wünschenswert, um betroffenen Patienten die bestmögliche Therapieform bei minimaler Belastung zu gewährleisten. Die angestrebte Gentherapie von Tumorleiden versucht u.a., die durch Mutation oder chromosomale Aberrationen inaktivierten Tumorsuppressorgene durch funktionelle Kopien zu ersetzen, oder aber aktivierte Onkogene funktionell zu inaktivieren. Eine weitere Strategie zur Behandlung von Krebserkrankungen, die Tumorstimmulation, nutzt die Tatsache, dass die genetischen Veränderungen, die zur malignen Transformation führen, in der Expression veränderter Proteine resultiert, die prinzipiell von Immunzellen des Körpers erkannt werden. Sind solche Tumorantigene bekannt, eignen sie sich für die selektive Stimulation der Anti-Tumor-Aktivität dieser körpereigenen Abwehrzellen. Voraussetzung sowohl für die Optimierung der konventionellen Behandlungsmethoden als auch für viele Formen der Gentherapie von Tumorerkrankungen, ist die Identifikation der tumorrelevanten Gene, ihre funktionelle Charakterisierung im physiologischen Zellgeschehen und die Aufklärung der Pathomechanismen nach genetischen Veränderungen im Tumorgewebe.

1.2 Nierenentwicklung und Wilmstumorgnese

1.2.1 Die Wilmstumorgnese als aberrante Form der Nierenentwicklung

Der Wilmstumor (WT oder Nephroblastom) ist ein solider Nierentumor des Kindesalters. Mit einer Inzidenz von 1:10000 tritt er in den allermeisten Fällen vor dem 15. Lebensjahr auf, wobei das Hauptmanifestationsalter zwischen 3 und 4 Jahren liegt (Breslow *et al.*, 1993). Damit stellt der WT neben dem Neuroblastom die häufigste solide Tumorerkrankung des Kindesalters dar.

Nephroblastome treten normalerweise einseitig und sporadisch auf, bei ca. 10% der Patienten findet man jedoch bilaterale Tumore. Dabei können zusätzliche Fehlbildungen vorliegen, die entweder Einzelbefunde sein können oder aber einen Teil spezifischer Krankheitssyndrome darstellen (Wiener *et al.*, 1998). Diese zusätzlichen Fehlbildungen betreffen zumeist den Urogenitaltrakt bzw. führen zu somatischem Überwuchs (Makrosomie). Zu den häufigsten Syndromen mit erhöhtem Nephroblastomrisiko zählen das WAGR-Syndrom (charakterisiert durch Wilmstumor, Aniridie, urogenitale Anomalien, geistige Retardierung), das Denys-Drash-Syndrom (DDS), das Wiedemann-Beckwith-Syndrom (WBS), das Frasier-Syndrom und das Simpson-Golabi-Behmel-Syndrom (Decker und Zabel, 2000; Brüning *et al.*, 1995). Neben diesen mehrheitlich sporadisch auftretenden WTs findet sich in ca. 2% der WT-Fälle ein familiärer Hintergrund (vgl. Kap. 4.3.3 und Breslow *et al.*, 1996).

1972 wurde von Knudson und Strong das für die Entstehung des Retinoblastoms 1971 aufgestellte Zwei-Treffer-Konzept auf das Nephroblastom übertragen. Gemäß dieses Konzeptes sind für die Entwicklung der Erkrankung zwei unabhängige genetische Veränderungen, die zur funktionellen Inaktivierung beider Allele eines Tumorsuppressorgens führen, ausschlaggebend. Das Modell erklärt das frühere Auftreten bilateraler oder multifokaler Tumoren (Durchschnittsalter ca. 2,5 Jahre) durch eine erbliche Prädisposition, die aus der konstitutionellen Inaktivierung des ersten Tumorsuppressorgenallels hervorgeht. Während bei sporadischen (unilateralen) Tumoren beide Inaktivierungsereignisse somatisch und in der gleichen Zelle (oder in Tochterzellen der ersten Zelle) entstehen müssen (ein statistisch eher unwahrscheinlicher Fall), besitzen alle Körperzellen eines Individuums mit der Prädisposition lediglich ein funktionelles Allel. Die Inaktivierung dieses Allels z.B. durch Mutation oder Deletion ist damit viel wahrscheinlicher und führt sowohl zum früheren Manifestationsalter als auch zum Auftreten mehrerer Tumore. Die genetische Heterogenität der Wilmstumorerkrankung, die sich in zahlreichen chromosomalen Aberrationen in Tumorzellen ausdrückt (s.u.), wie auch die Beobachtung, dass gleiche genetische Veränderungen in Vorläuferläsionen wie in Wilmstumorgewebe der selben Patienten gefunden werden (s.u.), deuten allerdings darauf hin, dass die Tumorprogression im Falle des Nephroblastoms wesentlich komplexer abläuft, als dass sie mit dem Zwei-Treffer-Konzept erklärbar wäre. Vielmehr deutet sich an, dass auch für den WT ein mehrstufiger Tumorgeneseprozess mit mehreren einhergehenden genetischen Veränderungen ähnlich dem Modell für die Kolorektalkarzinogenese angenommen werden muss (Beckwith, 1997; Charles *et al.*, 1998; Huff, 1998; Decker und Zabel, 2000).

Histologisch zeigen WTs eine ausgeprägte Heterogenität. Sie weisen in der Regel stromale, epitheliale und blastemische Gewebereiche auf, wobei die jeweiligen Anteile am Gesamttumorgewebe von Tumor zu Tumor variieren (man spricht von einer triphasischen Histologie von WTs; Harms und Schmidt, 1997). Die unterschiedlichen Differenzierungsstadien der Tumorzellen sind vermutlich Ausdruck der gestörten Induktionsprozesse zwischen metanephrogenem Blastem und Ureterknospe während der Nierenentwicklung, die zur Ausbildung von WTs führen (dem Zusammenhang zwischen Nierenentwicklung und Wilmstumorgenese wird Rechnung getragen, indem die Nierenentwicklung im folgenden Kapitel 1.2.2 ausführlich dargestellt wird). Als Vorläuferläsionen für WTs wurden mittlerweile persistierende Zellen des metanephrischen

Mesenchyms im differenzierten Nierengewebe (sog. *nephrogenic rests*, NR) identifiziert (Beckwith *et al.*, 1990; Beckwith, 1998). Sie finden sich in ca. 25-40% der Nieren von WT-Patienten, während im Nierengewebe nicht betroffener Kinder nach der 36. Schwangerschaftswoche normalerweise keine Blastemzellinseln mehr zu beobachten sind (Bove und McAdams, 1976; Beckwith *et al.*, 1990).

Die erwähnte histologische Heterogenität von Nephroblastomen geht mit einer genetischen Heterogenität einher. Mittels Kopplungsanalysen und der Charakterisierung chromosomaler Aberrationen, die mit verschiedenen Tumorsyndromen assoziiert sind (insbesondere dem WAGR-Syndrom), konnte bereits ein Wilmstumorgen, das Tumorsuppressorgen *WT1*, in der chromosomalen Region 11p13 identifiziert und charakterisiert werden (Call *et al.*, 1990; Gessler *et al.*, 1990; vgl. Kap. 1.3). Die Tatsache, daß dieses Gen nur in ca. 10% der Nephroblastome Mutationen aufweist (Little und Wells, 1997), sowie die Kopplung der Erkrankung mit anderen chromosomalen Loci (s.u.) legt die Vermutung nah, dass weitere Gene von Mutationen betroffen sind und zur Wilmstumorgenese beitragen.

Ein putatives WT-Gen, *WT2*, wurde - aufgrund der Assoziation von WBS und WT-Prädisposition - in die chromosomale Region 11p15.5 kartiert (Henry *et al.*, 1989a, 1989b; Koufos *et al.*, 1989). So konnte für einen hohen Anteil von WTs aus WBS-Patienten ein Verlust der Heterozygotität (*loss of heterozygosity*, LOH) polymorpher Marker in 11p15.5 in den Tumoren nachgewiesen werden (Mannens *et al.*, 1987, Hayward *et al.*, 1988, Little *et al.*, 1988, Henry *et al.*, 1989a). Diese auf strukturellen Veränderungen basierende *WT2*-Kartierung wird durch funktionelle Analysen gestützt. So besitzen chromosomale Fragmente aus der Region 11p15.5 eine supprimierende Wirkung auf die Proliferation verschiedener Zelllinien, darunter auch auf die Wilmstumorzelllinie G401 (Hoovers *et al.*, 1995; Reid *et al.*, 1996; Feinberg, 1996). Aufgrund molekulargenetischer Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Kandidatengene für die Pathogenese des WBS und damit auch für die mit ihm assoziierten Tumorerkrankungen vermutlich *imprintete* Gene der Chromosomenregion 11p15.5 mit uniparentaler Expression sind (Mannens *et al.*, 1994; Moulton *et al.*, 1996). Verschiedene Gene dieser Kandidatenregion für das WBS und den WT sind mittlerweile kloniert. Von ihnen kann aber keines den komplexen Phänotyp der WBS-Patienten erklären oder ist in der Mehrzahl der WBS-assoziierten Nephroblastome von Mutationen betroffen (Übersichtsartikel: Li *et al.*, 1998). Lediglich in *p57^{KIP2}* sind bisher funktionell inaktivierende Mutationen im Tumorgewebe eines Teils der

untersuchten WBS-Patienten nachgewiesen worden (Hatada *et al.*, 1996, 1997; Lee *et al.*, 1997). Dies läßt vermuten, dass das WBS und die damit assoziierte Tumorphädisposition durch Defekte in mehreren unabhängigen Genen entstehen kann, oder aber dass übergeordnete Regulationsvorgänge betroffen sind und die ursächliche genetische Veränderung noch nicht identifiziert wurde.

Neben *WT1* und der *WT2*-Region sind zahlreiche weitere spezifische karyotypische Veränderungen in Wilmstumoren im Rahmen unterschiedlicher Untersuchungen nachgewiesen worden. So wird aufgrund struktureller chromosomaler Aberrationen und LOH-Untersuchungen ein dritter Wilmstumorlokus (*WT3*) auf dem langen Arm von Chromosom 16 vermutet. Er scheint in ca. 20% der untersuchten Nephroblastompatienten betroffen zu sein (Maw *et al.*, 1992; Austruy *et al.*, 1995; Coppes *et al.*, 1992; Grundy und Coppes, 1996), wobei evtl. eine schlechte Prognose für betroffene Patienten damit gekoppelt ist (Grundy *et al.*, 1994). Auch Mutationen im Tumorsuppressorgen *P53* wurden in *WTs* beschrieben. Dabei handelt es sich vornehmlich um die anaplastische Form (Bardeesy *et al.*, 1994, 1995) des Nephroblastoms (vgl. Abb. 1.1), die sich durch eine erhöhte Resistenz gegenüber der Chemotherapie auszeichnet (Zuppan *et al.*, 1988). Daneben finden sich vermehrt strukturelle chromosomale Aberrationen auf dem kurzen Arm von Chromosom 7 (Rivera *et al.*, 1985, 1995; Miozzo *et al.*, 1996), wobei eine Häufung von Bruchpunkten und LOH-Ereignissen in der Region 7p15-p22 (Wilmore *et al.*, 1994; Löbber *et al.*, 1998; Powlesland *et al.*, 2000) auffällt.

Ca. 2% der beobachteten *WT*-Fälle sind familiär und zeigen einen autosomal dominanten Erbgang mit unvollständiger Penetranz (Brown *et al.*, 1972). Mittels Kopplungsanalysen in großen *WT*-Familien konnten *WT1*, *WT2* und *WT3* als Ursache für die familiäre Form der Erkrankung ausgeschlossen werden (Grundy *et al.*, 1988; Huff *et al.*, 1988, 1992). Vielmehr werden Kandidatengene für den familiären Wilmstumor (*FWT*) in zwei genomischen Bereichen, *FWT1* in 17q12-21 (Rahman *et al.*, 1996, 1998) und *FWT2* in 19q13.3-q13.4 (McDonald *et al.*, 1998) vermutet (vgl. zum familiären *WT* auch Kap. 4.3.3).

Aufgrund tumorspezifischer chromosomaler Veränderungen werden weitere chromosomale Loci mit der Wilmstumorgengese in Verbindung gebracht, darunter distinkte Regionen in 1p (Mannens *et al.*, 1996). Ferner werden in einer Reihe von *WTs* Zugewinne genomischen Materials der Chromosomen(bereiche) 1q, 3, 7q, 8, 12 beobachtet. So ist Trisomie 1q eine sehr häufig auftretende Veränderung von *WT*-Karyotypen (Kondo *et al.*, 1988; Hohenfellner *et al.*, 1988; Betts *et al.*, 1997, 1999) und eine Trisomie von

Chromosom 12 findet sich sehr häufig in WTs, in Einzelfällen als einzige zytogenetisch detektierbare Aberration (Sheng *et al.*, 1990). Verluste genomischen Materials in WTs sind für die Regionen 1p, 4q, 5p, 7p, 9p, 15q, 18q, 21q und 22q beschrieben (Altura *et al.*, 1996; Steenman *et al.*, 1997; Getman *et al.*, 1998; Huff, 1998 und Referenzen dort).

Mit Hilfe ausgedehnter molekulargenetischer Untersuchungen konnte ein (bisher noch unvollständiges) Mehrschrittmodell für die Pathogenese des Nephroblastoms erstellt werden, das, ausgehend vom metanephrogenen Blastem, die Initiation und Progression des WT bis hin zur malignen Entartung mit spezifischen genetischen Veränderungen korreliert (vgl. Abb. 1.1 auf der folgenden Seite). Insbesondere durch vergleichende Untersuchungen bezüglich genetischer Veränderungen in WT-Vorläuferläsionen und WT-Gewebe konnten erste Erkenntnisse über eine „Genotyp-Phänotyp-Korrelation“ der WT-Genese gewonnen werden (Park *et al.*, 1993a; Charles *et al.*, 1998; Powlesland *et al.*, 2000). Demnach sind für die Tumorentstehung (vereinfacht kann sie als das unphysiologische Persistieren embryonalen Gewebes über die 36. Schwangerschaftswoche hinaus beschrieben werden) vermutlich zwei genetische „Treffer“ notwendig (z.B. die Inaktivierung beider Allele von *WT1*, der Verlust des *imprintings* [*loss of imprinting*, LOI] in 11p15.5 oder eine paternale uniparentale Disomie 11p [patUPD11p]; Bruening *et al.*, 1995), die in der Folge nach weiteren genetischen Veränderungen zu hyperplastischem Wachstum führen. Die Tumorentstehung über die Entwicklung klonalen neoplastischen Wachstums ist vermutlich mit chromosomalen Veränderungen in den Chromosomenbereichen 1p, 16q (Bruening *et al.*, 1995; Charles *et al.*, 1998; Beckwith *et al.*, 1997) und evtl. auch 7p gekoppelt (Park *et al.*, 1993a; Powlesland *et al.*, 2000).

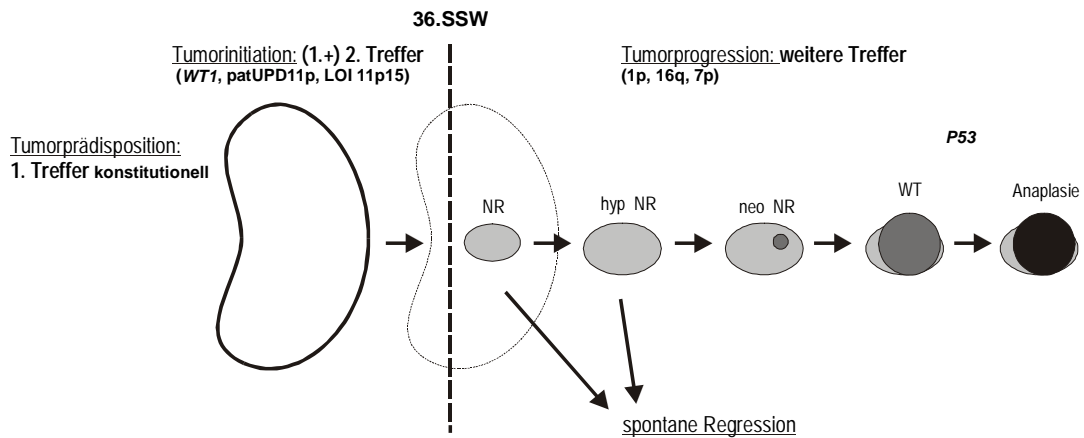


Abbildung 1.1: Vorläufiges Mehrschrittmodell für die Wilmstumorgengese und involvierte genomische Loci (ausgehend von Bruening, 1995, Beckwith *et al.*, 1997, Charles *et al.*, 1998, Decker und Zabel, 2000 verändert). Frühe Ereignisse in der Tumorgengese, die zur Persistenz embryonaler Blastemzellen bis über die 36. Schwangerschaftswoche führen (nephrogene Reste, NR), betreffen häufig 11p-Loci. Vermutlich spätere genetische Ereignisse betreffen chromosomale Regionen in 1p und 16q und evtl. auch 7p. Die Anaplasie in WT-Gewebe (ca. 5% der beobachteten Fälle) scheint mit *P53*-Mutationen einher zu gehen. Die Möglichkeit zur spontanen Regression ergibt sich aus Beobachtungen, nach denen zurückgebildete NRs in den Nieren von ca. 0,4% nicht betroffener Kinder gefunden werden (Shanklin und Sotelo-Avila, 1969). Es wird auch diskutiert, ob manche WTs direkt aus Blastemzellen ohne NR-Stadien hervorgehen (Charles *et al.*, 1998). hyp/neo NR= hyperplastischer/neoplastischer NR.

1.2.2 Die Entwicklung der menschlichen Niere (Metanephrogenese)

Die Nierenentwicklung vollzieht sich beim Menschen zwischen der 3. und 36. Schwangerschaftswoche in drei räumlich und zeitlich voneinander abgrenzbaren Stufen. Zunächst wird die Vorniere (Pronephros) angelegt, darauf folgt die Urnieren (Mesonephros), und als letztes die Nachnieren/bleibende Niere (Metanephros). Alle drei Nierenanlagen gehen aus dem intermediären Mesoderm hervor, dessen Zellmaterial sich von den Somiten abschnürt und die Nephrotome bildet. Die Nephrotome aller Segmente verschmelzen miteinander und bilden den sogenannten nephrogenen Strang, der an der dorsalen Wand der intraembryonalen Zölohmöhle als Urogenitalleiste das Ausgangsgewebe der drei Nierengenerationen bildet (vgl. Abb. 1.2 auf der folgenden Seite). Pro- und Mesonephros sind beim Menschen nur vorübergehende Bildungen. Für die Entwicklung des Metanephros von funktioneller Bedeutung ist lediglich der auf sie zurückgehende Urnierengang (Wolff'scher Gang).

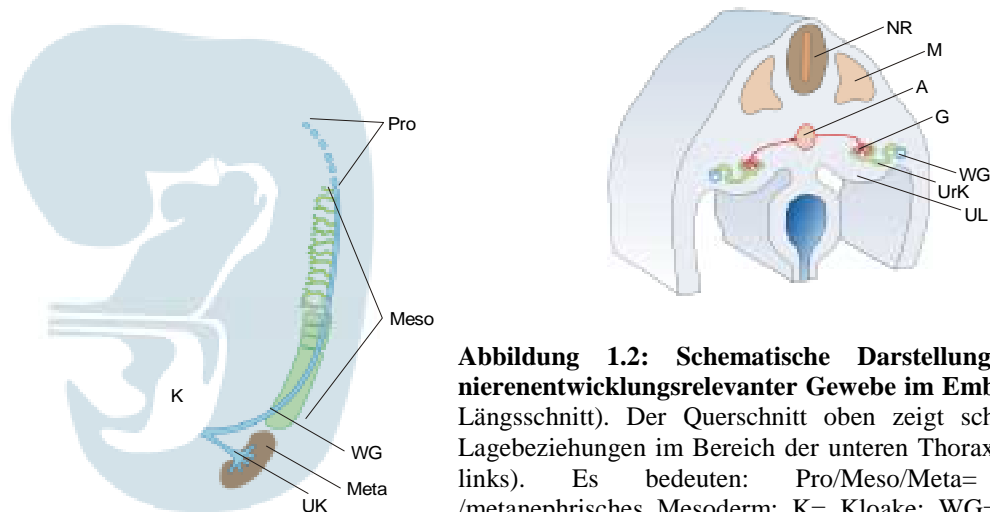


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der Lage nierentwicklungsrelevanter Gewebe im Embryo (links im Längsschnitt). Der Querschnitt oben zeigt schematisch die Lagebeziehungen im Bereich der unteren Thoraxregion (Meso links). Es bedeuten: Pro/Meso/Meta= pro-/meso-/metanephritisches Mesoderm; K= Kloake; WG= Wolff'scher Gang; UK= Ureterknospe; UL= Urogenitaleiste; UrK= Urnierenkanälchen; G= Glomerulus; A= Aorta; M= Myotom; NR= Neuralrohr. Einzelheiten s. Text.

Der *Metanephros* entwickelt sich ab der 5. Schwangerschaftswoche aus der Interaktion zweier Gewebe: dem Epithelgewebe der Ureterknospe (sie wächst vom caudalen Abschnitt des Wolff'schen Ganges nach dorsal und cranial aus) und dem metanephrischen Mesenchym (MM; Mesenchym= embryonales Bindegewebe) der Sakralsegmente (vgl. Abb. 1.3 A: Induktion). Mit dem Einwachsen der Ureterknospe in die Zellen des MM verdichten sich diese zu Zellhaufen (vgl. Abb. 1.3 B: Kondensation), die schließlich charakteristisch geformte Hohlräume umgeben (Komma- bzw. S-förmige Vesikel; vgl. Abb. 1.3 C und D: Vesikularisierung, Komma-förmige Vesikel). Dabei vollziehen die Zellen des MM einen für die Nierenentwicklung charakteristischen und entscheidenden Mesenchym-Epithel-Übergang. Mit der Fortdauer der Metanephrogenese verlängern sich die Vesikel zu Schleifen (Tubuli; vgl. Abb. 1.3 E: Elongation). Der mit der Ureterknospe in Kontakt stehende Schenkel der Tubuli gewinnt Anschluss an das Sammelrohrsystem der Niere (die Sammelrohre sind Differenzierungsprodukte des Gewebes der Ureterknospe), während das proximale Ende der Tubuli die Bowman'sche Kapsel bildet. Zusammen mit einwachsenden Blutgefäßen, die im Bereich der Bowman'schen Kapsel ein Gefäßknäuel (*Glomerulus*) bilden, entsteht so die funktionelle Grundbaueinheit der Niere, das Nephron (vgl. Abb. 1.3 F: Reifung). Es besteht aus Bowman'scher Kapsel (mit Blutgefäß), proximalem Tubulus (*Tubulus proximalis*), Henle'scher Schleife (*Tubulus intermedius*), distalem Tubulus (*Tubulus distalis*) und Verbindungstubulus (*Tubulus reuniens*) (vgl. Abb. 1.3 G: Nephron).

Die Nephronenreubildung erfolgt beim menschlichen Embryo bis zur 36. Schwangerschaftswoche. Während des letzten Schwangerschaftsmonats werden keine

neuen Nephrene gebildet, sondern die Nephrene differenzieren sich (Längenwachstum der Tubulusabschnitte).

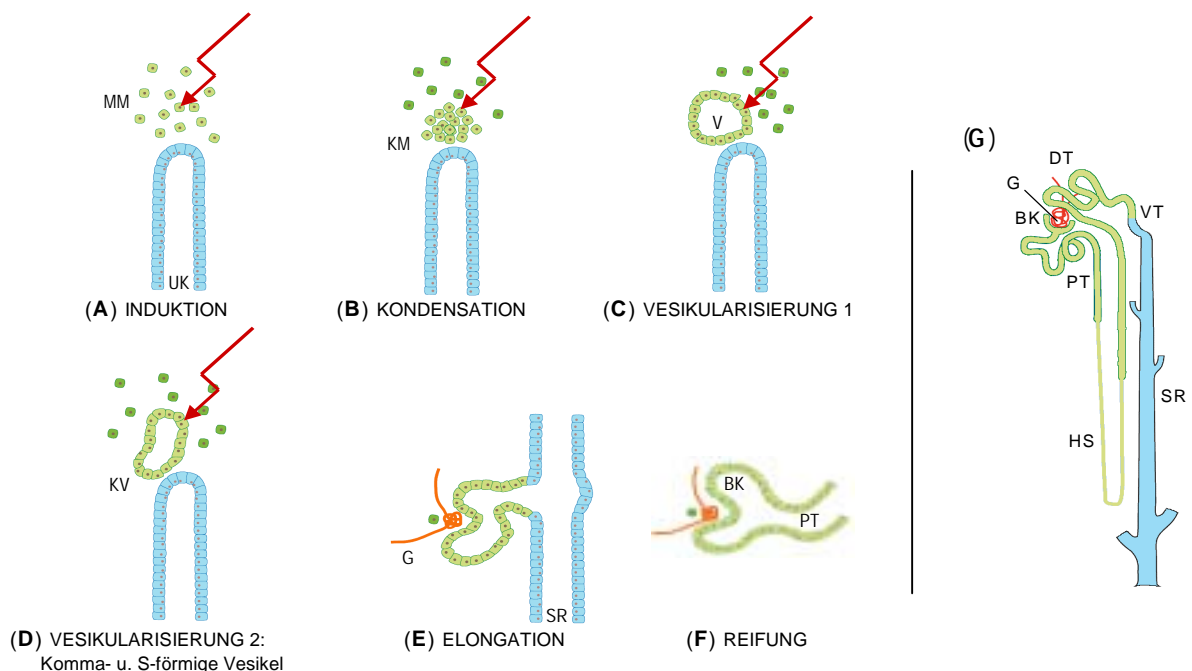


Abbildung 1.3 (A-F): Schematische Darstellung der Metanephrogenese auf zellulärer Ebene (nach Reddy und Licht, 1996, verändert). Auf die Darstellung der mit der Induktionsphase ebenfalls einsetzenden Verzweigungsschritte der Ureterknospe wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit verzichtet. Einzelheiten siehe Text. Abkömmlinge des MM sind in grüner Farbe, Abkömmlinge der UK in blauer Farbe dargestellt. Rote Pfeile symbolisieren fehlerhafte Prozesse während der Metanephrogenese, die zu WT's führen können. Dabei ist es vermutlich so, dass der Zeitpunkt, zu dem diese Fehler auftreten, mit ausschlaggebend für die Histologie des Nephroblastoms (vornehmlich epithelial, stromal oder blastemisch) ist (vgl. Kap. 1.2.1) Die Abkürzungen bedeuten: UK= Ureterknospe; MM= metanephrisches Mesenchym; KM= kondensiertes Mesenchym; V:= Vesikel; KV= Komma-förmiger Vesikel; G= Glomerulus; SR= Sammelrohr; BK= Bowman'sche Kapsel; PT= proximaler Tubulus.

(G; rechts): Schematische Darstellung eines Nephrons. Die Farben zur Darstellung der Gewebeherkunft der einzelnen Strukturen wurden beibehalten. Zusätzliche Abkürzungen sind: HS= Henle'sche Schleife; DT= distaler Tubulus; VT= Verbindungstubulus. Einzelheiten s. Text.

1.2.3 Molekulare Aspekte der Nierenentwicklung

Einige der Gene/Genprodukte, die während der wechselseitigen Induktionsprozesse der Metanephrogenese eine Rolle spielen, wurden in der Vergangenheit identifiziert und ihre Funktion z. T. charakterisiert (u.a. in Gewebekulturexperimenten bzw. mit Hilfe von *knock out*-Mäusen). Im folgenden soll ein kurzer Überblick über einige der offenbar entscheidenden Gene der Metanephrogenese gegeben werden. Übersichtsartikel, die sich detailliert mit den molekularen Grundlagen der Nierenentwicklung befassen, sind Vainio und Müller (1997), Lipschutz (1998), Piscione und Rosenblum (1999) und Burrow (2000).

Die Metanephrogenese beginnt mit der Induktion der Bildung der Ureterknospe durch das MM. Ein Kandidat für dieses initiale Signal ist das Peptidhormon GDNF (*glial cell derived neurotrophic factor*), das vor der Ausknospung des Ureters von Zellen des MM exprimiert wird (Pichel *et al.*, 1996). Der Rezeptor auf Ureterseite ist ein Heterodimer, bestehend aus der Rezeptor-Tyrosinkinase c-RET und einem Corezeptorprotein, GFR α 1 (GDNF-Rezeptor α 1). Die essenzielle Rolle von GDNF und c-RET in der Nierenentwicklung, insbesondere ihre Interaktion, konnte im Rahmen von *knock out*-Experimenten in Mäusen demonstriert werden. Hier zeigte sich eine sehr starke phänotypische Ähnlichkeit von *Gdnf*- und *c-Ret knock out*-Mäusen. Beide k.o.-Tiere besitzen keine Nieren, was sich darauf zurückführen lässt, dass die Ureterknospe nicht auswächst (Sanchez *et al.*, 1996; Schuchardt *et al.*, 1994, 1996). Ein weiteres MM-Signal stellt vermutlich das Transmembranprotein Integrin α 8 β 1 dar, das in zur auswachsenden Ureterknospe benachbarten Zellen des MM exprimiert wird. Die wichtige Rolle dieses Integrins wird durch eine Störung der Ureterentwicklung in Mäusen ohne funktionelles α 8 β 1 Integrin verdeutlicht (Müller *et al.*, 1997).

Nach der Induktion des Ureterepithels durch das MM erfolgt auf Seiten des Ureters ebenfalls die Expression von Signalmolekülen, die in der Folge die Proliferation, Differenzierung bzw. Apoptose von Zellen des MM regulieren. Bleiben diese Signale aus, so kommt es auf Seiten des MM zur Apoptose und die Metanephrogenese unterbleibt (Koseki *et al.*, 1992; Coles *et al.*, 1993; Camp und Martin, 1996). Proteine, die an der Induktion des MMs beteiligt sind, sind EGF (*epidermal growth factor*), FGF-2 (*fibroblast growth factor 2*), BMP-7 (*bone morphogenetic protein 7*) LIF (*leukemia inhibitory factor*) und WNT-11 (*wingless-type MMTV integration site family, member 11*). Dabei scheinen BMP-7 und FGF-2 nicht zur Induktion beizutragen, sondern vielmehr die Apoptose der MM-Zellen zu verhindern und diese in einem „induzierbaren Zustand“ zu halten (Dudley *et al.*, 1999). Diese Vermutung wird durch Organkultur-Experimente bestätigt, in denen BMP-7 und FGF-2 in synergistischer Weise die Tubuligenese (also die Vorgänge in den Phasen (C) bis (E) in Abb. 1.3) unterdrücken (Dudley *et al.*, 1999). Auch EGF konnte bisher nur eine Rolle als „Überlebenssignal“ für die Zellen des metanephrischen Blastems zugewiesen werden. Seine Funktion als mitogener Stimulator des MMs bei gleichzeitiger Reduktion der apoptotischen Vorgänge zum Zweck der Expansion der Zahl metanephrogener Stammzellen ist nachgewiesen (Coles *et al.*, 1993). Die Rolle des eigentlichen Induktors des Mesenchym-Epithel-Übergangs kommt ihm vermutlich nicht zu, ganz im Gegenteil zu dem IL6-ähnlichen Zytokin LIF. So konnte gezeigt werden, dass

es von Zellen der Ureterknospe genau zu dem Zeitpunkt exprimiert wird, da sie (die Ureterknospe) in das MM einwächst. Außerdem ist rekombinantes LIF in der Lage, den Mesenchym-Epithel-Übergang metanephrischer Blastemzellen in Organkulturen zu induzieren (Barasch *et al.*, 1999). Neben LIF wohl beste Kandidat für den Induktor der eigentlichen Epithelialisierung und Tubuligenese des MMs ist WNT-11, dessen räumliches und zeitliches Expressionsmuster (Expression in den Zellen der Spitze der Ureterknospe nach deren erstem Auftreten) für diese Einordnung spricht (Kispert *et al.*, 1996). Funktionell wird diese Einordnung durch die Tatsache unterstrichen, dass die WNT-Signaltransduktionskaskade durch Lithium aktiviert werden kann (Klein und Melton, 1996). Da Lithium als artifizieller Induktor der Epithelialisierung des MMs in Organkulturen beschrieben ist (Davies und Garrod, 1995), besteht somit ein direkter funktioneller Zusammenhang zwischen der WNT-Signaltransduktion und der Induktion des MMs.

Die Induktion durch die Ureterknospe führt dazu, daß das Mesenchym in (mindestens) zwei unterschiedliche Zellpopulationen geteilt wird (Musterbildung, engl. *patterning*; Vainio und Müller, 1997). Dabei handelt es sich um eine Population, die sich in unmittelbarem Kontakt mit den Zellen des Ureterepithels befindet und aus deren Zellen die Nierentubuli hervorgehen. Zellen dieser induzierten MM-Population sind es also, die den für die Metanephrogenese so entscheidenden Mesenchym-Epithel-Übergang vollziehen (molekulare Marker dieser Zellen sind PAX-2, Syndecan-1 und WNT-4). Die zweite Population besteht aus Zellen stromaler Morphologie, die an die Zellen der späteren Tubuli angrenzend lokalisiert sind (also das Nierenstroma bilden) und die als molekulare Marker den Transkriptionsfaktor BF-2 exprimieren. Neben der initialen Induktion des metanephrischen Mesenchyms durch die Zellen der Ureterknospe sind für die Tubuligenese zusätzlich Signale von Zellen der „stromalen“ und der „epithelialen“ Zellpopulation notwendig (para- und autokrine Signale). So ist die Bildung der epithelialen Nierentubuli in Mäusen mit inaktiviertem *Bf-2* gestört (Hatini *et al.*, 1996; Bard, 1996), und in *Wnt-4 knock out*-Mäusen bildet sich zwar die Ureterknospe, allerdings werden keine Nierentubuli durch das metanephrische Mesenchym gebildet (Stark *et al.*, 1994).

Reguliert wird die Expression oben genannter Signale beider Seiten durch Transkriptionsfaktoren. Ein Kandidat für die frühen Regulationsprozesse auf Transkriptionsebene (transkriptionelle Aktivierung des Signals) ist auf Seite des MMs das WT1-Protein (vgl. hierzu auch Kap. 1.3). Wie GDNF wird WT1 schon im nicht-induzierten MM exprimiert und seine essenzielle Rolle bei der Induktion des Auswachsens

der Ureterknospe wird in *WT1* k.o.-Mäusen unterstrichen, denn dieser Prozess unterbleibt in Tieren ohne funktionelles WT1, so dass keine Nieren angelegt werden (Kreidberg *et al.*, 1993). Ein Kandidat für die frühe Transkriptionsregulation auf Seiten der Epithelzellen der Ureterknospe ist der Transkriptionsfaktor EMX2. So kann in *Emx2* k.o.-Mäusen die Bildung der Ureterknospe und ihr Einwachsen ins MM beobachtet werden, allerdings kommt die Metanephrogenese im Anschluss zum Stillstand, so dass keine Nieren angelegt werden (Miyamoto *et al.*, 1997). Da diese Tiere eine normale *Wt1*-, *Gdnf*- und *c-Ret*-Expression aufweisen, scheint *Emx2* hier für die Verarbeitung des induktiven Signals (vermutl. *Gdnf*, s.o.) der MM-Zellen verantwortlich zu sein, das in der Folge zur Expression des induktiven Uretersignals an die MM-Zellen führt (Vainio und Müller, 1997).

Die geschilderten Vorgänge sind in Abbildung 1.4 schematisch zusammengefasst.

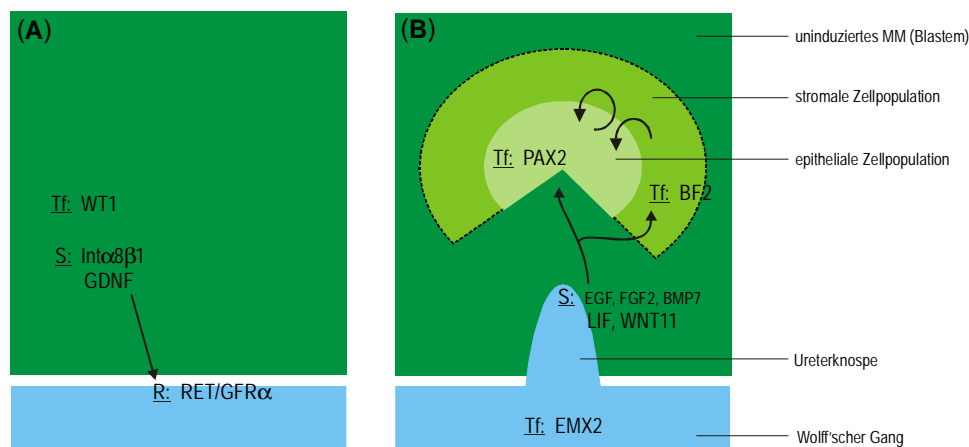


Abbildung 1.4: Molekulare Vorgänge während der reziproken Induktion von Ureterknospe und metanephrischem Mesenchym. (A) Das erste Signal (Pfeil) geht vermutlich vom uninduzierten metanephrischen Blastem (dunkelgrün) aus und bewirkt das Auswachsen der UK aus dem Wolff'schen Gang (blau). (B) Durch das Einwachsen der Ureterknospe in das MM wird dieses induziert und in (mindestens) zwei Zellpopulationen, eine epitheliale (hellgrün) und eine stromale (mittelgrün), aufgeteilt. Neben den induktiven Signalen durch die UK sind für die Tubuligenese zusätzlich para- und autokrine Signale (durch Pfeile angedeutet) notwendig. Tf:= Transkriptionsfaktor; S:= Signal (sezernierte Proteine oder Proteine der extrazellulären Matrix); R:= Rezeptor. Einzelheiten s. Text.

1.3 Das *WT1*-Gen in der Urogenitalentwicklung und Wilmstumorgengese

Das einzige bisher identifizierte Wilmstumorgen ist das *WT1*-Gen. Lokalisiert in der chromosomalen Region 11p13 wurde es 1990 von zwei verschiedenen Gruppen im Rahmen positioneller Klonierungsansätze an Wilmstumor-DNA aus WAGR-Patienten (vgl. Kap. 1.2.1 und 1.3.1) isoliert und initial charakterisiert (Call *et al.*, 1990; Gessler *et*

al., 1990). Die funktionelle Inaktivierung durch Mutationen in WTs kombiniert mit seiner zentralen Rolle während der Metanephrogenese (vgl. Kap. 1.2.2) verdeutlichen den schon aus der WT-Histologie und WT-Pathogenese ableitbaren Zusammenhang zwischen Nierenentwicklung und Wilmstumorgenese.

Das *WT1*-Gen umfasst zehn Exons (vgl. Abb. 1.5). Durch alternatives Spleißen sind vier verschiedene mRNA-Formen möglich, deren Mengenverhältnis innerhalb der verschiedenen *WT1*-Expressionsorte (s.u.) konstant ist (Haber *et al.*, 1991). Ihre Dysregulation, d.h. die Veränderung des Mengenverhältnisses der verschiedenen *WT1*-Isoformen untereinander, wurde bereits mit der Bildung von WTs und der Entstehung des Frasier-Syndroms in Verbindung gebracht (Liu *et al.*, 1999; Barbaux *et al.*, 1997; vgl. Kap. 1.3.1). Bei den alternativ gepleißten Bereichen handelt es sich um Exon 5, das für 17 Aminosäuren codiert, und um eine alternative Spleiß-Donorstelle am 3'-Ende von Exon 9, deren alternative Nutzung zur An- oder Abwesenheit von drei Aminosäuren (Lysin [K], Threonin [T], Serin [S]) in den verschiedenen Proteinisoformen führt (Haber *et al.*, 1991). Während Exon 5 bisher keine spezifische Funktion zugeschrieben werden kann, scheinen die alternativ in den Isoformen auftretenden KTS-Aminosäuren mit den verschiedenen Funktionen der WT1-Proteine als Transkriptionsfaktor (Isoformen ohne KTS-Insertion) bzw. als RNA-bindendes Protein (Isoformen mit KTS-Insertion) zu korrelieren (s.u.). Abbildung 1.5 (folgende Seite) zeigt schematisch die mRNA- und Proteinstruktur von WT1, die möglichen Proteinisoformen und gibt einen Überblick über die funktionellen Domänen von WT1, die bisher identifiziert wurden.

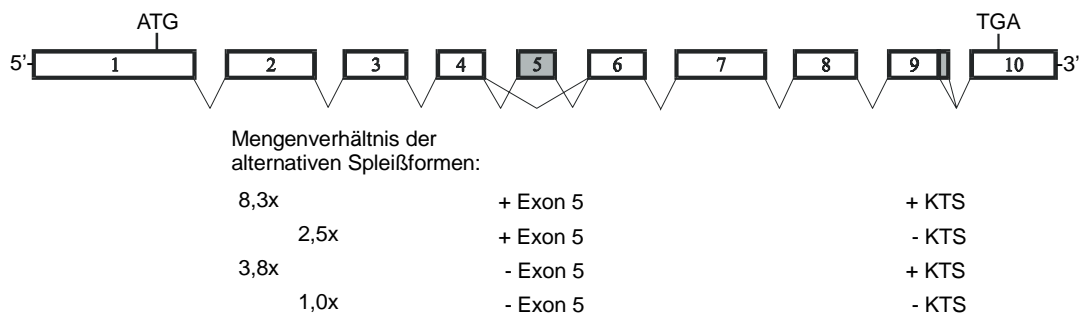
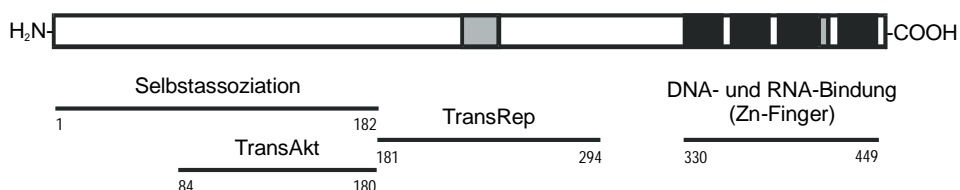
mRNA:**Protein:**

Abbildung 1.5: Schematische Darstellung der mRNA- und Proteinstruktur von WT1. Der obere Teil der Abbildung zeigt die Exonstruktur der mRNA(s) von *WT1*. Alternativ gespleißte Exons bzw. Exonbereiche sind grau hervorgehoben. Start- (ATG) und Stop (TGA)-Codon sind dargestellt. Durch Kombination der verschiedenen alternativen Spleißvorgänge sind somit vier verschiedene mRNA-Varianten von *WT1* möglich, die physiologisch immer in konstanten Mengenverhältnissen exprimiert werden (im Mittelteil der Abbildung dargestellt). Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde auf die Darstellung eines alternativen Translationsstarts (CTG) 204 bp stromaufwärts des eingezeichneten ATG verzichtet (Brüning und Pelletier, 1996). Gemeinsam mit einem ebenfalls in der Abbildung nicht dargestellten RNA-editing Schritt (Davies *et al.*, 1999) sind somit 16 verschiedene Proteinisoformen von *WT1* möglich (Molekulargewicht zwischen 47 und 56 kDa), von denen eine im unteren Teil der Abbildung dargestellt ist. Verschiedenen Domänen zugeordnete Funktionen von *WT1* sind am unteren Bildrand eingezeichnet. Dabei entsprechen die Ziffern der Aminosäureposition innerhalb der gezeigten *WT1*-Isoform mit Exon 5 und mit der KTS-Aminosäureinsertion. TransAkt: Domäne zur transkriptionellen Aktivierung; TransRep: Domäne zur transkriptionellen Repression. Die vier Zink(Zn)-Finger vom Cys₂-His₂-Typ sind als schwarze Rechtecke dargestellt. Man beachte die Verschiebung des Abstandes zwischen Zn-Finger drei und vier durch die An- bzw. Abwesenheit der KTS-Insertion (Einzelheiten s. Text).

WT1-Transkripte finden sich im Mesonephros und im Metanephros (vgl. Kap. 1.2.3). Hier wird *WT1* schon vor den ersten Induktionsvorgängen im MM schwach exprimiert und ist vermutlich an der transkriptionellen Regulation des initialen MM-Signals für die Bildung der Ureterknospe beteiligt. Nach der Induktion der Ureterknospe erfolgt die transkriptionelle Stimulation der *WT1*-Expression im kondensierenden MM und in den epithelialen Zellen der daraus entstehenden vesikulären Strukturen, den Komma- und S-förmigen Vesikeln (vgl. Abb. 1.3 in Kap. 1.2.2). Nach Abschluss der Metanephrogenese verschwindet die *WT1*-Expression in den Zellen der nun ausgereiften Nephronen mit ihren tubulären Strukturen. Lediglich in den Filtrationszellen der Bowman'schen Kapsel, den Podozyten, bleibt die hohe Expression erhalten (Pelletier *et al.*, 1991; Rackley *et al.*, 1993; Mundlos *et al.*, 1993; Little *et al.*, 1999). Weitere Orte der *WT1*-Expression während der Embryonalentwicklung sind die Zellen der Genitalleisten im indifferenten

Gonadenstadium (sie befinden sich im medialen Teil der Urogenitalleisten), die epithelialen Zellen, die die primitive Leibeshöhle auskleiden (Perikard, Mesothel), die Milz, spezielle Neurone des Rückenmarks und Zellen des Sklerotoms (das Anlagenmaterial der Wirbel, das aus medial gelegenen Zellen der Somiten entsteht). Hier finden sich nach Abschluss der Embryonalentwicklung *WT1*-Transkripte nur noch in den Sertoli-Zellen beim Mann bzw. in den Granulosazellen und im Uterus bei der Frau (Übersichtsartikel: Little *et al.*, 1999).

Die Bedeutung von *WT1* für die Entwicklung des Urogenitaltraktes von Säugern wird besonders deutlich in *WT1*^{-/-}-Mäusen. So führt die konstitutionelle Deletion beider Allele dazu, dass weder Genitalien noch Nieren ausgebildet werden und die Tiere abhängig vom genetischen Hintergrund zwischen Tag 13 und 15 der Embryonalentwicklung (Kreidberg *et al.*, 1993) bzw. direkt nach der Geburt (C. Englert, persönliche Mitteilung) sterben. Dabei sind die eigentlichen Gründe für den frühen Tod der Tiere weitgehend unklar. Herzfehler und Zwerchfeldefekte der Tiere (resultierend aus der fehlenden *WT1*-Expression in Perikard bzw. Mesothel) oder aber die fehlende Milz und damit einhergehend eine gestörte Hämatopoese (C. Englert, persönl. Mitteilung) werden als Ursache diskutiert.

Das WT1-Protein weist im Carboxyterminus vier Zink-Finger vom Cys₂-His₂-Typ auf (vgl. Abb. 1.5). Aufgrund dieses Strukturmerkmals wird WT1 funktionell als Transkriptionsfaktor mit DNA-bindenden Eigenschaften eingeordnet. Entsprechend dieser Funktion als transkriptioneller Regulator (sowohl als Aktivator wie auch als Repressor, vgl. Abb. 1.5; Wang *et al.*, 1993) konnten im Rahmen zahlreicher Reporteranalysen und *in vitro*-Bindungsstudien und kürzlich auch Expressionsprofilanalysen mit induzierbaren *WT1*-Expressionskonstrukten potenzielle WT1-Zielgene identifiziert werden. In dieser Gruppe WT1-regulierter Gene finden sich Wachstumsfaktorrezeptoren (wie z.B. der EGF-Rezeptor), Wachstumsfaktoren (z.B. IGF2 [*insuline-like growth factor 2*]), Transkriptionsfaktoren (darunter PAX2 und WT1 selbst), Komponenten der extrazellulären Matrix (Syndecan), Zelladhäsionsmoleküle (E-Cadherin) und andere Gene (vgl. Tabelle 1.1). Die Fülle der verschiedenen putativen WT1-Zielgene zeigt die Vernetzung der WT1-Funktion mit unterschiedlichen physiologischen Prozessen, wie z. B. der zellulären Proliferation und der Differenzierung, auf unterschiedlichen Ebenen.

Tabelle 1.1: Liste putativer WT1-Zielgene (nach Little *et al.*, 1999; aktualisiert).Wachstumsfaktoren:

IGF2 (Ward *et al.*, 1995)
 PDGF-A (Wang *et al.*, 1992)
 TGF- β 1 (Dey *et al.*, 1994)
 CSF-1 (Harrington *et al.*, 1993)
 Inhibin- α (Hsu *et al.*, 1995)
 Amphiregulin (Lee *et al.*, 1999)

Transkriptionsfaktoren:

WT1 (Rupprecht *et al.*, 1994)
 EGR1 (Wang *et al.*, 1993)
 PAX2 (Ryan *et al.*, 1995)
 c-MYB (McCann *et al.*, 1995)
 c-MYC (Hewitt *et al.*, 1995)
 BCL-2 (Hewitt *et al.*, 1995)
 MYOD (Miyagawa *et al.*, 1998)
 TCF2 (vgl. Kap. 3.2.5 und 4.3.3)

Wachstumsfaktorrezeptoren:

IGF1R (Werner *et al.*, 1994)
 EGFR (Englert *et al.*, 1995)
 RAR α (Goodyer *et al.*, 1995)
 Insulin R (Webster *et al.*, 1997)

Zelladhäsion u. extrazelluläre Matrix:

Syndecan-1 (Cook *et al.*, 1996)
 E-Cadherin (Hosono *et al.*, 2000)

andere:

Midkine (Adachi *et al.*, 1996)
 ODC (Moshier *et al.*, 1996)
 NOVH (Martinerie *et al.*, 1996)
 G α i-2 (Kinane *et al.*, 1996)
 p21 (Englert *et al.*, 1997)
 DAX-1 (Nachtigal *et al.*, 1998)
 Telomerase (Oh *et al.*, 1999)

Aufgrund der unterschiedlichen verwendeten zellulären Systeme für die Reporteranalysen und wegen der zumeist selektiven Betrachtung/Überexpression einer bestimmten WT1-Isoform im Rahmen der Studien ist die Relevanz der beobachteten Regulationsprozesse z. T. fraglich und ihre Interpretation schwierig. Unter den identifizierten putativen WT1-Zielgenen sind jedoch einige, deren regulierte Expression im Rahmen der Metanephrogenese und/oder der Genitalentwicklung *in vivo* nachgewiesen wurde und die als physiologische WT1-Zielgene in Frage kommen. So ist z.B. die Repression von PAX2 durch WT1 während der Metanephrogenese vermutlich mitentscheidend für die Differenzierungsvorgänge während der Epithelialisierung des MMs. Ferner scheint die Regulation des *DAX-1* Gens durch WT1 (zusammen mit SF1 bzw. Par-4) essenziell für die männliche Geschlechtsentwicklung zu sein (Nachtigal *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 1999).

Neben der Funktion als transkriptioneller Regulator wird WT1 auch eine posttranskriptionelle Regulation verschiedener Gene zugeschrieben. Für eine solche Einordnung von WT1 spricht die Affinität von WT1-Isoformen mit der KTS-Insertion zu RNA, die z.B. für die Assoziation zwischen WT1+KTS und *IGF2*-Transkripten beobachtet wurde (Caricasole *et al.*, 1996). Dabei scheint die erhöhte Affinität zu RNA aus dem Vorliegen der drei inserierten Aminosäuren zu resultieren, die zu einer Veränderung des Abstandes zwischen Zn-Finger Nr. drei und Zn-Finger Nr. vier im Carboxylterminus des Proteins führt (vgl. Abb. 1.5). Unterstützt wird die Klassifizierung von WT1+KTS als RNA-bindendes Protein durch die präferenzielle Lokalisation der verschiedenen Isoformen

in bestimmten Regionen des Zellkerns. So findet man die WT1-Isoformen mit KTS-Insertion hauptsächlich in nukleären Bereichen, die mit Spleißvorgängen assoziiert sind (Lokalisation in *speckles*; Larsson *et al.*, 1995). Im Gegensatz dazu findet man die WT1-KTS-Varianten vornehmlich in Domänen des Kernkompartiments, in denen auch andere Zink-Finger-Transkriptionsfaktoren, wie SP1, PAX6 und TFIIB lokalisiert sind (Larsson *et al.*, 1995). Darüber hinaus konnten für die +KTS-Isoformen direkte Protein-Protein-Wechselwirkungen mit dem Protein U2AF65, einem konstitutiven Protein des Spleißosoms, nachgewiesen werden (Davis *et al.*, 1998). Neben diesen funktionellen Beobachtungen spricht das Vorliegen eines von *Xenopus laevis* bis zum Menschen konservierten RNA-Erkennungsmotivs in der aminoterminalen Hälfte des WT1-Proteins für die RNA-bindende Funktion zumindest einiger Proteinisoformen (Kennedy *et al.*, 1996).

Neben der Identifikation von WT1-Zielgenen ist die transkriptionelle Regulation der *WT1*-Expression selbst entscheidend für das Verständnis der Abläufe während Nierenentwicklung und der Pathogenese des Nephroblastoms. Im Gegensatz zu klassischen Tumorsuppressorgenen, wie z.B. dem *RB*- und dem *P53*-Gen, die eine ubiquitäre Expression aufweisen, zeigt das Expressionsmuster von *WT1* eine ausgeprägte Zelltyp- bzw. Gewebespezifität (s.o.; Reddy und Licht, 1996). Bisherige Untersuchungen beschränken sich vornehmlich auf Reporteranalysen mit 5'-regulatorischen Sequenzen des *WT1*-Gens, die zur Identifikation einer Reihe von Faktoren geführt haben, die u.a. in Nierenentwicklung und auch Hämatopoese die Transkriptionskontrolle von *WT1* übernehmen (könnten). Darunter befinden sich Transkriptionsfaktoren, wie das ubiquitär exprimierte SP1-Protein (Hofmann *et al.*, 1993; Cohen *et al.*, 1997), die nierenspezifisch exprimierten Transkriptionsfaktoren PAX2 und PAX8 (Dehbi *et al.*, 1996; Dehbi und Pelletier, 1996), das WT1-Protein selbst (Rupprecht *et al.*, 1994), sowie auch die in der Hämatopoese involvierten GATA-Transkriptionsfaktoren und c-MYB (Zhang *et al.*, 1997). Ferner wird die Regulation der *WT1*-Expression durch *antisense*-Transkription diskutiert (Huang *et al.*, 1990; Campbell *et al.*, 1994). Eine ausführliche Darstellung der transkriptionellen Regulation von *WT1* durch diese und weitere Faktoren findet sich im Rahmen der Diskussion in Kapitel 4.1 dieser Arbeit.

1.3.1 *WT1*-Mutationen und Expression in *WT1*-assoziierten Erkrankungen

Chromosomale Aberrationen und Mutationen, die den *WT1*-Genlocus betreffen, finden sich neben WTs in verschiedenen Krankheitssyndromen, die sich allesamt durch Fehlbildungen des Urogenitaltraktes auszeichnen. Entsprechend weisen WAGR-Patienten

(die Urogenitalfehlbildungen zeigen sich hier insbesondere bei männlichen Patienten durch Kryptorchismus [Bauchhoden] und Hypospadie [Fehlmündung der Harnröhre]) den konstitutionellen (d.h. bereits in der Keimbahn auftretenden) heterozygoten Verlust eines *WT1*-Allels auf. Offensichtlich ist in diesen Patienten die *WT1*-Gendosis entscheidend für die Entstehung des Krankheitssyndroms, so dass die Expression vom verbliebenen Allel keine normale Urogenitalentwicklung gewährleisten kann (Haploinsuffizienz). Patienten, die vom DDS betroffen sind, zeigen schwerwiegendere Urogenitaldefekte als WAGR-Patienten (Nierenversagen im Kindesalter und XY Pseudohermaphroditismus bzw. intersexuelle Genitale). Spezifische konstitutionelle Punktmutationen im *WT1*-Gen betreffen in 92% der DDS-Fälle die Zink-Finger-Region und führen vermutlich zum Verlust der DNA-bindenden Eigenschaften des WT1-Proteins unter Beibehaltung der Fähigkeit zur Selbstassoziation (Little und Wells, 1997). Mittels *in vitro*-Untersuchungen zur Definition einer Proteindomäne für die Selbstassoziation (Reddy *et al.*, 1995) und durch Vergleich von *WT1*-Mutationen in DDS-Patienten mit konstitutionellen *WT1*-Mutationen in nicht-DDS-Patienten wurde ein Modell entwickelt, das die klinisch unterschiedlichen Manifestationen der Syndrome bei ähnlichem Genotyp (heterozygote WT1-Inaktivierung) zu erklären versucht. Nach diesem Modell führen die *WT1*-Mutationen in DDS-Patienten zur Expression von funktionslosem WT1-Protein. Durch die Interaktion mit funktionellem WT1-Protein (exprimiert vom unveränderten *WT1*-Allel) über die Selbstassoziationsdomäne (vgl. Abb. 1.5 in Kap. 1.3) wird dieses funktionell inaktiviert (man spricht von einem dominant-negativen Effekt des mutierten WT1) (Little *et al.*, 1993; Moffett *et al.*, 1995). Somit liegt bei DDS-Patienten nicht lediglich eine Haploinsuffizienz bezüglich des *WT1*-Gens vor, sondern funktionell sind beide Allele von der Mutation betroffen, was sich in einer gravierenderen phänotypischen Ausprägung manifestiert. Ein weiteres Syndrom, bei dem betroffene Patienten Träger konstitutioneller *WT1*-Mutationen sind, ist das Frasier-Syndrom. Patienten mit dem Frasier-Syndrom weisen Nierenerkrankungen auf, die später zu Nierenversagen führen können, zeigen XY-Gonadenfehlbildungen und ein erhöhtes Gonadoblastomrisiko. Hier konnten Punktmutationen in Intron neun des *WT1*-Gens nachgewiesen werden, die funktionell zu einer Verschiebung der normalerweise konstanten Mengenverhältnisse der *WT1*-Spleißformen führen (Barboux *et al.*, 1997; Klamt *et al.*, 1998). Abbildung 1.6 (folgende Seite) stellt Art und Position der *WT1*-Veränderungen in den angesprochenen Krankheitsbildern schematisch dar.

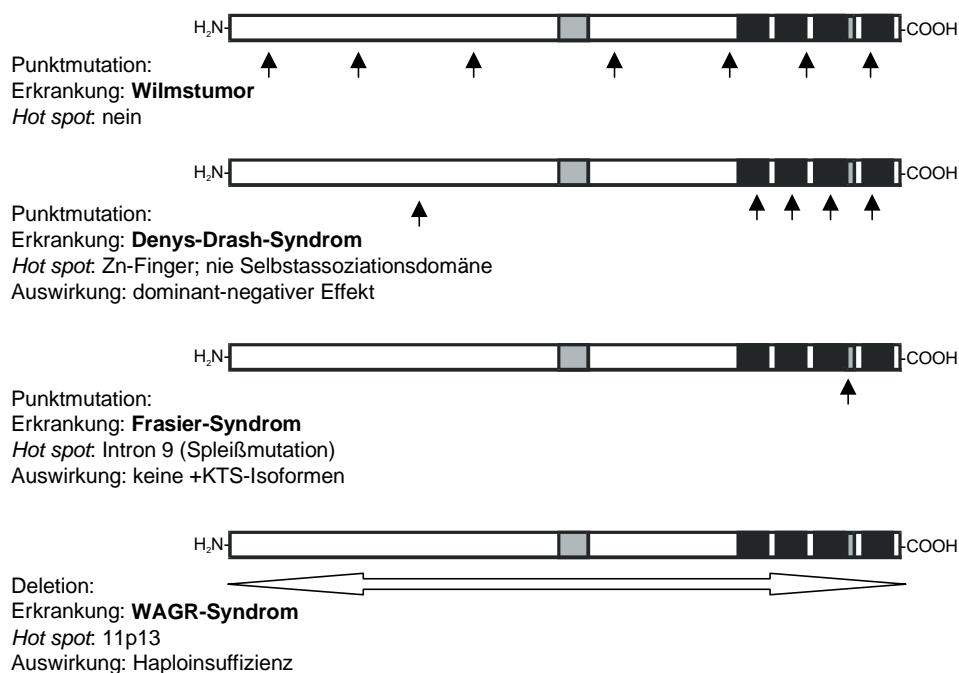


Abbildung 1.6: Genotyp-Phänotyp-Korrelation von WT1-Veränderung und assoziierten Erkrankungen. Das WT1-Genprodukt (+Exon5/+KTS-Isoform; vgl. Abb. 1.5) ist schematisch dargestellt. Punktmutationen sind als vertikale Pfeile, die Deletion von *WT1* als horizontaler Doppelpfeil symbolisiert. Man beachte: Die relative Lage der Punktmutationen ist für die jeweiligen Erkrankungen charakteristisch (Einzelheiten s. Text).

Neben *WT1*-Mutationen in den genannten Krankheitssyndromen finden sich Mutationen in ca. 10% der untersuchten Wilms-Tumorgewebe (vgl. Kap. 1.2.1), wobei hier keine statistische Häufung an bestimmten Stellen innerhalb des Gens, wie z.B. beim DDS oder Frasier-Syndrom, festgestellt werden kann (vgl. Abb. 1.6; Little und Wells, 1997). Allerdings wurde eine Korrelation von *WT1*-Mutationen mit dem stromalen Subtyp des WTs beobachtet (Schumacher *et al.*, 1997). Weitere Malignome mit assoziierten *WT1*-Mutationen sind das Mesotheliom (Park *et al.*, 1993b), das Gonadoblastom (als Bestandteil des Frasier-Syndroms; Klamt *et al.*, 1998), der desmoplastische Klein/Rundzell-Tumor (Ladanyi und Gerald, 1994) sowie die akute myeloische Leukämie (Pritchard-Jones *et al.*, 1994; King-Underwood *et al.*, 1996).

Die genannten Beispiele für *WT1*-Mutationen in Malignomen unterstreichen die Funktion von WT1 als Tumorsuppressorprotein. Es werden allerdings auch Berichte gefunden, nach denen WT1 eher eine onkogene Wirkung auf Zellen zu haben scheint. So führt die funktionelle Inaktivierung von endogenem *WT1* durch *antisense*-Oligonukleotide in verschiedenen Zelllinien solider Tumoren zu einer Verminderung der Proliferation dieser Tumorzelllinien (Oji *et al.*, 1999). Ebenso wird in einer ganzen Reihe von WTs

vornehmlich epithelialer und blastemischer Histologie eine starke *WT1*-Expression beobachtet (Miwa *et al.*, 1992; Dipl. Biol. G. Klemm, persönliche Mitteilung). Für diese WT-Subtypen stellt sich allerdings die Frage, inwieweit die Hochregulation der *WT1*-Expression ursächlich am Tumorgeneseprozess beteiligt ist, oder ob die erhöhte Transkriptionsrate nicht vielmehr ein Zeichen für den Differenzierungsgrad der Tumorzellen (induziertes, jedoch nicht ausdifferenziertes MM) darstellt (Miwa *et al.*, 1992; Reddy und Licht, 1996). Eine signifikante *WT1*-Expression ist ebenfalls für verschiedene Leukämieerkrankungen beschrieben (Bergmann *et al.*, 1997 in Little 99). Mit Hilfe von *antisense*-Experimenten konnte hier gezeigt werden, dass die Inaktivierung von WT1 zur Differenzierung der Zellen bzw. zur Apoptose führen kann (Algar *et al.*, 1996; Yamagami *et al.*, 1998), was die putative Rolle von *WT1* als Onkogen - zumindest in Malignomen des hämatopoetischen Systems - unterstreicht. Allerdings soll hier einschränkend angemerkt werden, dass die differenzielle Expression von *WT1* während der Differenzierung der promyeloischen HL60-Zelllinie in Granulozyten bzw. Monozyten darauf hindeutet, dass *WT1* evtl. auch hier „lediglich“ eine Markerfunktion für den Differenzierungsstatus hämatopoetischer Zellen übernimmt (Sekiya *et al.*, 1994). Trotz alledem haben die beobachteten Expressionsmuster in Leukämiezellen dazu geführt, dass der *WT1*-Expressionsquantifizierung in Leukämiepatienten eine prognostische Relevanz bzw. eine Markerfunktion für die Progression der Erkrankung zugeschrieben wird (Bergmann *et al.*, 1997; Schmid *et al.*, 1997; Tamaki *et al.*, 1999).

1.4 Ziel der Arbeit

Ziel der vorliegenden Dissertation war die Identifikation von Kandidatengen für die Pathogenese des Wilmstumors (WT oder Nephroblastom), einer Tumorerkrankung der Niere des frühen Kindesalters. Sie ist das Resultat einer fehlerhaft verlaufenden Nierenentwicklung. Die Analyse der normalen und aberranten Nephrogenese auf molekularer Ebene (d.h. der experimentelle Vergleich adulter und fetaler Niere untereinander sowie mit WT-Geweben) ermöglicht somit die Identifikation tumorrelevanter genetischer Veränderungen, die zur Pathogenese des WT beitragen.

Da Zellen dieses genetisch wie histologisch heterogenen Malignoms in der Regel viele verschiedene chromosomale Aberrationen aufweisen, wurde eine Strategie verfolgt, die zunächst die Isolation differenziell exprimierter Transkripte während der Nierenentwicklung und/oder der Wilmstumorgenese vorsieht (Expressionsansatz, *expression candidate approach*). Dabei wurde der parallele Vergleich der Expressionsprofile mehrerer Tumor- und Referenzgewebe mit Hilfe der *differential*

display-Methodik durchgeführt (Kap. 3.2.1-2). Im Anschluss daran sollte das Potenzial der korrespondierenden Gene, als Kandidaten für die Wilmstumorgenese zu gelten, durch ihre initiale Charakterisierung (Sequenzierung, Vergleich mit Einträgen in entsprechenden Gendatenbanken, Zuordnung zu humanen Chromosomen) abgeschätzt werden (Kap. 3.2.3). Für cDNAs mit interessanter chromosomaler Lokalisation in WT-Kandidatenregionen sollte eine weiterführende Charakterisierung wie die Sequenzbestimmung des Gesamttranskriptes und die Ermittlung des gewebespezifischen Expressionsmusters durchgeführt werden (Kap. 3.2.4-7). Schließlich war beabsichtigt funktionelle Testsysteme in Form stabil transfizierter, überexprimierender Tumorzelllinien für weitergehende Analysen aussichtsreicher Kandidatengene, so gegebenenfalls ihre Einbindung in Signaltransduktionskaskaden oder die Identifikation regulierter Gene, anzulegen (vgl. Kap. 3.2.4.7 und 3.2.5.4).

In einem zweiten Ansatz war die transkriptionelle Regulation des sowohl für Nierenentwicklung als auch Wilmstumorgenese zentralen *WT1*-Gens Gegenstand der durchzuführenden experimentellen Arbeiten (Kandidatengenansatz, *candidate gene approach*; Kap. 3.1). Dabei sollten die Methoden der Gelretardationsanalyse (Kap. 3.1.1) und Reporterogenanalyse (Kap. 3.1.2) zunächst im Labor etabliert werden, um sie gegebenenfalls in späteren Untersuchungen auf andere Kandidatengene der WT-Pathogenese zu übertragen. Im Rahmen der Etablierungsarbeiten sollten, ausgehend von der beschriebenen Promotorregion von *WT1*, vergleichende Promotoraktivitätsuntersuchungen in Zelllinien mit und ohne endogene *WT1*-Expression durchgeführt werden. Darüberhinaus sollte analysiert werden, inwieweit der für andere Promotorsysteme beschriebene funktionelle Antagonismus der Transkriptionsfaktoren SP1 und SP3 für die regulierte Expression von *WT1* während der Epithelialisierung des metanephrischen Blastems mitverantwortlich sein könnte.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Herkunft der verwendeten humanen Gewebe

Für die im Rahmen der vorliegenden Dissertation durchgeführten Genexpressionsuntersuchungen wurden Nierengewebe verschiedener Herkunft verwendet. Die Bezeichnungen der einzelnen Gewebe und eine Kurzbeschreibung (mit Histologie, falls vorhanden) sind im folgenden aufgeführt.

FE:	fetales Nierengewebe der 17. bis 21. Schwangerschaftswoche
AD:	adultes Nierengewebe; entnommen von Patienten ohne WT-Erkrankung
105WT:	WT-Gewebe eines zweijährigen Patienten mit unilateralem WT. Der Patient wurde präoperativ chemotherapiert. Histologie: Epitheliales Nephroblastom mit multiplen Nephroblastoseherden.
105NN:	Gewebeprobe des gesunden Nierengewebes desselben Patienten.
151WT:	Tumorprobe einer Patientin (vier Monate) mit unilateralem WT. Es erfolgte keine präoperative Chemotherapie. Histologie: Nephroblastom vom Mischtyp mit überwiegend epithelialen Anteilen.
146KMN:	Tumorgewebe eines konnatalen mesoblastischen Nephroms (ein eng mit dem WT verwandter Tumor der Niere des Kindesalters mit niedriger Malignität); die unilateral betroffene Patientin war drei Monate alt; keine präoperative Chemotherapie.
146NN:	Gewebeprobe des gesunden Nierengewebes desselben Patienten.
128WT:	Frühe Passage einer Tumorzellkultur, angelegt vom WT-Gewebe einer einjährigen Patientin mit bilateralem WT (Löbber et al., 1998). Histologie: überwiegend stromale Anteile.
98WT:	WT-Gewebe eines dreijährigen Patienten mit unilateralem WT.
43WT:	WT-Gewebe eines einjährigen Patienten mit unilateralem WT ohne präoperative chemotherapie. Histologie: Triphasisches Nephroblastom.
174KMN:	Tumorgewebe eines konnatalen mesoblastischen Nephroms eines männlichen Neugeborenen.
82KMN:	Tumorgewebe eines konnatalen mesoblastischen Nephroms eines männlichen Patienten.

2.2 DNA und RNA Standardmethoden

2.2.1 Isolation von DNA

2.2.1.1 Isolation von Plasmid- und PAC-DNA

Die Präparation kleinerer Mengen Plasmid-DNA (Mini-Präparation) erfolgte nach der Methode der alkalischen Lyse unter Verwendung des RPM-Kits der Firma Bio101 (Hamburg) genau nach den Angaben des Herstellers. Gemäß dieser Methode aufgereinigte Plasmid-DNA konnte für verschiedenste Folgeanwendungen (u.a. Sequenzierung; vgl. Kap. 2.2.8) verwendet werden.

Sollte im Zuge von Klonierungsexperimenten die isolierte DNA lediglich mittels Restriktionsendonuklease-Verdau nachfolgend analysiert werden, so wurde die Methode der Lyse durch Kochen angewandt (Sambrook *et al.*, 1989). Dazu wurden 1,5 ml Bakterienkultur abzentrifugiert und der erhaltene Niederschlag in 300 µl STET-L Puffer resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde anschließend für ca. 1 min in kochendem Wasser inkubiert und danach bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Nach Entfernen des pelletierten bakteriellen Lysats wurde die freigesetzte Plasmid-DNA durch Zugabe von 220 µl Isopropanol, Mischen und Zentrifugation (10 min bei maximaler Geschwindigkeit) gefällt und anschließend mit 70%igem EtOH gewaschen. Nach Trocknung wurde die gefällte DNA in 30 µl RNaseA-haltigem Wasser (50 µg/µl) gelöst.

Die Präparation größerer Mengen Plasmid-DNA (Midi- bzw. Maxi-Präparation) wurde mit Hilfe des Nucleobond AX-Kits (Fa. Macherey und Nagel, Düren) gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Dementsprechend kamen für die Isolation von bis zu 100 µg Plasmid-DNA aus 50-100 ml Bakterienkultur AX100-Säulen, für die Isolation bis zu 500 µg Plasmid-DNA (250-300 ml Bakterienkultur) AX500-Säulen zur Anwendung. Das gewaschene DNA-Pellet wurde luftgetrocknet und in 50-500 µl Wasser bzw. 1/4x TE-Puffer gelöst. Anschließend wurde die DNA-Konzentration photometrisch bestimmt (vgl. Kap. 2.2.3).

Die Präparation von PAC-DNA erfolgte mit Hilfe des Nucleobond AX-Kits (Fa. Macherey und Nagel, Düren) entsprechend den Angaben des Herstellers für die Präparation von PAC-DNA. Dabei betrug das Volumen der für die Präparation eingesetzten Bakterien-Übernachtskultur 300-400 ml, deren DNA über AX500-Säulen aufgereinigt wurde. In der Regel wurde so präparierte DNA in 50-100µl 1/4x TE gelöst und anschließend die Konzentration photometrisch bestimmt (vgl. Kap. 2.2.3).

2.2.1.2 *Isolation genomischer DNA aus Zellkulturen*

Sollte DNA aus Zellkulturen gewonnen werden, wurden die eukaryotischen Zellen aus ein bis zwei T150 Zellkulturflaschen trypsiniert, in 30 ml PBS gewaschen und nach Zentrifugation in 4 ml Lysepuffer resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl Proteinase K-Lösung (20mg/ml) wurde das Gemisch über Nacht bei 37°C inkubiert und anschließend mit zwei Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)-Extraktionen und einer Chloroform/Isoamylalkohol (24:1)-Extraktion aufgereinigt. Das so erhaltene DNA/RNA Gemisch wurde mit RNaseA mit einer Konzentration von 100 µg/ml für 1 h bei 37 °C verdaut. Hieran schlossen sich zwei weitere Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol- und eine Chloroform/Isoamylalkoholextraktion an, nach denen die DNA dann mit 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 2 Volumen Ethanol ausgefällt, mit 70 % Ethanol gewaschen und anschließend in TE über mehrere Tage bei 4°C gelöst wurde.

2.2.1.3 *Isolation von Phagen-DNA*

Die Isolation von DNA aus Phagen erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Marzluff (unveröffentlicht). Ein Phagenplaque (vgl. Kap. 2.7.3) wurde aus dem NZYDT-Agar großzügig ausgestochen und in 50 ml LB-Medium (mit 10 mM MgCl₂) bei 37°C im Schüttler bis zur Lyse der Bakterien (in der Regel über Nacht) inkubiert. Zur Tötung nicht lysierter Bakterien wurden 500 µl Chloroform zugesetzt und die Kultur für weitere 15 min bei 37°C im Schüttler inkubiert. Nach Pelletieren der Bakterientrümmen (durch Zentrifugation für 15 min, 3100 upm, RT) wurde der Überstand (er enthält die Phagenpartikel) in ein neues 50 ml-Gefäß überführt und es wurden jeweils 50 µg RNaseA und 50 µg DNaseI zugegeben (Entfernung bakterieller RNA und DNA). Der anschließenden Inkubation bei 37°C für 30 min folgte die Zerstörung der Phagenhülle mittels Proteinase K-Verdau (unter gleichzeitiger Zerstörung der DNaseI und der RNaseA). Zu diesem Zweck wurden 5 ml 10x Proteinase K-Puffer und 300 µl Proteinase K (10 mg/ml) zum Ansatz gegeben und für 1 h bei 50°C inkubiert. Danach wurde die Phagen-DNA durch Zugabe von 0,6 Volumen Isopropanol, Inkubation auf Eis (10 min) und anschließende Zentrifugation (3000 upm, 20 min, RT) gefällt. Nach Lösen des Niederschlags in 300 µl 1/4xTE wurden Proteine durch sequenzielle Phenol- (1-2x), Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol- (4-6x) und Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktionen (1-2x) von der DNA getrennt. Die Fällung der Phagen-DNA erfolgte durch Natriumacetat/Isopropanolfällung. Der gewaschene und getrocknete DNA-Niederschlag wurde schließlich in 250 µl 1/4x TE aufgenommen und über mehrere Tage bei 4°C gelöst.

2.2.2 Isolation von RNA und Entfernung genomischer DNA

Die Präparation von Gesamt-RNA aus tiefgefrorenem menschlichen Gewebe und aus eukaryontischer Zellkultur erfolgte je nach benötigter Ausbeute mit dem QIAGEN RNeasy Mini oder Midi Kit (Fa. Qiagen, Hilden). Die Präparationen wurden genau nach den Vorschriften des Herstellers durchgeführt. Die Konzentrationsbestimmung der isolierten RNA erfolgte photometrisch (vgl. Kap. 2.2.3). Die Integrität der RNA wurde gelelektrophoretisch überprüft (vgl. Kap. 2.2.6).

Zur Entfernung genomischer DNA wurde die isolierte RNA einem DNaseI-Verdau unterzogen (Sambrook *et al.*, 1989). Zu diesem Zweck wurde die RNA in einem Gesamtvolumen von 150-300 μl (1x TE, 10 mM MgCl_2 , 0,1 M DTT, 40 U RNase Inhibitor) mit 100-150 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 Hestellers (Fa. Qiagen, Hilden). Die RNA wurde in einer geeigneten Menge DEPC-behandelten Wassers eluiert und die RNA-Konzentration des Eluats photometrisch bestimmt (vgl. Kap. 2.2.3). Im Anschluß wurde die RNA-Integrität mittels Agarosegelelektrophorese überprüft (vgl. Kap. 2.2.6). Zusätzlich wurden RNAs, die für eine Untersuchung mittels *differential display* (vgl. Kap. 2.9) vorgesehen waren, durch eine Standard-PCR (vgl. Kap. 2.4) auf verbliebene Kontaminationen mit genomischer DNA hin untersucht. Dies erfolgte unter Verwendung von 500 ng RNA als „Matritze“ und den Oligonukleotiden local-5 und local-3 als *primer* in der PCR.

2.2.3 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Konzentrationsbestimmungen von Nukleinsäuren erfolgten spektrophotometrisch unter Verwendung von Quarzküvetten. Bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260 \text{ nm}$ entspricht

OD= 1	50 $\mu\text{g/ml}$	doppelsträngiger DNA,
	40 $\mu\text{g/ml}$	RNA,
	37 $\mu\text{g/ml}$	einzelsträngiger DNA.

2.2.4 Fällung von DNA

Im Regelfall wurde DNA durch Zugabe von 1/10 Volumen 3M Natriumacetat (pH 5,2) und 3 Volumen EtOH gefällt und nach Waschen mit 70%igem EtOH in einem geeigneten Volumen destillierten Wassers oder 1/4x TE-Puffer aufgenommen.

PCR-Produkte, die für die spätere Sequenzierung (vgl. Kap. 2.2.8) vorgesehen waren, wurden durch Zugabe von 1 Volumen 4 M Ammoniumacetat und 2 Volumen (frisch abgefülltem) Isopropanol gefällt. Dies ermöglicht die selektive Entfernung der aus der PCR stammenden Oligonukleotide und kleiner (<80 bp) DNA-Fragmente. Nach Präzipitation (Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit, 30 min, RT) und anschließendem Waschen der Proben mit 70%igem EtOH wurde die gefällte DNA in einem geeigneten Volumen (i. d. Regel 10 µl) Wasser oder 1/4xTE aufgenommen.

2.2.5 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 eine Menge von 100-500 ng Plasmid-DNA eingesetzt. Präparative Ansätze enthielten in der Regel 2-10 µg Plasmid-DNA.

2.2.6 Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente zwischen 75 bp und 20 kbp Größe wurden auf horizontalen 0,8-2%igen Agarosegelen (4-6 mm dick) gelelektrophoretisch aufgetrennt, wobei 0,5x TBE als Puffersystem verwendet wurde. Aufzutrennende DNA wurde vor der Elektrophorese mit 1/6 Volumen 6x DNA-Probenpuffer versetzt und in Abhängigkeit von der Gelgröße bei Spannungen von 60-100 V aufgetrennt. Als Molekulargewichtsstandard wurden HindIII restringierte λ-DNA (Fa. Pharmacia, Freiburg), sowie 123 bp oder 100 bp-Leiter (Fa. GibcoBRL, Eggenstein) verwendet. Zur Darstellung der DNA wurden die Gele nach dem Lauf 5-10 min im Ethidiumbromidbad gefärbt (5 µg/ml) und im Anschluss daran 15-20 min in Wasser entfärbt. Es folgte die Betrachtung der entfärbten Gele unter UV-Licht ($\lambda=312$ nm) und die Dokumentation mit dem E.A.S.Y. Videosystem (Fa. Herolab, Wiesloch). RNA wurde zur Kontrolle ihrer Integrität auf horizontalen 1%igen Agarosegelen (4-6 mm dick) gelelektrophoretisch aufgetrennt. Vor der Elektrophorese wurden ca. 100-500 ng RNA mit 1/10 Volumen 10x RNA-Probenpuffer versetzt und neben einem 18S/28S rRNA-Marker (Fa. Pharmacia, Freiburg) aufgetragen. Der Gellauf erfolgte in 1x MOPS-Puffer bei 80-100 V. Darstellung und Dokumentation der RNAs wurden wie für DNA beschrieben durchgeführt.

2.2.7 Wiedergewinnung von DNA aus Agarosegelen

Nach gelelektrophoretischer Auftrennung wurden ausgewählte DNA-Banden unter UV-Licht mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Die Aufreinigung der DNA erfolgte mit dem *QIAquick Gel Extraction Kit* (Fa. Qiagen, Hilden) gemäß den Angaben des Herstellers. Die Konzentrationsabschätzung der isolierten DNA erfolgte photometrisch (vgl. Kap. 2.2.3) oder durch Agarosegelelektrophorese im Vergleich mit DNA bekannter Konzentration.

2.2.8 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 *PRISM Ready Reaction Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing Kit* (Fa. Applied Biosystems, Weiterstadt) in einer linearen PCR-Reaktion mit verschiedenen Programmen je nach verwendeter Matrizen-DNA (s.u.). Für einen 20 µl Sequenzierungsansatz wurden 50-100 ng PCR-Produkt, 0,5-1 µg Plasmid-DNA bzw. 5-10 µg PAC-DNA als Matrize eingesetzt. Ferner enthielt ein solcher Ansatz 5-10 pmol eines spezifischen *primers* und 8 µl *premix* (dieser enthält Reaktionspuffer, Nukleotide und das Enzym). Die Produkte der Sequenzierungsreaktion wurden anschließend durch eine Natriumacetat/EtOH-Fällung präzipitiert, mit 70%igem EtOH gewaschen und nach Vakuumtrocknung in 2-3 µl deionisiertem Formamid/50 mM EDTA (5:1) gelöst. Die anschließende Polyacrylamidgelelektrophorese, die Detektion der Fluoreszenzsignale sowie deren automatische Auswertung erfolgten genau nach den Angaben des Herstellers der automatischen 373A- bzw. 377-Sequenziergeräte (Fa. Applied Biosystems, Weiterstadt).

Verwendete Sequenzierprogramme:

für PCR-Produkte und Plasmide:

	1 min / 96°C
25-30 Zyklen à	15 sek / 96°C, 15 sek / 50°C, 4 min / 60°C

für PAC-DNA:

	4 min 96°C
30-35 Zyklen à	30 sek / 96°C, 5 sek / 50°C, 4 min / 60°C

2.3 Klonierung von DNA-Fragmenten in Plasmidvektoren

2.3.1 Vektorvorbereitung

Für Standardklonierungen (Klonierung restringierter DNA-Fragmente) wurde der Phagemidvektor pBlueskript II SK+ (Fa. Stratagene, Heidelberg) verwendet, der eine blau/weiß-Selektion transformierter Bakterien erlaubt. Dabei wurde die Plasmid-DNA mit geeigneten Restriktionsendonukleasen in der Polyklonierungsstelle linearisiert und das gewünschte DNA-Fragment anschließend durch Ligation (vgl. Kap. 2.3.2) und Transformation in *E. coli* (vgl. Kap. 2.3.4) kloniert.

Das Expressionsplasmid pcDNA3 (Fa. Invitrogen, USA), das Reporterplasmidsystem pGL2 (Fa. Promega, Mannheim) und das Fusionsprotein-Expressionssystem pGEX-4T (Fa. Pharmacia, Freiburg) bietet nicht die Möglichkeit der blau/weiß-Selektion rekombinanter Bakterien. Um das Auftreten von Bakterienklonen mit nichtrekombinantem Plasmid zu minimieren, wurden die Enden der linearisierten Plasmid-DNA vor der Ligation dephosphoryliert. Dies geschah durch die Behandlung restringierter DNA mit alkalischer Phosphatase (Fa. Boehringer, Mannheim). Dabei wurden im mitgelieferten Dephosphorylierungspuffer oder direkt im Restriktionspuffer in einem Gesamtvolumen von 20-30 µl 1-2 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, erneut 1 µl alkalische Phosphatase hinzugegeben und die Inkubationsschritte wiederholt. Daraufhin wurde der Reaktionsansatz auf 200 µl mit TE aufgefüllt und die Plasmid-DNA zweimal mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol und einmal mit Chloroform/Isoamylalkohol ausgeschüttelt. Der Ethanol-fällung folgte die Auftrennung der DNA über ein Agarosegel (vgl. Kap. 2.2.6) und die anschließende Extraktion (vgl. Kap. 2.2.7).

Speziell für die Subklonierung von PCR-Produkten wurden 3 µg EcoRV-restringierter Plasmidvektor 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 2-3 Stunden inkubiert und anschließend über eine Phenol/Chloroform-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.

2.3.2 Ligation

Ligationsreaktionen wurden in der Regel mit der T4 DNA Ligase (*high concentrated*) der Firma GibcoBRL (Eggenstein) im mitgelieferten Puffersystem gemäß den Angaben des

Herstellers mit leichter Modifikation durchgeführt. Dabei wurde für die Ligation von PCR-Produkten in T-Vektor (vgl. Kap. 2.3.1) das Protokoll für die Ligation von DNA-Fragmenten mit stumpfen Enden (sog. *blunt-end* Ligationen) angewendet. Eine Abwandlung der angegebenen Ligationsprotokolle wurde in Bezug auf die pro Reaktion verwendete Menge an Ligase eingeführt. So wurden für die Ligation von DNA-Fragmenten mit überhängenden Enden (sog. *sticky-end* Ligation) 0,5 U, für eine *blunt-end* Ligation 1 U T4 DNA-Ligase eingesetzt. *Blunt-end* Ligationsreaktionen wurden generell bei 16°C über Nacht, *sticky-end* Ligationen bei 16°C über Nacht oder bei Raumtemperatur für 1-4 h durchgeführt. Vom Ligationsansatz wurden in der Regel 5-10 µl für die Transformation kompetenter *E. coli*-Bakterien des Stammes DH5α (vgl. Kap. 2.3.4) eingesetzt.

2.3.3 Herstellung kompetenter Bakterien nach Hanahan

Die Herstellung kompetenter Bakterien des Stammes *E.coli* DH5α für die Transformation erfolgte nach einer modifizierten Methode von Hanahan (1985). Hierbei wurden 100 ml SOB- oder LB-Medium mit einer Übernachtkultur von DH5α auf eine OD₅₅₀ von 0,05 beimpft und bei 37°C schüttelnd inkubiert, bis die Bakteriensuspension eine OD₅₅₀ von 0,5 erreicht hatte. Die Bakteriensuspension wurde dann zentrifugiert (1200g, 10 min, 4°C) und das Bakterienpellet in 30 ml eiskaltem Tfb I-Puffer resuspendiert. Die Bakterien wurden für 30 min auf Eis inkubiert und erneut zentrifugiert (800g, 6 min, 4°C). Der bakterielle Niederschlag wurde anschließend vorsichtig in 4 ml Tfb II-Puffer resuspendiert, als 200 µl-Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert

2.3.4 Transformation und Selektion positiver Klone

Für die Transformation wurden 50-100 µl kompetenter DH5α-Bakterien vorsichtig mit der zu transformierenden DNA gemischt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock bei 42°C für 1 min wurde der Ansatz mit 1 ml LB-Medium versetzt und bei 37 °C für 1 h geschüttelt. In der Regel wurden 10-300 µl des Transformationsansatzes auf LB-Agarplatten (mit 100 µg/ml Ampicillin, 40 µg/ml X-Gal und 50 µg/ml IPTG) ausgestrichen und für 16-20 Stunden bei 37°C bebrütet.

Durchschnittlich wurden 2-12 weiße, rekombinante Kolonien in 3ml ampicillinhaltiges LB-Medium überimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert. Im Anschluss daran erfolgte eine Charakterisierung der Plasmidintegrate durch DNA-Isolation und

anschließenden Restriktionsverdau (vgl. Kap. 2.2.1.1 und 2.2.5) oder durch spezifische PCR-Reaktionen (vgl. Kap. 2.4).

Im Falle der Klonierung von *differential display*-Fragmenten (aus Kap. 2.9.4) wurden 12-24 rekombinante, weiße Kolonien pro cDNA-Fragment in 96-Loch-Mikrotiterplatten mit ampicillinhaltigem LB-Medium gepickt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Diese Platten konnten nach Zugabe von 1 Volumen 2x FM-Medium bei -70°C gelagert werden

2.3.5 Herstellung von *E. coli*-Dauerkulturen

Dauerkulturen von Bakterien mit relevanten Plasmiden wurden durch Mischen von 500 µl frischer Bakterienkultur (in LB-Medium) mit 500 µl 2x FM-Medium in Kryoröhrchen (Fa. Nalgene, USA) und Aufbewahrung bei -70°C hergestellt.

2.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Amplifikation linearer DNA Fragmente wurde mit Hilfe der PCR (Saiki *et al.*, 1988) in Ansätzen mit einem Gesamtvolumen von 25-50 µl durchgeführt. Ein Standard PCR-Ansatz enthielt dabei 50-100 ng DNA, 50 mM KCl, 10 mM Tris/HCl (pH 8,3), 0,1 mg/ml Gelatine, 1,5 mM MgCl₂, 40 pmol jedes *primers*, je 200 µM der vier dNTPs und 1U Taq DNA-Polymerase (Fa. Boehringer, Mannheim). Einer ersten Denaturierung von 3 Minuten bei 94°C folgten in der Regel 35 Amplifikationszyklen (1 min 94°C Denaturierung, 1 min 54-60°C *annealing* der *primer*, 1 min [pro zu amplifizierendem kbp] 72°C Elongation). Daran schloss sich eine 7-minütige Inkubation bei 72°C an. Das Standardprogramm wurde je nach verwendeten *primern* und DNA-Matrizen entsprechend verändert. Die Amplifikation erfolgte entweder in einem *TC-1 DNA-Thermal Cycler* (Fa. Perkin-Elmer, Weiterstadt) oder in einem *PTC-100* oder *PTC-200 Thermal Cycler* (Fa. MJ-Research, USA). Bei PCR Amplifikationen im TC1-Gerät wurden die Einzelreaktionen mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet. Zur Bestimmung der Größen subklonierter *differential display*-Fragmente wurde eine Standard-PCR mit den Oligonukleotiden T3 und T7 als *primer* in hitzestabilen 96-Loch Mikrotiterplatten durchgeführt. In diesen Fällen erfolgte die Amplifikation im Gerät *PTC-100 Thermal Cycler* (Fa. MJ-Research, USA). Nach erfolgter Amplifikation wurde in der Regel 1/10 des Gesamtvolumens eines PCR-Ansatzes auf einem 1-2 %igen Agarosegel elektrophoretisch überprüft (vgl. Kap. 2.2.6).

2.5 Reverse Transkriptions-PCR (RT-PCR)

2.5.1 Erststrang cDNA-Synthese (reverse Transkription)

Dabei wurden 4 µg Gesamt-RNA in einem Volumen von 15,9 µl DEPC-Wasser für 10 min bei 70°C denaturiert und danach für ca. 1 min auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 24,1 µl cDNA-Synthesemix (s.u.) erfolgte die Erststrang-Synthese in einem Gesamtvolumen von 40 µl für 90 min bei 37°C und anschließend die Inaktivierung der reversen Transkriptase durch eine Inkubation des Reaktionsansatzes bei 95°C für 10 min.

cDNA-Synthesemix:

- 5,0 µl Oligo (dT)₁₆ (50 µM)
- 3,6 µl dNTP-Gemisch (10 mM je dNTP)
- 2,0 µl RNase Inhibitor (20 U/µl; Fa. MBI Fermentas, USA)
- 8,0 µl 5x *1st strand buffer* (Fa. GibcoBRL, Eggenstein)
- 4,0 µl DTT (0,1 M; Fa. GibcoBRL, Eggenstein)
- 1,5 µl MMLV-Reverse Transkriptase (200 U/µl; Fa. GibcoBRL, Eggenstein)

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

2.5.2 Standard RT-PCR und semiquantitative RT-PCR

Die Herstellung von cDNA-Fragmenten (z.B. zur Analyse transkribierter Sequenzen oder als Ausgangsprodukt für die Generierung von Sonden für die *Northern*-Analyse) erfolgte mittels der RT-PCR. Gleichzeitig kann die Methode verwendet werden, um die Genexpression auf der Stufe der RNA zu untersuchen (Wang *et al.*, 1989). Verwendet man von zu vergleichenden RNA-Populationen gleiche Ausgangsmengen an cDNA, so lassen sich nach einer anschließenden PCR Aussagen über die relativen Mengen der untersuchten cDNA treffen. Dabei ist wichtig, dass die PCR-Amplifikation zu einem Zeitpunkt gestoppt wird, an dem sich die Amplifikation in der exponentiellen Phase befindet. Aus diesem Grund wurde für jedes über semiquantitative RT-PCR untersuchte Gen diese Zyklenzahl bestimmt und die PCR-Reaktion für die ermittelte Zyklenzahl durchgeführt. Als Matrize für die PCR wurden 1-2 µl Reaktionslösung der reversen Transkription (aus Kap. 2.5.1) in einem 50 µl Reaktionsansatz eingesetzt, der in seiner sonstigen Zusammensetzung dem der Standard-PCR gleich (vgl. Kap. 2.4). Die Analyse der Amplifikate erfolgte durch Auftrennung von jeweils 5 µl der Reaktionsansätze mittels Agarosegelelektrophorese (vgl. Kap. 2.2.6).

2.5.3 Quantitative RT-PCR

Quantitative PCR-Reaktionen wurden in einem Volumen von 50 μl durchgeführt. Die Ansätze entsprachen dabei denen der Standard-PCR (vgl. Kap. 2.4), wobei zusätzlich 1 μl α - ^{32}P]dCTP (1 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$) zu den Reaktionsansätzen zugegeben wurde. Nach Überschichtung mit leichtem Mineralöl (Fa. Sigma, Deisenhofen) wurden die Reaktionen in einem *TC-1 DNA-Thermal Cycler* (Fa. Perkin-Elmer, Weiterstadt) durchgeführt. Während der Phase der exponentiellen Amplifikation wurde das PCR-Programm nach der 1-minütigen Elongationsreaktion bei 72°C unterbrochen und die Proben für 1 min auf Eis abgekühlt. Für die spätere Auswertung wurden dann aus jedem Reaktionsansatz 5 μl entnommen und das PCR-Programm fortgesetzt. Die Probenentnahme wurde 1-2x in darauffolgenden Zyklen wiederholt.

Die quantitative Auswertung erfolgte nach Auftrennung der Proben auf einem 5%igen Polyacrylamidgel (Zugabe von 1 μl DNA-Probenpuffer zu den entnommenen 5 μl Probe; 4 μl dieses Gemisches wurden auf dem Gel analysiert). Dabei wurden die Bandenintensitäten des getrockneten Gels autoradiographisch unter Verwendung eines *Phosphoimagers* (Fa. Molecular Dynamics, Krefeld) quantifiziert.

2.6 Radioaktive und nichtradioaktive Markierungstechniken

2.6.1 Oligonukleotid-labelling

DNA-Fragmente wurden nach der von Feinberg und Vogelstein (1983) beschriebenen Methode des *random primed oligolabelling* radioaktiv markiert. Dabei wurden 10-50 ng der zu markierenden DNA-Sonde hitzedenaturiert und in einem 30 μl Ansatz mit 30 μCi [α - ^{32}P]dCTP (Fa. Amersham, Braunschweig), 6 μl Oligolabellingpuffer (OLB), 60 μg BSA und 3 U Klenow DNA-Polymerase (Fa. NEB, USA oder Fa. Boehringer, Mannheim) für 1-2 h bei 37°C oder über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Die Abtrennung nicht eingebauter Nukleotide erfolgte mittels *Sephadex G50 Nick Spin-Columns* (Fa. Pharmacia, Freiburg) genau nach den Angaben des Herstellers. 1 μl des Eluats wurde im Szintillationszähler auf die Effektivität der Markierung überprüft. Bei der Markierung von PCR-Produkten wurden die Hexanukleotide des OLB durch je 10 pmol produktspezifischer *primer* ersetzt.

2.6.2 Herstellung einer komplexen cDNA-Sonde

Zur Herstellung einer komplexen, radioaktiv markierten cDNA-Sonde aus gesamtzellulärer RNA für die *Reverse Northern*-Hybridisierung (vgl. Kap. 2.7.5) wurden 30 μg DNaseI-

verdaute RNA (vgl. Kap. 2.2.2) eingesetzt. Zu diesem Zweck wurde die RNA in einem Volumen von 12 μl Wasser aufgenommen und es wurden 2 μl einer 50 μM oligo dT₁₆-Lösung zugesetzt. Der Denaturierung bei 70°C für 6 min folgte eine einminütige Inkubation auf Eis und im Anschluss die Zugabe von 26 μl Markierungsmix:

Markierungsmix:

- 8,0 μl 5x 1st strand buffer (Fa. GibcoBRL, Eggenstein)
- 4,0 μl 0,1 M DTT (Fa. GibcoBRL, Eggenstein)
- 1,0 μl RNase Inhibitor (Fa. MBI Fermentas, USA)
- 4,0 μl dNTP-Gemisch ohne dCTP (10 mM je Nukleotid)
- 2,0 μl dCTP (0,12 mM)
- 5,0 μl [α -³²P]dCTP (10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$; Fa. Amersham, Braunschweig)
- 2,0 μl MMLV-Reverse Transkriptase
(200 U/ μl ; Fa. GibcoBRL, Eggenstein)

Die reverse Transkription erfolgte bei 37°C für 1 h, woraufhin die RT durch eine 7minütige Inkubation bei 94°C inaktiviert wurde. Der Ansatz wurde im Anschluss daran kurz auf Eis abgekühlt und es wurden 3 μl 0,5 M EDTA zugegeben. Die Aufreinigung der cDNA wurde mit Hilfe des *Nucleotide Removal Kit* (Fa. Qiagen, Hilden) gemäß den Angaben des Herstellers für die Aufreinigung von PCR-Produkten durchgeführt und die nun radioaktiv markierte cDNA in zweimal 100 μl Elutionspuffer eluiert. 2 μl des Eluats wurden im Szintillationszähler auf die Effektivität der Markierung überprüft.

2.6.3 Markierung durch Polynukleotidkinase

Die radioaktive Markierung von Oligonukleotiden bzw. von DNA-Fragmenten des *WT1*-Promotors (kloniert in pBlueskript) erfolgte durch Polynukleotidkinase. Typische Markierungsansätze sahen wie folgt aus:

- 1,0 μg Oligonukleotid bzw. 10 μg DNA (mit dephosphorylierten Enden)
- 2,0 μl 10x PNK-Puffer
- 5,0 μl γ [³²P]ATP (1000 Ci/mmol; Fa. Amersham, Braunschweig)
- 1,0 μl Polynukleotidkinase (Fa. NEB, USA)
- ad 20 μl Wasser

Nach Mischen wurde ein Markierungsansatz 1-2 h bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Abtrennung nicht eingebauter radioaktiver Nukleotide im Falle der Markierung eines Oligonukleotids über Sephadex G25 NAP-Säulen (Fa. Pharmacia, Freiburg) oder im Falle der Markierung größerer DNA-Fragmente über Sephadex G50 *Nick Spin Columns* (Fa. Pharmacia, Freiburg) genau nach den Angaben des Herstellers. 10 μl (Oligonukleotid) bzw. 1 μl (DNA) des Eluats wurde im Szintillationszähler auf die Effektivität der Markierung überprüft.

2.6.4 Markierung durch *nick*-Translation

Die nichtradioaktive Markierung von PAC-DNA zur Generierung von Sonden für die Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierung (vgl. Kap. 2.8) wurde mit Hilfe der *nick*-Translation nach MacGregor und Mizuno (1976) durchgeführt. Dabei wurden 0,5-2 µg PstI-restringierte DNA mit Hilfe des *Nick-Translation Kits* (Fa. GibcoBRL, Eggenstein) gemäß den Angaben des Herstellers mit Digoxigenin-11-dUTP (Boehringer, Mannheim) markiert. Nach Abstoppen der Reaktion durch Inkubation auf Eis wurde 1/10 des Markierungsansatzes mittels Agarosegelelektrophorese (vgl. Kap. 2.2.6) überprüft (bei erfolgreicher *nick*-Translation befindet sich die Mehrheit der entstandenen DNA-Fragmente zwischen 200 und 500 bp).

2.7 Hybridisierungstechniken auf Filtern

2.7.1 DNA-DNA Hybridisierung nach Southern

DNA-Fragmente aus Agarosegelen wurden mit der von Southern (1975) beschriebenen Methode auf Nylonmembranen (Hybond N+; Fa. Amersham, Braunschweig) transferiert, wobei ein unidirektionaler Aufbau (Sambrook *et al.*, 1989) verwendet wurde. Als Transferpuffer diente 10x SSC. Dabei wurden 15 µg zu untersuchender genomischer DNA mit geeigneten Restriktionsendonukleasen verdaut (vgl. Kap. 2.2.5) und nach Abtrennung der Proteine mittels Phenol/Chloroform- und Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion und Ethanol-fällung über ein 1%iges Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (vgl. Kap. 2.2.6). Die Position der Banden des Längenstandards wurden nach Färbung im Ethidiumbromidbad und anschließender Entfärbung mit einem Spatel durchstoßen. Danach wurde das Gel zunächst für 30 min in DNA-Denaturierungslösung und anschließend für 30 min in DNA-Neutralisierungslösung inkubiert. Der Transfer der DNA-Fragmente erfolgte für 16-48 h. Nach Abschluss des Transfers wurde die Nylonmembran kurz in 2x SSC gewaschen. Die Fixierung der DNA auf dem Filter erfolgte durch Bestrahlung des Filters mit UV-Licht (1200 kJ) in einem *UV Stratalinker 1800* (Fa. Stratagene, USA). Sowohl die Synthese und die Hybridisierung der radioaktiv markierten Sonde, als auch das Waschen der Filter und die autoradiografische Dokumentation erfolgte genau wie für die *Northern*-Hybridisierung beschrieben (vgl. Kap. 2.7.4).

2.7.2 Koloniefilterhybridisierung

Die Identifizierung rekombinanter Bakterienklone erfolgte nach der Methode von Grunstein und Wallis (1979). Hierzu wurden Bakterienklone den 96-Loch-

Mikrotiterplatten mit einem 96er Stempel (Fa. Sigma, Deisenhofen) auf Hybond N+ Membranen (Fa. Amersham, Braunschweig) übertragen und auf ampicillin- oder kanamycinhaltigen LB-Agarplatten über Nacht bei 37°C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Koloniefilter nach der in Sambrook *et al.* (1989) beschriebenen Methode prozessiert. Hierbei wurden die Bakterien durch Inkubation der Koloniefilter auf 10%iger SDS-Lösung lysiert, die freigesetzte DNA für 10 min mit DNA-Denaturierungslösung denaturiert und dann 10 min mit DNA-Neutralisierungslösung neutralisiert. Die Fixierung der DNA erfolgte durch Inkubation der Filter für 2h bei 80°C. Danach wurden die Filter in 100 mM Na₂HPO₄/1% SDS-Lösung für 30 min bei 65°C gewaschen und Bakterienreste vorsichtig mit einem fusselfreien Tuch entfernt. Die Prähybridisierung der Koloniefilter erfolgte für 4-16h bei 65°C in *Church*-Hybridisierungspuffer (Church und Gilbert, 1983). Anschließend wurden die Filter in frischem *Church*-Puffer mit der denaturierten Sonde (vgl. Kap. 2.6.1) in einer Konzentration von 1-2x 10⁶ cpm/ml für 16-20 h bei 65°C hybridisiert. Unspezifisch gebundenes Sondenmaterial wurde durch Waschen in Na₂HPO₄/1% SDS-Lösungen absteigender Konzentration (200mM, 100 mM, 50 mM Na₂HPO₄) bei Temperaturen zwischen 50°C und 65°C entfernt. Die Signaldetektion wurde wie in Kapitel 2.7.4 beschrieben durchgeführt.

2.7.3 Plaquefilterhybridisierung

λ-Klone aus einer cDNA-Bibliothek wurden nach der von Benton und Davis (1977) beschriebenen Methode der Plaquefilterhybridisierung isoliert. Dazu wurde eine Verdünnungsreihe einer λgt10-Phagensuspension in SM-Medium angelegt und jeweils 10 µl der verschiedenen Phagenverdünnungen mit 600 µl kompetenten *E. coli*-Bakterien (Stamm C600hfl; eingestellt auf eine OD₆₀₀ von 0,5 in 10mM MgSO₄) gemischt. Der Präadsorption der Phagenpartikel durch Inkubation der Lösung bei 37°C für 15 min folgte das Ausplattieren der Suspension. Zu diesem Zweck wurde die Bakterien/Phagen-Suspension mit 10 ml vorgewärmtem Top-Agar (NZYDT-Medium/0,7% Agarose) versetzt und sofort auf vorgewärmten NZYDT-Agarplatten verteilt. Die erkalteten Platten wurden für 5-6 h bei 37°C und danach über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Übertragung der Phagen auf Filter (im Duplikat) erfolgte durch Auflegen von Hybond N+ Membranen auf die kalten Agarplatten (1 min für den ersten Filter, 3 min für das Duplikat). Nach 1 min Denaturierung (mit DNA-Denaturierungslösung), 2x 3 min Neutralisierung (mit DNA-Neutralisierungslösung) und 3 min Äquilibrierung (mit 2x SSC) wurden die Plaquefilter für 30 min bei Raumtemperatur getrocknet. Die Filter wurden zur Fixierung der DNA für 2 Stunden bei 80°C gebacken und dann wie in Kapitel 2.7.2 geschildert mit einer radioaktiv

markierten Sonde hybridisiert, gewaschen und anschließend autoradiografiert. Plaque-Regionen, deren Signale im Duplikat vorhanden waren, wurden aus dem Weichagar ausgestochen und in 500 µl SM-Medium mit 50 µl Chloroform überführt und konnten so bei 4°C für mehrere Monate aufbewahrt werden. Entsprechend dieser Region keinem Einzelplaque, so wurde ein Aliquot des isolierten phagenhaltigen Bereichs auf einem geeigneten Bakterienrasen ausplattiert und damit eine zweite Plaquefilterhybridisierung durchgeführt. Auf diese Weise konnten positive Einzelplaques isoliert werden. Von diesen Einzelplaque-Phagensuspensionen wurde jeweils ein Aliquot mit DMSO in einer Endkonzentration von 7% versetzt und als Dauerkultur bei -70°C gelagert.

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

Für *Northern*-Hybridisierungen an gelelektrophoretisch aufgetrennter und an einem Filter immobilisierter RNA wurden 10-20 µg Gesamt-RNA (isoliert aus Zellkultur oder Gewebe; vgl. Kap. 2.2.2) 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. Dann erfolgte die gelelektrophoretische Auftrennung über ein 1%iges Agarosegel mit 6,5% Formaldehyd (Laufpuffer 1x MOPS) bei 80-100 V für 4 h. Als Molekulargewichtsstandard auf RNA-Gelen wurde die *RNA-ladder* der Firma GibcoBRL (Eggenstein) 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 Hybond N+ Filter (Fa. Amersham, Braunschweig) erfolgte kapillarelektrophoretisch für 24-72 h mit 10x SSC als Transferpuffer nach der von Mason *et al.* 1993 beschriebenen Methode.

Das Aufbringen kleinerer Mengen Gesamt-RNA, die nicht gelelektrophoretisch aufgetrennt wurde, erfolgte mit dem *slot blot*-Verfahren. Dieses Verfahren ermöglicht die Fixierung der RNA auf einer relativ kleinen Fläche und wurde insbesondere für das Aufbringen von RNA aus Gewebeproben verwendet. Zu diesem Zweck wurden 2 µg der RNA in 50 µl Puffer (50% Formamid, 6% Formaldehyd, 1x MOPS) aufgenommen, 10 min bei 65°C denaturiert, auf Eis abgekühlt und mit 1 Volumen eiskaltem 20x SSC gemischt. Im Anschluss daran wurde der Reaktionsansatz mit Hilfe einer *slot blot* Vakuum-Apparatur (*Hybri-Slot manifold*, Fa. BRL, USA) auf eine mit 10x SSC angefeuchtete Hybond N+ Membran (Fa. Amersham, Braunschweig) aufgebracht. Die Fixierung der RNA auf dem Filter erfolgte durch Bestrahlung des Filters mit UV-Licht (2x 1200 kJ) in einem *UV Stratalinker 1800* (Fa. Stratagene, USA).

Die Prähybridisierung von RNA-Filtern erfolgte in 10 ml *ExpressHyb*-Lösung (Fa. Clontech, Heidelberg) für 30-60 min bei 65°C. Zur Hybridisierung einer radioaktiv markierten cDNA-Sonde (vgl. Kap. 2.6.1) wurde diese hitzedenaturiert und 2 min auf Eis abgekühlt. Im Anschluss daran wurde die Sonde mit 5-10 ml frischem, vorgewärmtem *ExpressHyb* (Fa. Clontech, Heidelberg) gemischt (Endkonzentration der Sonde: $1-2 \times 10^6$ cpm/ml) und zusammen mit dem RNA-Filter für 2-3 h unter ständiger Rotation bei 65°C inkubiert. Das Waschen der Filter erfolgte genau nach den Angaben des Herstellers für *ExpressHyb*-Lösung (Fa. Clontech, Heidelberg).

Wurden kommerzielle RNA-Filter der Fa. Clontech (Heidelberg) verwendet (*Human/Mouse Multiple Tissue Northern Blot I*, *Human/Mouse RNA Master Blot*), so wurden Prähybridisierung, Sondenhybridisierung und Waschen der Filter genau nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Zur Signaldetektion wurde die noch feuchte Membran in Haushaltsfolie gewickelt, und in einer mit Verstärkerfolie ausgekleideten Kassette (QuantaIII, Cronex-Kassette, Fa. DuPont, USA) für 2 h - 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 15-30 Minuten in 90-100°C heißer 0,5 %iger SDS-Lösung (w/v) von hybridisierter Sonde gereinigt.

2.7.5 *Reverse Northern*-Hybridisierung

Die *Reverse Northern*-Hybridisierung dient der parallelen Hybridisierung einer großen Anzahl von cDNA-Proben mit einer komplexen, radioaktiv markierten cDNA-Sonde (vgl. Kap. 2.6.2). Ein Teil der subklonierten cDNA-Fragmente der *differential display*-Experimente wurde mit Hilfe dieser Technik hinsichtlich seiner differenziellen Expression untersucht.

Die Integrat-DNA der zu untersuchenden cDNA-Klone wurde mit Hilfe von T3/T7-PCRs im 96-Loch Mikrotiterplattenformat amplifiziert (als Matrize dienten dabei die *E. coli*-Dauerkulturen mit den subklonierten *differential display* cDNA-Fragmenten), mit Ammoniumacetat/Isopropanol gefällt und der gewaschene Niederschlag in je 18 µl Wasser gelöst. Im Anschluß daran wurde die DNA durch Zugabe von 18 µl 0,6 M NaOH für 10 min denaturiert und danach auf Eis inkubiert (2 min). Danach folgte die Neutralisierung durch Zugabe von 36 µl eiskaltem 2 M Ammoniumacetat. Das Aufbringen auf positiv geladene Nylonmembranen, die zuvor in 2x SSC angefeuchtet wurden, erfolgte ebenfalls im 96-Loch Format mit einer *slot blot*-Apparatur, wobei jeweils die Hälfte der DNA-haltigen Lösung für eine Membran verwendet wurde (Duplikatfilter). Die kovalente

Bindung der DNA an die Membran erfolgte nach 30 minütiger Lufttrocknung durch UV-Behandlung (1200 kJ).

Die Prähybridisierung der Filter erfolgte in ca. 15-20 ml *Dig Easy Hyb*-Lösung (Fa. Boehringer, Mannheim) für 1-2 h bei 42°C. Danach wurde die denaturierte cDNA-Sonde in 15-20 ml frischer *Dig Easy Hyb*-Lösung aufgenommen und über Nacht bei 42°C unter ständiger Rotation mit der Membran inkubiert. Das Entfernen unspezifischer Hybridisierungssignale erfolgte durch zweimaliges je 15 minütiges Waschen in Waschpuffer 1 (2x SSC/0,1 % SDS/50 mM Na₂HPO₄) bei Raumtemperatur und zweimaliges je 10 minütiges Waschen in vorgewärmtem (65°C) Waschpuffer 2 (0,1x SSC/0,1 % SDS/4 mM Na₂HPO₄).

Die Detektion der Signale erfolgte durch Autoradiografie bzw. durch die Verwendung eines Phosphorimagers (Modell Storm 840; Fa. Molecular Dynamics, Krefeld). Die vergleichende Quantifizierung wurde durch die parallele Analyse mitgeführter Filter mit kovalent gebundener GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase)-cDNA ermöglicht.

2.8 Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierung (FISH) auf Metaphasechromosomen

Metaphasen menschlicher Lymphozyten wurden wie von Lemieux *et al.* (1992) geschildert präpariert. Eine Sonde wurde generiert, indem der zu lokalisierende PAC-Klon mit PstI restringiert und nach einer Phenol/Chloroform-Aufreinigung mit DIG 11-dUTP (Fa. Boehringer, Mannheim) mit Hilfe der *nick*-Translation (vgl. Kap. 2.6.4) markiert wurde. Die markierte DNA wurde in Gegenwart von Cot-1 DNA (GibcoBRL, Eggenstein) und einzelsträngiger Lachssperma-DNA (Fa. Stratagene, USA) mit EtOH gefällt und in 50% Formamid, 2x SSC, 10% Dextransulfat gelöst. Zur Absättigung repetitiver Sequenzen wurde die Sonde für 10 min bei 75°C denaturiert und anschließend für 15 min bei 37°C inkubiert. 0,25-1 µg der so vorbereiteten Sonde wurde pro Objektträger auf nach Klever *et al.* (1981) denaturierten Chromosomenpräparate gegeben und für 16 h bei 37°C mit einem Deckglas eingedeckelt in einer feuchten Kammer hybridisiert. Danach wurden die Objektträger 3x 5 min bei 42°C in 50% Formamid/1x SSC und 3x 5 min in 0,3x SSC gewaschen und für 15 min in 4x SSC/0,1% Tween 20/ BSA inkubiert. Die Detektion der Sonde erfolgte wie von Lichter *et al.* (1988) beschrieben mit monoklonalen Maus anti-Dig IgG1-Antikörpern, TRITC-markierten Ziege-anti-Maus-IgG-Antikörpern bzw. TRITC-markierten Ziege-anti-Kaninchen-IgG-Antikörpern (alle Antikörper von Fa. Sigma, Deisenhofen). Anschließend wurden die Chromosomen mit DAPI (Fa. Boehringer, Mannheim) gegengefärbt und die fertigen Präparate in *Vectashield Mounting Medium* (Fa.

Vector Laboratories, USA) eingebettet. Die Bildanalyse wurde mit einem DMRBE Mikroskop der Firma Leica (Bensheim) mit einem 100x/1.30 PC Fluotar Ölimmersions-Objektiv durchgeführt und mit einer CCD-Kamera und einem assoziierten Computer-Softwarepaket (Fa. Applied Imaging, USA) dokumentiert.

2.9 Differential display

Die Methode des *differential display* (Liang und Pardee, 1992) basiert auf der Technik der RT-PCR, bei der nach einer Erststrangsynthese die Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels der Polymerase-Kettenreaktion erreicht wird. Dabei zeichnet sich die *differential display*-Technik dadurch aus, dass für die Erststrangsynthese verankerte oligo(dT)-*primer* (sie gewährleisten den Start der reversen Transkription direkt am Beginn des poly-A-Schwanzes von mRNAs und teilen die Gesamtheit der zellulären polyA⁺-RNAs in drei Teile auf) verwendet werden. Außerdem werden in der anschließenden PCR willkürlich gewählte Dekamer-Oligonukletide als *primer* eingesetzt, deren komplementäre Sequenz mit einer bestimmten statistischen Wahrscheinlichkeit innerhalb eines Teils der Transkripte/cDNAs auftritt. Durch Verwendung unterschiedlicher Primerkombinationen in der PCR liefern die Amplifikationsreaktionen ein statistisch verteiltes Muster doppelsträngiger cDNA-Fragmente, die in der verwendeten RNA-Population entsprechende Transkripte repräsentieren. Dadurch, dass innerhalb der PCR-Reaktion ein radioaktives Nukleotid zugesetzt wird, ist es möglich, die entstehenden PCR-Produkte nach Auftrennung über ein Polyacrylamidgel durch Autoradiografie zu detektieren. Differenziell auftretende Banden (die unterschiedlich exprimierten Genen entsprechen sollten) können im Anschluss aus dem Gel ausgeschnitten, eluiert und in einer zweiten PCR amplifiziert werden. Die so gewonnenen cDNA-Fragmente können danach subkloniert werden und stehen für weitere Untersuchungen, v.a. aber für eine Verifikation der differentiellen Expression des entsprechenden Gens, zur Verfügung. Eine schematische Darstellung der Methode mit ihren Einzelschritten ist in Abbildung 2.1 gezeigt.

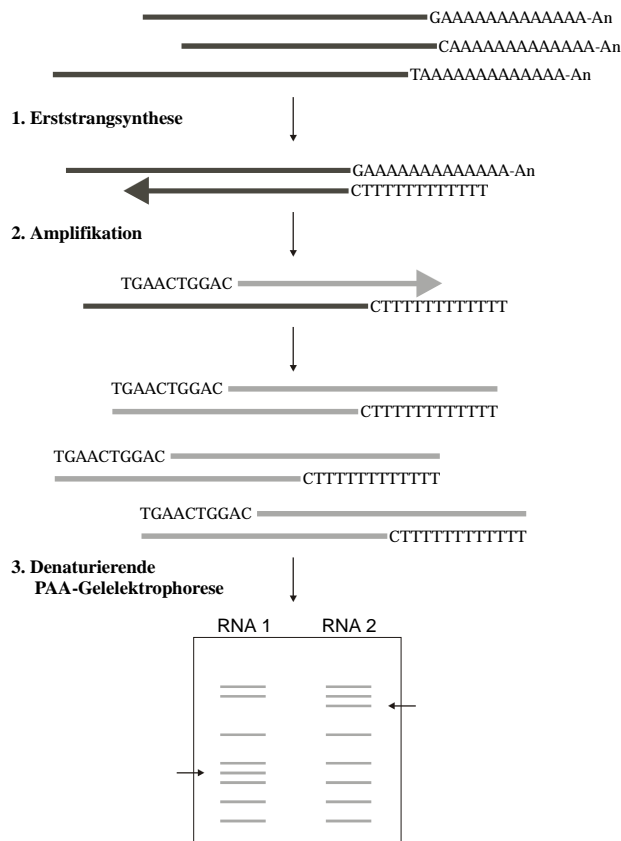


Abbildung 2.1: Darstellung des Versuchsablaufs beim *differential display* (nach Liang und Pardee, 1995). Der Erststrangsynthese (1) mit einem einfach verankerten oligo(dT)-*primer* (hier: T11C) folgt die Bildung des komplementären Stranges. Er entsteht durch Verlängerung eines willkürlich gewählten Dekamer-Oligonukleotids, das in der radioaktiven PCR (2) als *primer* fungiert. Die entstehenden PCR-Produkte sind radioaktiv markiert (angedeutet durch die graue Farbe) und können nach denaturierender Polyacrylamidgелеlektrophorese (3) autoradiografisch detektiert werden. So entstehen cDNA-Bandenmuster, die einen Teil der untersuchten RNA-Population repräsentieren. Ein Vergleich der Bandenmuster verschiedener RNA-Populationen ermöglicht die Isolation und Charakterisierung differenziell auftretender cDNA-Fragmente (durch Pfeil angedeutet).

2.9.1 Erststrang-Synthese (reverse Transkription)

Die aus den zu untersuchenden Nierengewebe isolierten und DNA-freien RNAs (vgl. Kap. 2.2.2) wurden mit Hilfe der reversen Transkriptase (RT) in cDNA umgeschrieben. Durch die Verwendung einfach verankerter oligo(dT)-*primer* (mögliche Varianten: T₁₁-A, T₁₁-G, T₁₁-C) erfolgte dabei eine Aufteilung der Gesamt-RNAs in drei Populationen. Nach Optimierung der Methodik wurden für die Erststrangsynthese beim *differential display* 0,5 µg RNA der zu untersuchenden Gewebe in 7,5 µl DEPC-Wasser eingesetzt. Nach einer initialen Denaturierung der RNA für 10 min bei 70°C wurden die Reaktionsansätze auf Eis für 1 min abgekühlt und 11 µl eines cDNA-Synthesemix ohne RT (s.u.) zugegeben. Durch die Zugabe von 1,5 µl RT bzw. 1,5 µl Wasser (Negativkontrollen) wurde die Erststrangsynthese gestartet und für 1 h bei 37°C inkubiert. Die anschließende Inaktivierung der RT erfolgte durch Inkubation der Ansätze bei 94°C für 10 min. Die so behandelten Reaktionsansätze wurden bis zur Weiterbearbeitung bei -20°C aufbewahrt.

cDNA-Synthesemix (differential display):

4,0 µl	5x 1st strand buffer (Fa. GibcoBRL, Eggenstein)
2,0 µl	DTT (0,1 M; Fa. GibcoBRL, Eggenstein)
1,0 µl	RNase Inhibitor (20 U/µl; Fa. MBI Fermentas, USA)
2,0 µl	oligo(dT) ₁₁ -N (25 µM; N= A, G oder C)
2,0 µl	dNTP-Gemisch (200 µM je dNTP).

Zur frühzeitigen Detektion falsch positiver Signale (vgl. Kap. 4.2) wurden mit jedem untersuchten Gewebe zwei genau gleich behandelte Erststrangsynthesen durchgeführt, die beide den folgenden Reaktionsschritten unterworfen wurden.

2.9.2 Amplifikation der cDNA mittels radioaktiver PCR

Die Amplifikation transkriptspezifischer cDNA-Fragmente erfolgte mittels PCR unter Einbau eines radioaktiven Nukleotids. Dabei unterscheiden sich die Reaktionsansätze beim *differential display* von der Standard-(RT-)PCR (vgl. Kap. 2.4 bzw. 2.5) vor allem durch die geringere Konzentration von Nukleotiden, die aus Gründen der Spezifität und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse innerhalb der *differential display*-PCR (DD-PCR) möglichst niedrig gehalten werden sollte (Liang und Pardee, 1992). Nach Optimierung der Methode wurde eine Konzentration von 2 µM je Nukleotid im Reaktionsansatz gewählt. Weitere Unterschiede zwischen DD-PCR und Standard-PCR sind die Verwendung von Dekamer-Oligonukleotiden und oligo(dT)₁₁-N Oligonukleotiden (N= A, G oder C) als *primer*, sowie die aus deren niedriger Schmelztemperatur resultierende niedrige Hybridisierungstemperatur. Insgesamt enthielt ein DD-PCR Ansatz die folgenden Komponenten:

2,0 µl	cDNA (aus 2.9.1)
2,0 µl	10x PCR-Puffer (mit MgCl ₂ ; Fa. Boehringer, Mannheim)
1,0 µl	Dekamer Oligonukleotid (10 µM)
2,0 µl	oligo(dT) ₁₁ -N (20 µM; N= A, G oder C entsprechend der cDNA)
2,0 µl	dNTP-Gemisch (20µM je Nukleotid)
1,0 µl	α[³² P]dCTP (2/3 µCi/µl; Fa. Amersham, Braunschweig)
0,25 µl	Taq DNA-Polymerase (5 U/µl; Fa. Boehringer, Mannheim)
ad 20,0 µl	Wasser.

Nach Überschichtung mit einem Tropfen Mineralöl (Fa. Sigma, Deisenhofen) wurde die Reaktion in einem *TC-1 DNA-Thermal Cycler* (Fa. Perkin-Elmer, Weiterstadt) durchgeführt. Das dabei verwendete Programm umfasste einen initialen Denaturierungsschritt von 4 min bei 94°C, dem 40 Zyklen eines Hauptprogramms (45 sek/94°C, 2 min/40°C, 1 min/72°C) und eine finale Inkubation für 7 min bei 72°C folgten.

2.9.3 Auftrennung der radioaktiv markierten PCR-Produkte mittels denaturierender Polyacrylamidgelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte aus Kap. 2.9.2 erfolgte unter denaturierenden Bedingungen über ein vertikales 6%iges Polyacrylamidgel (ca. 0,2 mm dick) mit 7M Harnstoff unter Verwendung von 1x TBE als Laufpuffer. Zu diesem Zweck wurden 100 ml einer Gellösung bestehend aus 7M Harnstoff (Fa. Roth, Karlsruhe), 6% Acrylamid (Stammlösung 30% Acrylamid/0,8% Bisacrylamid; Fa. Roth, Karlsruhe) und 1x TBE vorgelegt und die Polymerisation durch Zugabe von 80 µl TEMED und 500 µl einer 10%igen Ammoniumpersulfatlösung gestartet. Die Gellösung wurde anschließend zwischen zwei Glasscheiben (eine mit Thermofolie beschichtete Glasscheibe zur Gewährleistung einer gleichmäßigen Temperaturverteilung, eine mit Dichlordimethylsilan behandelte Glasscheibe) gegossen und die Polymerisation abgewartet. Vor dem Auftragen der Proben wurden je 2,0 µl der Ansätze aus 2.9.2 mit 3 µl Formamidpuffer versetzt, 5 min hitzedenaturiert, danach sofort auf Eis inkubiert und auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung der DD-PCR-Produkte wurde bei 40 Watt in einer Zeit von ca. 4 h vorgenommen. Danach wurde die mit Dichlordimethylsilan behandelte Glasplatte abgehoben und das Gel mit Hilfe von einseitig polyethylenbeschichtetem Papier (Polytrap 296 FE; Fa. Schleicher & Schuell, Dassel) von der Spiegelplatte abgezogen. Das einseitig in Klarsichtfolie gehüllte Gel wurde anschließend in einer Autoradiografiekassette 16-24 h bei 4°C auf einem Röntgenfilm inkubiert und der Film danach entwickelt.

2.9.4 Fragmentgewinnung und Reamplifikation differenziell exprimierter cDNAs

Im Autoradiogramm differenziell auftretende Banden wurden unter Zuhilfenahme des Röntgenfilms aus dem Polyacrylamidgel ausgeschnitten und für 16-20 h bei Raumtemperatur in 200 µl 1/4x TE in ein Reaktionsgefäß gegeben. Dieser Schritt dient dazu, einen Teil der DNA durch Diffusion aus dem PAA-Gelstück zu eluieren. Nach Überführen der 200 µl Elutionslösung in ein neues Reaktionsgefäß wurde die DNA einer Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol- und einer Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion unterzogen, mit EtOH und Natriumacetat gefällt (vgl. Kap. 2.2.4) und in 10 µl Wasser aufgenommen. Die so extrahierten DNA-Fragmente wurden anschließend in zwei aufeinanderfolgenden PCR-Reaktionen reamplifiziert. Zu diesem Zweck wurden 5 µl des DNA-haltigen Eluats in einem Gesamtvolumen von 50 µl unter Anwesenheit von je

125 pmol der entsprechenden *primer*, 200 μ M dNTP-Gemisch und 1 U Taq DNA-Polymerase (Fa. Boehringer, Mannheim) dem folgenden Programm unterzogen:

35 Zyklen à 4 min / 94°C
 45 sek / 94°C, 2 min / 40°C, 1 min / 72°C
 7 min / 72°C.

Die zweite Reamplifikation erfolgte unter gleichen Bedingen mit 10 μ l der ersten Reamplifikationsansätze als Matrize. Der Erfolg der Extraktions- und Reamplifikationsschritte wurde durch anschließende Agarosegelelektrophorese (vgl. Kap. 2.2.6) von 5 μ l der zweiten Reamplifikationsreaktion überprüft.

2.10 Untersuchung von Protein/DNA-Interaktionen

2.10.1 Herstellung von Proteinextrakten aus Zellkernen

Für Gelretardationsexperimente wurden Gesamtzellextrakte von WCCS1- und 293-Zellen, die in T25-Kulturflaschen ausgesät worden waren, hergestellt. War der Zellrasen zu 70-80% konfluent wurde das Medium entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen mit einem Gummispatel in ca. 1 ml PBS abgeschabt und die erhaltene Zellsuspension für 10 sek bei 13000 rpm und Raumtemperatur in einer Tischzentrifuge pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und der Zelniederschlag in 400 μ l Puffer 1 (10 mM HEPES/KOH, pH 7,9; 1,5 mM MgCl₂; 10mM KCl; 0,5 mM DTT; 0,2 mM PMSF) resuspendiert (DTT und PMSF wurden erst kurz vor Gebrauch zugesetzt). Nach 10 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen kurz und heftig aufgeschüttelt und anschließend für 10 sek unter den oben beschriebenen Bedingungen zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen und der zelluläre Niederschlag wurde je nach Volumen in 20-50 μ l Puffer 2 (20 mM HEPES/KOH, pH 7,9; 1,5 mM MgCl₂; 420 mM NaCl; 0,2 mM EDTA; 25% Glycerin; 0,5 mM DTT; 0,2 mM PMSF) aufgenommen. Nach 20 min Inkubation auf Eis wurde die Zellsuspension für 2 min bei 13000 rpm und 4°C in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde auf Eis aliquotiert und bei -70°C aufbewahrt.

2.10.2 Gelretardationsexperimente (*band shift*/EMSA)

Die Gelretardationsanalyse (Fried und Crothers, 1981) beruht auf der Tatsache, daß sich das Laufverhalten eines DNA-Fragments in einem nativen Polyacrylamidgel ändert, wenn Proteine an das DNA-Fragment binden. So wandert freie, ungebundene DNA in einer Elektrophorese schneller durch die Gelmatrix, als mit Proteinen komplexierte DNA. Durch

radioaktive Markierung der auf Proteinbindung zu untersuchenden DNA kann im Anschluss die Detektion von DNA-Protein-Komplexen durch Autoradiografie erfolgen. Die Unterscheidung spezifischer und unspezifischer Protein-DNA-Wechselwirkungen wird durch Einbringen von nicht radioaktiv markierter DNA in die Bindungsreaktion bewerkstelligt (Kompetitionsexperimente). Dabei unterscheidet man die unspezifische Kompetition von der spezifischen. Im Falle der unspezifischen Kompetition wird unmarkierte, unspezifische DNA (z.B. poly[dIdC]-DNA) im Überschuss dem Bindungsansatz zugesetzt. Dies hat zur Folge, dass aus unspezifischen Protein-DNA-Wechselwirkung resultierende retardierte Banden verschwinden, während eine durch spezifische Bindung eines Proteins an die DNA zustandekommende Bande die Kompetition übersteht und in der Autoradiografie sichtbar bleibt. Mit Hilfe der spezifischen Kompetition lassen sich aus spezifischen Protein-DNA-Wechselwirkungen resultierende Banden nachweisen. Banden, die aus einer spezifischen Bindung von Protein an DNA entstehen, verschwinden bei Zugabe unmarkierter DNA mit der für die Bindung relevanten Nukleotidsequenz, während unspezifische Bindungen kaum anfällig für einen spezifischen Kompetitor sind. Im Falle einer Quantifizierung lassen sich auch Aussagen über die Affinität einer solchen Wechselwirkung machen. Die Identität des bindenden Proteins innerhalb eines Protein-DNA-Komplexes kann – außer durch die Art der kontaktierten Nukleotidsequenz - mit Hilfe sogenannter *supershift*-Experimente erfolgen. Dabei wird durch Zugabe eines gegen das bindende Protein gerichteten Antikörpers die DNA-Bindung ausgelöscht (Bande verschwindet) oder aber (wie im Falle der verwendeten α SP1- und α SP3-Antikörper; Dennig *et al.*, 1995) die retardierte Bande wird zusätzlich in ihrer Mobilität eingeschränkt (die Bande verschwindet und es taucht eine neue Bande weiter oben im Gel auf).

Für alle DNA-Bindungsanalysen wurden die folgenden Reaktionsbedingungen pro Reaktionsansatz eingehalten:

<u>Gesamtvolumen 15-20μl:</u>	10.000-30.000	cpm	markierte DNA (vgl. Kap. 2.6.3)
	1	μ g	poly (dIdC)-DNA
	100	ng	Kalbthymus-DNA
	0,1-5	μ l	Proteinextrakt (aus 2.10.1)
	ad 15(-20)	μ l	EMSA-Bindungspuffer

Die Inkubation von DNA und Proteinen erfolgte für 10-15 min auf Eis nach getrenntem Einpipettieren der jeweiligen Komponenten (ohne die radioaktiv markierte DNA) in 1,5 ml Eppendorff-Reaktionsgefäße und vorsichtigem Mischen durch Auf- und Abpipettieren der Proben. Nach dieser Präinkubation wurde die zu untersuchende DNA zugegeben, es wurde erneut vorsichtig gemischt und die entstandenen Ansätze für weitere 10-15 min auf Eis

inkubiert. Danach wurden die Ansätze zusammen mit je 0,5 µl DNA-Probenpuffer auf einem nativen Polyacrylamidgel (5% PAA; 30:0,8 AA:BisAA) mit 1x TBE als Laufpuffer bei 80-120 V für ca. 5h aufgetrennt. Der anschließenden Trocknung folgte die Darstellung der Banden in einer Autoradiografie.

2.11 Immunologischer Proteinnachweis

2.11.1 Auf Gewebeschnitten (Immunhistochemie)

Die zelltypspezifische Expression von TCF2 im fetalen Nierengewebe wurde mit Antikörpern, die gegen den NH₂-Terminus des Proteins gerichtet sind, durchgeführt (#sc-6550, HNF1β [N-19]; Fa. Santa Cruz, USA). Für die immunhistochemische Proteindetektion wurde das zu untersuchende Gewebe so frisch und so steril wie möglich entnommen und bei -70°C bis zum Gebrauch ohne weitere Fixierung gelagert. Von dem so vorbereiteten Gewebe wurden in gewünschter Orientierung 7-10 µm dicke Schnitte am Kryostat angefertigt, auf Objektträger übertragen und über Nacht (6-16 h) bei -20°C in Methanol/EGTA fixiert. Danach wurde die gewebeinterne endogene Peroxidase durch ein Gemisch von 59,5% PBS/40% Methanol/0,5% H₂O₂ für 30 min bei Raumtemperatur blockiert. Nach zwei Waschschritten von je 10 min in H₂O und 1x PBS und einem 30 minütigen Pufferschritt in PBS/Schafserum (10:1) wurde der Antikörper gegen das zu lokalisierende Protein in einer Konzentration von 1:100 bzw. 1:200 in PBS für eine Stunde bei Raumtemperatur auf den Objektträgern in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurden die Gewebeschnitte 3x5 min in PBS gespült und dann für 30 min mit einem biotinylierten polyklonalen anti-Ziege-Antikörper (Fa. Sigma, Deisenhofen) in der Konzentration von 1:100 in PBS verdünnt überschichtet. Nach erneutem Waschen der Objektträger in PBS wurden die gebundenen Antikörper in 1%iger Lösung AB (ABC-Kit der Fa. Vector Laboratories, USA) in PBS mit einer Peroxidase für 20 Minuten komplexiert. Nach kurzem Spülen (in PBS) erfolgte der Nachweis spezifisch gebundener Antikörper durch eine 30 sek-4 min Inkubation in Diaminobenzidin (DAB)-Färbelösung. Im Anschluss daran wurde die Farbreaktion durch kurzes Waschen der Objektträger in 1x TE-Puffer abgestoppt und die hybridisierten Gewebeschnitte nach kurzem Wässern in HE gegengefärbt. Das Eindeckeln der gefärbten Schnitte erfolgte nach Durchlaufen einer aufsteigenden Ethanolreihe (70%, 90%, 100%) mit *Vectrashield Mounting Medium* (Fa. Vector Laboratories, USA).

2.11.2 Im Western blot

2.11.2.1 Denaturierende diskontinuierliche Polyacrylamidgelelektrophorese

Die SDS-Gelelektrophorese (Laemmli, U. K, 1970) bietet die Möglichkeit zur Trennung von Proteinen aufgrund ihrer relativen Molekülmasse. Natriumdodecylsulfat (SDS) in Gelmatrix und Probenpuffer führt dabei zu einer Denaturierung der aufzutrennenden Proteine unter gleichzeitiger Einführung vieler negativer Ladungen. Die Konsequenz ist, dass weder die native Form der Proteine noch deren Eigenladung, sondern lediglich ihr Molekulargewicht die Wanderungsgeschwindigkeit durch die Gelmatrix bestimmt. Die Verwendung diskontinuierlicher Gele führt durch einen Fokussierungseffekt zu einer Konzentration des anfänglich aufgetragenen Proteingemisches in einer scharfen Zone, so dass alle Proteine gleichzeitig in die trennende Gelmatrix einlaufen.

Für Proteingelelektrophoresen wurden Minigelapparaturen der Fa. BioRad (München) mit 1 mm dicken Abstandhaltern verwendet. Zunächst wurde das Trenngel (10-15% PAA) gegossen und mit 1 ml wassergesättigtem Butanol überschichtet. Nach der Polymerisation wurde das Butanol entfernt und das Sammelgel, welches die Auftragstaschen enthält, auf das Trenngel gegossen. Die Trenn- und Sammelgelzusammensetzungen waren dabei wie folgt:

<u>Trenngel (10% PAA):</u>	5,7 ml	30% Acrylamidstammlösung
	3,75 ml	4x Tris-HCl/SDS, pH 8,8
	3,75 ml	Wasser
<u>Sammelgel (4% PAA):</u>	0,65 ml	30% Acrylamidstammlösung
	1,25 ml	4x Tris-HCl/SDS, pH 6,8
	3,15 ml	Wasser

Die Proteinproben wurden mit 6x SDS-Probenpuffer (zu einer Endkonzentration von 1x) versetzt und vor dem Auftragen auf das Gel durch Kochen für 5-10 min denaturiert. Als Größenstandard dienten 10 µl eines Gemisches angefärbter Proteine (*broad range molecular weight marker*, Fa. NEB, USA), die ebenfalls durch Kochen denaturiert wurden. Die Elektrophorese erfolgte bei 10-30 mA für 2-3 h in 1x SDS-Laufpuffer.

Zum Färben der Proteinbanden im Gel wurde dieses für ca. 1 h in einer Petrischale mit Proteinfärbelösung (*coomassie brilliant blue*) unter leichtem Schwenken inkubiert. Das Entfärben der Gelmatrix erfolgte in einer Entfärbelösung (10% Essigsäure/10% Methanol) bis sich die Proteinbanden gut vom Hintergrund abhoben. Anschließend wurde das Gel bis zum Fotografieren in Wasser aufbewahrt.

2.11.2.2 *Transfer gelelektrophoretisch aufgetrennter Proteine auf Membranen und immunologischer Nachweis*

Der Transfer von Proteinen aus einem SDS-PAA-Gel (vgl. Kap. 2.11.1) auf eine Nitrozellulosemembran (\varnothing 0,45 μm , Fa. Schleicher&Schuell, Dassel) erfolgte in einer *Tank Blot*-Apparatur der Firma BioRad (München) unter Verwendung des Towbin Puffersystems. Zu diesem Zweck wurden zunächst zwei Whatman 3MM-Papiere sowie die Nitrozellulosemembran auf die Größe des Trenngels zurechtgeschnitten. Danach erfolgte der Aufbau des *blots* auf der Kathodenseite des Gelhalters in der Reihenfolge 3MM-Papier (in Towbin-Puffer angefeuchtet), Proteingel, Nitrozellulosemembran (beide ca. 15 min in Towbin-Puffer inkubiert), 3MM-Papier (in Towbin-Puffer angefeuchtet). Der so aufgebaute *blot* wurde zwischen zwei Schaumgummimatten im Gelhalter fixiert und in die Transferapparatur eingesetzt. Nach Auffüllen der Apparatur mit Towbin-Puffer erfolgte die Gelelektrophorese entweder für 16-20 h (über Nacht) bei konstant 100 V oder für 3 h bei konstant 300 V jeweils bei Raumtemperatur. Zur gleichmäßigen Temperaturverteilung im Transferpuffer wurde dieser ständig durch Rühren vermischt. Der Erfolg des Transfers wurde durch Kontrolle des angefärbten Protein-Größenmarkers beurteilt.

Zum immunologischen Nachweis der Proteine erfolgte eine Inkubation der Nitrozellulosemembran zunächst für 2–20 h in PBS/0,1% Tween/5% Magermilchpulver (PBS/T/M) auf einem Kippschüttler bei Raumtemperatur. Danach wurde der 1:100-1:1000 in PBS/T/M verdünnte Erstantikörper zugegeben (zur Verringerung des benötigten Flüssigkeitsvolumens wurde die Membran samt Antikörper-Lösung in eine Plastiktüte eingeschweißt), und es wurde für weitere 2 h bei Raumtemperatur unter Schwenken inkubiert. Hieran schlossen sich 6 Waschschrte in PBS/0,1% Tween (PBS/T) an (Gesamtwaschzeit 30 min), worauf die Bindung des Zweitantikörpers (Maus-anti-Kaninchen-IgG-POD, 1:1000 verdünnt in PBS/T/M; Fa. Boehringer, Mannheim) für 1 h bei Raumtemperatur folgte. Im Anschluss daran wurde die Membran 6x 5 min mit PBS/T und 2x 5 min mit PBS gewaschen. Die Farbreaktion wurde durch Zugabe von 50 ml DAB-Färbelösung gestartet und nach einem geeigneten Zeitraum (1-2 min) durch Wasser abgestoppt. So behandelte Nitrozellulosefilter wurden luftgetrocknet und bis zur Dokumentation dunkel aufbewahrt.

2.12 **Expression und Isolation rekombinanter Proteine in Bakterien**

Ein Plasmid zur Expression des GST-TM7-Fusionsproteins (pGST-TM7; vgl. Kap. 3.2.4.8) wurde mit Hilfe von Standard-Klonierungstechniken (vgl. Kap. 2.3) synthetisiert. Kompetente *E. coli*-Bakterien vom Stamm DH5 α wurden mit 1-2 ng Plasmid transformiert

und ein positiver Klon isoliert. Zur Expression und Reinigung des rekombinanten Proteins wurde eine 1 l Kultur in LB-Medium (mit Ampicillin) angesetzt und diese bei 37°C bis zu einer OD (600nm) von 0,4-0,5 unter Schütteln inkubiert. Es folgte die Induktion der Proteinexpression durch die Zugabe von IPTG zu einer Endkonzentration von 0,01% (w/v) und eine weitere Inkubation bei 37°C für 4 h. Danach wurden die Bakterien durch Zentrifugation bei 3000 upm und 4°C für 10 min pelletiert. Der bakterielle Niederschlag wurde in 10 ml 50 mM Tris-HCl/50 mM EDTA/15% Sucrose (pH 8,0) resuspendiert und die Suspension in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von Lysozym (zu einer Endkonzentration von 1 mg/ml) wurde die Suspension für 30 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurden 20 ml einer Lösung bestehend aus 0,2% Triton X-100 (v/v)/0,5 mM PMSF zugefügt und die Bakterien suspension stark geschüttelt. Ein weitergehender Zellaufschluss erfolgte durch sequenzielles Aufziehen des Lysats durch 20-, 22-, und 26 Gauge-Kanülen. Anschließend wurde das Bakterienlysat mit DTT (Endkonzentration 1 mM) und 2,5 ml Glutathion-Agarose (Fa. Sigma, Deisenhofen) über Nacht bei 4°C in einem Rotationsschüttler inkubiert. Die Agarose wurde danach abzentrifugiert und dreimal in eiskaltem Puffer A gewaschen. In der Folge wurde die Agarose in eine 5 ml-Spritze überführt, deren Boden mit silikonisierter Glaswolle bedeckt war, woraufhin nochmals mit 50-100 ml eiskaltem Puffer A gewaschen wurde. Die Elution des gebundenen Fusionsproteins erfolgte mit 10 ml eiskaltem Puffer A, dem Glutathion zu einer Endkonzentration von 25 mM zugesetzt worden war. Während der Elution wurden 1 ml-Fractionen gesammelt, von denen jeweils 20 µl im Rahmen einer SDS-Gelelektrophorese (vgl. Kap. 2.11.2.1) auf ihren Proteingehalt hin untersucht wurden. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden für nachfolgende Untersuchungen vereinigt.

Sollte der GST-Anteil des Fusionsproteins abgespalten werden, so wurde die zu verdauende Menge gegen 20 mM Hepes/150 mM NaCl/2,5 mM CaCl (pH 8,0) über Nacht bei 4°C dialysiert. Danach wurden 10 ml des GST-TM7-Fusionsproteins (0,5 mg/ml) mit 3 U Thrombin für 6 h bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von PMSF (zu einer Endkonzentration von 2 mM) wurde die erhaltene Lösung gegen 20 mM Hepes/150 mM NaCl/0,2 mM EDTA (pH 8,0) über Nacht bei 4°C dialysiert und bei -70°C eingefroren.

Zur Herstellung von Antikörpern gegen den extrazellulären Anteil von TM7SF1 in Kaninchen wurden etwa 0,7 mg des GST-TM7-Fusionsproteins (in Puffer A mit Glutathion) gegen 20 mM Ammoniumacetat (pH 7,4) bei 4°C über Nacht dialysiert und anschließend, nach Zugabe von 1% Sucrose gefriergetrocknet. Das so erhaltene gefriergetrocknete Fusionsprotein wurde im Rahmen einer bei der Firma Eurogentec (Belgien) in Auftrag gegebenen Immunisierung zweier Kaninchen eingesetzt. Präimmunsereum und polyklonales Antiserum, das nach Töten der Tiere gewonnen wurde, wurden dann in *Western-Blot* Experimenten (vgl. Kap. 2.11.2) auf das Vorhandensein

spezifischer Antikörper gegen das zur Immunisierung eingesetzte GST-TM7-Fusionsprotein, speziell gegen den TM7SF1-Anteil des Fusionsproteins, getestet.

2.13 Zellkultur

2.13.1 Verwendete Zelllinien

Bei den im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Zelllinien handelt es sich um 293 Zellen (humane embryonale Nierenzellen, transformiert mit Adenovirus 5 DNA; ATCC #CRL-1573) und die Zelllinie WCCS1 (humane Wilmstumorzelllinie; Talts *et al.*, 1993).

2.13.2 Kultivierung

Die verwendeten Säugerzellen wurden in T-Flaschen bei 37°C und 5% CO₂ in wassergesättigter Atmosphäre kultiviert. Als Nährmedium diente DMEM (Fa. Sigma, Deisenhofen), dem 10% hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum (FCS; Fa. Sigma, Deisenhofen), die Antibiotika Penicillin und Streptomycin (Endkonzentration 0,1 mg/ml; Fa. Sigma, Deisenhofen) sowie L-Glutamin (Endkonzentration 2 mM; Fa. Sigma, Deisenhofen) zugesetzt wurden. Zur Passagierung wurden die Zellen etwa alle drei Tage zunächst mit PBS und anschließend mit 1-3 ml Trypsin/EDTA-Lösung (Fa. Sigma, Deisenhofen) gewaschen. Einer anschließenden Inkubation für 1-3 min bei 37°C folgte das Abspülen der Zellen in frischem DMEM und die mechanische Vereinzelung. Anschließend wurde ca. ein Fünftel der Zellsuspension in frischem DMEM ausplattiert.

2.13.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Sollten Zellen über längere Zeit gelagert werden, so wurden sie nach Ablösen für 8 min bei 1200 upm abzentrifugiert und in DMEM/10% DMSO aufgenommen. Die Zellsuspension wurde anschließend in 1 ml Kryoröhrchen (Fa. Nalgene, USA) gegeben, danach zunächst für 2 Tage bei -70°C und anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren und dort aufbewahrt. Generell wurden so aus den Zellen einer 70-90% konfluenten T25-Kulturflasche ein Aliquot, aus den Zellen einer 70-90% konfluenten T75-Kulturflasche drei Aliquots Zellen hergestellt. Zum Auftauen wurden ein Aliquot eingefrorener Zellen kurz bei 37°C inkubiert und dann in T25-Kulturflaschen, in denen ca. 8 ml DMEM-Medium vorgelegt war, überführt.

2.13.4 Transiente Transfektion

Für die transiente Transfektion von 293- bzw. WCCS1-Zellen wurden 8×10^4 – $1,2 \times 10^5$ Zellen pro Vertiefung (*well*) einer 24 *well*-Schale in je 800 μ l DMEM ausplattiert und 24 h unter Routinekulturbedingungen kultiviert. Zur Transfektion wurden 2-3 μ g Plasmid-DNA (ein Gemisch der verschiedenen Reporter- und Expressionsplasmide; Gesamtplasmidmenge konstant innerhalb zu vergleichender Transfektionsansätze) unter Verwendung des *FuGENE 6 Transfection Reagent* (Fa. Boehringer, Mannheim) in die ausplattierten Zellen gebracht. Dazu wurden je geplantem Transfektionsansatz 4,0 μ l der *FuGENE*-Transfektionslösung in 96 μ l DMEM (ohne FCS) in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße pipettiert und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 100 μ l dieser Lösung tropfenweise zu in einem weiteren Eppendorf-Reaktionsgefäß vorgelegten 2,5 μ g DNA pipettiert und durch vorsichtiges Antippen des Reaktionsgefäßes gemischt. Der 15 minütigen Inkubation bei Raumtemperatur folgte das tropfenweise Zugeben der DNA/*FuGENE*-Lösung zu den in einer 24 *well*-Platte ausplattierten Zellen (800 μ l Medium pro *well*). Die Messung der Reporterexpression erfolgte wie in Kapitel 2.13.6 beschrieben nach 24-48 h Inkubation unter Routinekulturbedingungen.

2.13.5 Stabile Transfektion und Generierung stabil transfizierter Zellklone

Die stabile Transfektion eukaryontischer Zellen erfolgte mit der Methode der Elektroporation. Pro zu transfizierendem Expressionsplasmid wurden 5×10^6 Zellen (WCCS1- oder 293-Zellen) zweimal mit PBS gewaschen und in 500 μ l DMEM ohne jegliche Zusätze aufgenommen. Diese Zellsuspension wurde mit 10 μ g linearisierter (im Falle von pCMV- und pCMV-TCF2A) oder nicht linearisierter (im Falle von pCMV-TM7SF1L) Plasmid-DNA (in 100 μ l PBS gelöst) gemischt und in eine Elektroporationsküvette (Elektrodenabstand 4 mm; Fa. BioRad, München) überführt. Nach der Elektroporation mit einem *Gene Pulser*-Gerät mit Kapazitätserweiterung (Fa. BioRad, München) bei 300 Volt und 960 μ Fd (WCCS1-Zellen) bzw. bei 350 Volt und 960 μ Fd (293-Zellen) wurde die Zellsuspension in 8 ml vorgewärmtem DMEM (Routinekulturmedium mit allen Zusätzen) auf 10 cm-Schalen ausplattiert und für 1-2 Tage im Zellkulturinkubator inkubiert. Danach erfolgte die Selektion stabil transfizierter Zellen durch Zugabe von G418 zu einer Endkonzentration von 500 μ g/ml (WCCS1-Zellen) bzw. 1,2 mg/ml (293-Zellen) zum Kulturmedium (diese Endkonzentrationen von G418 im Kulturmedium wurden zuvor in einer Toxizitätsanalyse als jeweilige Konzentration ermittelt, bei der nach 14 Tagen alle nichttransfizierten Zellen tot sind). Diese Selektionsbedingungen wurden fortan 14 bis 21 Tage aufrechterhalten (Mediumwechsel

alle 2-3 Tage). Sobald Zellklone makroskopisch sichtbar wurden (Kolonien von 0,5-1 mm Durchmesser) erfolgte die Vereinzelung durch Aufnahme dieser Klone mit einer sterilen Pipette und Überführen in einzelne Vertiefungen einer 96 *well*-Platte. Die Zellen wurden durch Passagieren und Überführen in jeweils größere Zellkulturgefäße unter Selektionsbedingungen expandiert und, sobald genügend Zellen eines Klons (T75-Schale) erreicht wurden, als Dauerkultur tiefgefroren (vgl. Kap. 2.13.3). Im Falle der stabil mit dem Expressionskonstrukt pCMV- bzw. pCMV-TM7SF1L transfizierten 293-Zellen wurden, ausgehend von der initial angelegten 10 cm-Kulturschale, alle stabil transfizierten Zellen vereinigt (*gepoolt*) und als *Zellpool* expandiert und dauergelagert. Die Detektion der Transgen-Expression erfolgte mit Hilfe von *Northern*-Analysen (vgl. Kap. 2.7.4) bzw. RT-PCR-Experimenten (vgl. Kap. 2.5.2).

2.13.6 Reportergenanalysen (Luciferase-Assays)

Reportergenanalysen wurden unter Zuhilfenahme des *Dual Luciferase Reporter Assay System*- bzw. des *Luciferase Assay System-Kits* (beide Fa. Promega, Mannheim) durchgeführt. Dabei wurden 100µl-Zellysate mit den entsprechenden Puffern der Kits gemäß den Angaben des Herstellers angelegt, von denen 5-20 µl für die Quantifizierung im Luminometer (Lumat LB9507; Fa. Berthold, Wildbad) eingesetzt wurden. Die Normalisierung der einzelnen Transfektionsansätze auf die Transfektionseffizienz erfolgte durch den in allen Ansätzen einer Transfektionsreihe in konstanter Menge eingesetzten (ca. 10 ng) Renilla-Luciferase Expressionsvektor mit Thymidinkinase-Promotor (Fa. Promega, Mannheim) oder einen RSV-βGal Expressionsvektor (dann unter Zuhilfenahme des *β-Galactosidase Enzyme Assay System-Kits*; Fa. Promega, Mannheim).

2.14 Computergestützte Analyse von DNA- und Proteinsequenzen

DNA Sequenzdaten wurden in der Regel mit Hilfe der Sequencher 3.0 Software (Fa. Gene Codes, USA) computergestützt editiert.

Überlappende Sequenzdaten wurden mit Hilfe des Sequencher-Programmes nach auszuwählenden Überlappungskriterien angeordnet. In der Regel wurde eine 90%ige Übereinstimmung überlappender Bereiche bei einer Mindestüberlappung von 20 bp als Kriterium gesetzt. Das Program ermöglichte sowohl die grafische Darstellung so erhaltener Überlappungen, wie auch die Generierung der entsprechenden DNA Sequenz als zusammenhängende Basenabfolge.

Homologievergleiche zu analysierender Nukleotidsequenzen mit öffentlichen Datenbanken (nicht redundante Gendatenbank, EST-Datenbank, SwissProt Proteindatenbank, *high throughput genomic sequence* [htgs]-Datenbank; alle über Internet zugänglich unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) wurden mit den Programmen BLASTN (Vergleich von Nukleotidsequenzen mit Einträgen von Nukleotidsequenzdatenbanken) und BLASTX (Übersetzung einer Nukleotidsequenz in alle sechs möglichen Aminosäurekodierungen und anschließender Vergleich mit Einträgen in Protein-Datenbanken) (Altschul *et al.*, 1990, 1997) durchgeführt. Die Erweiterung bekannter Nukleotidsequenzinformation erfolgte entweder durch sequenzielle BLASTN-Analysen der EST-Datenbank, oder aber durch Homologievergleiche mit Einträgen der *Unigene*-Datenbank (im Internet zugänglich unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/unigene>).

Proteinvorhersagen (putativer) Genprodukte basierend auf Nukleotid-Sequenzen wurden ebenfalls über das Internet durchgeführt. Hierzu wurde der "ExPASy-proteomics-server" (*Expert Protein Analysis System*) des Schweizer Instituts für Bioinformatik genutzt (verfügbar im Internet unter <http://www.expasy.ch>). Diese Adresse stellt Algorithmen zur Verfügung, die sowohl die *in silico*-Translation von Nukleotidsequenzen, wie auch die weitere Charakterisierung und Analyse der abgeleiteten Proteine (z.B. Struktur-, Lokalisations-, Gewichtsvorhersagen, bzw. die Erkennung funktionell bekannter Aminosäuremotive) ermöglichen.

2.15 Reagenzien und Materialien

2.15.1 Puffer, Lösungen und Kulturmedien

Alle Lösungen wurden mit deionisiertem, Millipore[®]-gereinigtem Wasser angesetzt und anschließend autoklaviert. Thermolabile Lösungen wurden sterilfiltriert (Sterilfilter 0,22 µm; Fa. Schleicher&Schuell, Dassel).

Agarplatten	15 g Agar-Agar ad 1 l LB- bzw. NZYDT-Medium
Antibiotika	Ampicillin Stammlösung: 50 mg/ml in H ₂ O Endkonzentration: 50-100 µg/ml Kanamycin Stammlösung: 25 mg/ml in H ₂ O Endkonzentration: 25 µg/ml
Church-Hybridisierungspuffer	1mM EDTA 0,5 M NaHPO ₄ , pH 7,2 7 % SDS 1 % BSA

DAB-Färbelösung	0,05 M Tris-HCl pH 7,4 1 mg/ml DAB 0,01% H ₂ O ₂
DNA-Denaturierungslösung	1,5 M NaCl 0,5 M NaOH
DNA-Neutralisierungslösung	0,5 M Tris-HCl, pH 7,0 1,5 M NaCl
DNA-Probenpuffer (6x)	0,25 % Bromphenolblau 0,25 % Xylencyanol 40 % Sucrose
DTM	je 100 µM dATP, dGTP, dTTP in 250 mM TrisCl 25 mM MgCl ₂ 50 mM β-Mercaptoethanol; (pH 7,0)
EMSA-Bindungspuffer	25 mM HEPES, pH 7,5 1 mM EDTA, pH 8,0 10 % (v/v) Glycerol 150 mM NaCl 5 µM ZnSO ₄ 0,5 mM PMSF (frisch zugeben) 5 mM DTT (frisch zugeben)
2x FM-Medium	65 % Glycerin 0,1 M MgSO ₄ 0,025 M Tris Cl (pH 8,0)
Formamidpuffer	10 mg Xylen Cyanol FF 10 mg Bromphenolblau 10 mM EDTA, pH 8,0 ad 10 ml Formamid (deionisiert)
LB-Medium	10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 10 g NaCl ad 1 l Wasser (pH 7,5)
Lysepuffer (5x)	62,5 mM EDTA 2,5 % SDS
MOPS (10X)	0,2 M 3(N-morpholin)-Propan-Sulfonsäure 0,05 M Na-Acetat 0,01 M EDTA; (pH 7,0)
NZYDT-Medium	21,1 g NZYDT-Pulver ad 1 l Wasser
OL	90 OD U 5`-pd(N ₆)/ml TE
OLB	1M HEPES/DTM/OL (25:25:7)

PBS	120 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM K-Phosphatpuffer; (pH 7,4)
Proteinase K-Puffer (10x)	3 M NaCl 0,5 M EDTA 1 M Tris Cl, pH 8,0
Puffer A	20 mM Hepes 100 mM KCl 0,2 mM EDTA 1mM DTT 0,5 mM PMSF 20% Glycerin (v/v); (pH 7,5)
RNA-Hydrolyselösung	50 mM NaOH 10 mM NaCl
RNA-Ladepuffer (10x)	500 µl Formamid (deionisiert) 100 µl 10x MOPS-Puffer 150 µl Formaldehyd (37 %)
RNA-Neutralisierungslösung	10x SSC 0,2 M Tris-HCl pH 7,4
RNA-Probenpuffer (1,5x)	61 µl Formaldehyd 150 µl Formamid (deionisiert) 37,5 µl 10x MOPS-Puffer 1,5 µl Wasser
6x SDS-Probenpuffer	4x Tris-HCl/SDS, pH 6,8 3,0 ml Glycerol 1 g SDS 0,93 g DTT 1,2 mg Bromphenolblau ad 10 ml Wasser
SM-Medium	0,1 M NaCl 50 mM Tris-HCl, pH 7,5 8 mM MgSO ₄ 0,1 % Gelatine
SOB-Medium	20 g Trypton 5 g Hefeextrakt 0,58 g NaCl 0,16 g KCl ad 1 l Wasser; (pH 7,0)
SSC-Puffer (10x)	1,5 M NaCl 0,15 M Natriumcitrat; (pH 7,0)
STET L-Puffer	50 mM Tris, pH 8,0 50 mM EDTA 5% Triton X-100 8% Sucrose

1xTBE-Puffer	90 mM Tris 90 mM Borsäure 1,25 mM Na ₂ EDTA; (pH 8,3)
TE-Puffer (10x)	100 mM Tris-HCl; (pH 7,0-8,0) 10 mM EDTA (pH 8,0)
Tfb I	30 mM K Acetat 50 mM MnCl ₂ 100 mM KCl 10 mM CaCl ₂ 15 % Glycerin; (pH 5,8 mit Essigsäure)
Tfb II	10 mM NaMOPS, pH 7,0 75 mM CaCl ₂ 10 mM KCl 15 % Glycerin
Towbin-Puffer	3,03 g Tris 14,4 g Glycin 200 ml Methanol ad 1 l Wasser
4x Tris-HCl/SDS, pH 6,8 / 8,8	0,5 M Tris-HCl 0,4 % SDS; (pH 6,8 bzw. pH 8,8)
2x YT-Medium	10 g NaCl 10 g Hefeextrakt 16 g Trypton ad 1 l Wasser

2.15.2 Enzyme

Alkalische Phosphatase	Fa. Boehringer (Mannheim)
DNaseI (RNase frei)	Fa. Boehringer (Mannheim)
Klenow DNA-Polymerase	Fa. NEB (USA)
M-MLV Reverse Transkriptase	Fa. GibcoBRL (Eggenstein)
Proteinase K	Fa. Boehringer (Mannheim)
Restriktionsendonukleasen	alle Fa. NEB (USA)
Ribonuclease Inhibitor	Fa. MBI Fermentas (USA)
RNase A	Fa. Boehringer (Mannheim)
T4 DNA-Ligase	Fa. GibcoBRL (Eggenstein)
T4 Polynukleotidkinase	Fa. NEB (USA)
Taq DNA-Polymerase	Fa. Boehringer (Mannheim)

2.15.3 Größenstandards

100 bp DNA-ladder	Fa. GibcoBRL (Eggenstein)
123-ladder	Fa. GibcoBRL (Eggenstein)
λDNA/HindIII-Fragments	Fa. GibcoBRL (Eggenstein)
RNA-ladder	Fa. GibcoBRL (Eggenstein)
broad range prestained protein marker	Fa. NEB (USA)

2.15.4 Bakterienstämme

DH5 α	F ⁻ , supE44, hsdR17, recA, Δ lacU169, (ϕ 80lacZ Δ M15), endA1, gyrA96, thi-1, relA1
C600hfl	hflA150 [chr::Tn10], lacY1, leuB6, mcrA ⁻ , supE44, the-1, thr-1, tonA21

2.15.5 Radioisotope

α [³² P]dCTP (3000 Ci/mmol)	Fa. Amersham (Braunschweig)
γ [³² P]ATP (1000 Ci/mmol)	Fa. Amersham (Braunschweig)

2.15.6 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien besaßen den Reinheitsgrad „reinst“ oder „pA“.

Acrylamid	Fa. Roth (Karlsruhe)
Agar-Agar	Fa. Difco (USA)
Agarose	Fa. Eurogentec (Belgien)
Ampicillin	Fa. Ratiopharm (Ulm)
DMEM	Fa. Sigma (Deisenhofen)
EDTA	Fa. Boehringer (Mannheim)
Ethanol	Fa. Riedel-de-Haen (Seelze)
Ethidiumbromid	Fa. Oncor (USA)
Glutathionagarose	Fa. Sigma (Deisenhofen)
Harnstoff	Fa. Roth (Karlsruhe)
Hefeextrakt	Fa. Difco (USA)
IPTG	Fa. Boehringer (Mannheim)
Kanamycin	Fa. Ratiopharm (Ulm)
Phenol	Fa. Roth (Karlsruhe)
Phenol/Chloroform	Fa. Roth (Karlsruhe)
SDS	Fa. ICN (USA)
Trypton	Fa. Difco (USA)
Tris	Fa. Roth (Karlsruhe)
Tris-HCl	Fa. Gerbu (Gaiberg)
X-Gal	Fa. Eurogentec (Belgien)

Alle nicht hier aufgeführten Chemikalien wurden von den Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva Feinbiochemika (Heidelberg) oder Sigma (Deisenhofen) bezogen.

2.15.7 Geräte

Agarosegelelektrophorese	Easy-Cast electrophoresis system (versch. Größen); Fa. Owl Scientific (USA)
Bakterieninkubatoren	Typ B5042; Fa. Heraeus (Hanau) Schüttelinkubator Lab-Therm; Fa. Kühner (Schweiz)
DNA-Sequenziergerät	ABI Prism TM 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	MR2002; Fa. Heidolph (Schwabach)
Hybridisierungssofen	Hybridiser HB-2; Fa. Techne (GB)
Luminometer	Lumat LB-9507; Fa. Berthold (Wildbad)
PCR-Geräte	TC-1 DNA-Thermal Cycler; Fa. Perkin Elmer (Weiterstadt) PTC 200 und PTC 100; Fa. MJ Research (USA)
Phosphoimager	Storm 840; Fa. Molecular Dynamics (Krefeld)
Photometer	Ultrospec III; Fa. Pharmacia (Freiburg)
Spannungsgeräte	LKB-GPS 200/400; Fa. Pharmacia (Freiburg) 2297 Macrodrive 5; Fa. LKB Bromma (USA)
Sterilbänke	DLF/BSS-6; Fa. Cleanair (Deutschland) Antair BSK
Szintillationszähler	Liquid Scintillations Counter Wallace-1410; Fa. Pharmacia (Freiburg)
Vakuumtrockner	Univapo 100H, Refrigerated Aspirator; Fa. Uni-Equip (Martinsried)
Wasserbäder	2219 MultitempII; Fa. LKB Bromma (USA) F10; Fa. Julabo (USA) Certomat WR; Fa. Braun (Melsungen)
Zellkulturinkubator	IR 1500 Automatic CO ₂ Inkubator; Fa. Flow Laboratories(USA)
Zentrifugen	Biofuge A; Fa. Heraeus (Hanau) Zentrifuge 5415C; Fa. Eppendorf (Hamburg) Kühlzentrifuge 5804R; Fa. Eppendorf (Hamburg) Zentrifuge EBA12P; Fa. Hettich (Tuttlingen) Zentrifuge 3K12; Fa. Sigma (Deisenhofen) Sorvall RT 6000D und RC5C; Fa. Du Pont (USA)

2.15.8 Verwendete Oligonukleotide (*primer* und *band shift*-oligos)

Vektorprimer:

T3	5-ATT AAC CCT CAC TAA AGG G-3
T7	5-AAT ACG ACT CAC TAT AGG G-3
λgt10-I	5-AGC AAG TTC AGC CTG GTT AAG T-3
λgt10-II	5-TTA TGA GTA TTT CTT CCA GGG-3

Primer differential display:

T11A	5-TTT TTT TTT TTA-3
T11G	5-TTT TTT TTT TTG-3
T11C	5-TTT TTT TTT TTC-3
10-1	5-AAT CGT CCA T-3
10-2	5-GGT AAC TTT A-3
10-3	5-TGA CGC TAA G-3
10-4	5-CTT GAT TGC C-3
10-5	5-CTG ATC CAT G-3
10-6	5-TGA ACT GGA C-3
10-7	5-CAG AAC ACC A-3
10-8	5-GAA ATG GCT G-3
10-9	5-TGG CAA TCT G-3
10-10	5-AAG GAG GAA G-3
10-11	5-GGG AGG GAG G-3

Primer zur Weiterbearbeitung der DD-Fragmente:

FE7A2-L	5-ACA TGA CGA GAG GAA GCA AG-3
FE7A2-R	5-GAC GTG CAA ACA TAT CTC CC-3
FE7A3-L	5-AGG ACA GAG GGA ACC AAG AC-3
FE7A3-R	5-GGA GAA GGA AAA GGA GAT GC-3
FE7A5-L	5-TAC CCC CAT ATA CAG GGT CC-3

FE7A5-R	5-AGA AGA GGA GGA CAT CCC AT-3
FE7A6-L	5-AGA ATG AAG GGA GCT GGG AAT-3
FE7A6-R	5-CAG AAG AGG ACC AAG ATG AAC A-3
FE10A2-L	5-AGG AAG GAC GCA CAA ACA C-3
FE10A2-R	5-GTT GCC AGA CCT GTC GAG-3
FE10A3-L	5-AGG GAC AGA AGT AGA CAG GGA-3
FE10A3-R	5-CCA CAT AGC GAG TAA ATG GC-3
105N6A1-L	5-AGT GTC TAG CAC ATG ATG GG-3
105N6A1-R	5-AAC CAC CAG GGG TAG ATT AG-3
105N10C2-L	5-GAA CAG GGC CCT TTC CAA TG-3
105N10C2-R	5-ACA CGA GTC CCC TAA ATG TC-3
146TU6A2-L	5-TGC TAT GAG GGT GTC ATT GCT-3
146TU6A2-R	5-AAT TTG TGA GCT GTC CTG AC-3
151TU6C2-L	5-ACT GGA CAT GAG GGA AA GG-3
151TU6C2-R	5-CTG GTC TGG GAC CAT TCA TC-3

Primer für RT-PCR:

T16	5-TTT TTT TTT TTT TTT T-3
Aktin-A3	5-GAA GCA TTT GCG GTG GAC GAT-3
Aktin-A5	5-TCC TGT GGC ATC CAC GAA ACT-3
GAPDH-1	5-CGT CTT CAC CAC CAT GGA GA-3
GAPDH-2	5-CGG CCA TCA CGC CAC AGT TT-3

Primer TM7SF1 und Tm7sf1:

gst-eco2	5-CGG AAT TCC CCG GCC GCG CGG CAT-3
gst-sal	5-GTA GTC GAC GGT GTA GAC GAC GGT GA-3
TM7-For	5-GTG AGC CCC GAT GAG GC-3
TM7-Rev	5-GAG GAA TCG TCC ATA AAA CTG-3
local-5	5-CGA TTC TGA GTG CCA CAT TG-3
local-3	5-TAG CGC CCT ACT GAA AGG AA-3
local-x	5-TTG CCC CTC TAC CTG GCC T-3
local-y	5-TGT AGA GAC AGA TGG AGA G-3
Phage-R	5-CTT CTG GCT GCT CTA CTG C-3
1AA1R	5-ATA CGT ATC CAG CAT CTC-3
5'For	5-AAG CTG TTA GTT TGT TGT CCC C-3
5'Rev	5-GGT ACA ATG TAT CAG ACC AGG C-3
MTM7-F1	5-GAA GTC CCT GAG GGG CAA TG-3
MTM7-S	5-TGA CAG TGA TGA TGA CCT TG-3
MTM7-AS	5-ATA CCC ACT GAA ATA GCC AG-3
MVER-1	5-CGA TGA AGC TCG AGC AGC-3
MVER-2	5-GCC ACG AAG TCT CGG AAG-3

Primer TCF2:

vHNF-L	5-CAG CCC GAA GCC CAG TTT CC-3
vHNF-R	5-CAG GGA TCC AGA GGT GTG TC-3
vHNF-R1	5-GTG CTT GGG AGG TGT TGA-3
vHNF-Ex3	5-CCA GAG TTC AGT CAA CAG-3
vHNF-Ex4	5-GAG CTA TAG GCG TCC ATG-3
vHNF-Eco	5-CAC CGA ATT CTC TCG CAC CCA CCC AC-3
vHNF-Xba	5-CCT TTC TAG AGC GCA CGA AGT AAG TGG TG-3
TCF2Ex1v-F	5-CTC CCC ACC ATC ATT TGC AT-3
TCF2Ex1v-R	5-ACC AGC ACC TCC TTG GTG AC-3
TCF2Ex1h-F	5-GTC CAA GCT CAC GTC GCT-3
TCF2Ex1h-R	5-AAA CGG GCT TGG CGA GTG-3
TCF2Ex2-F	5-AGA AAA AGA ATG TTT CTC CCC A-3
TCF2Ex2-R	5-GTG AGA GGG CAA AGG TCA CTT C-3
TCF2Ex3-F	5-AAA GGT GTC TTC GTC CGT TGT C-3
TCF2Ex3-R	5-GAG GGT TCC TGG GTC TGT GTA C-3
TCF2Ex4-F	5-TTT TTG GCC AAG CAC CAA-3
TCF2Ex4-R	5-AGT GAG CCC TCA CAG GGC-3
TCF2Ex5-F	5-GAC CCT GGT GGC ACT AA TGT TC-3
TCF2Ex5-R	5-TGC CTC TTA TCT TAT CAG CTC C-3

TCF2Ex6-F	5-TTG GAA ACT GCT CTT TGT GGT C-3
TCF2Ex6-R	5-TAA TTT GCT TCC CAT TCT TCT T-3
TCF2Ex7-F	5-CCA CCT CTC CTT ATC CCA GG-3
TCF2Ex7-R	5-GAA AGT GGT TGG CCA CTG AG-3
TCF2Ex8-F	5-GGG GGC TCT GTA CCT GTG TC-3
TCF2Ex8-R	5-ACA TCC ATG GCC TTA GTC AC-3
TCF2Ex8N-F	5-TGA GAA ATC CCC ACT ATA ACC A-3
TCF2Ex8N-R	5-AAA CAA CAG CGA GCC TCA GAA G-3
TCF2Ex9-F	5-GAG AAG CAA GAA AGC CGT A-3
TCF2Ex9-R	5-TTT ACA GCC ATT GGA CAA AT-3

Primer CDT151:

CDT151-3'L	5-GGA AGG GAA AAA GTT ACC CA-3
CDT151-3'R	5-TTG GAC GTT ATT CAT TGG CT-3
CDT151N-R1	5-ATG AAG AGG TAA TCC CAG-3
CDT151N-R2	5-CAC AGT TTT AGC TCT TGA CAC-3
CDT151N-R3	5-TCA TAC CAA ATG GCC AGA CAC-3
CDT151N-L5	5-GAC GAC GAA TCG GAC CCC TTC-3
CDT151N-L1	5-ACA TCG TGT CAA GTG AAG TAG-3
R34650-L	5-TGG CAG CTG ATG TTT CAG TG-3
CDT151.12	5-TGA AGC AGG CGC TCT TGG C-3
CDT151.13	5-TCT TTC TTA AGC GCC ACG GG-3
CDT151-6A1R	5-GTC ACA GGC TGA ACT TTG CT-3
CDT151-6A1L	5-CCC TGG GAT TAC CTC TTC AT-3

Primer GLI3, PTCH, SMOH, IGF2:

GLI3-L	5-CAC CCT CCT CAT CTT TTC CC-3
GLI3-R	5-CTG CTG ATG CAT GTG GAG AG-3
HPTC1	5-TTT CCA AGG GGA AGG CTA CT-3
HPTC2	5-TCC CAG ACT GTA ATT TCG CC-3
HSMO1	5-CTG TGT GCC GTA TAC ATG CC-3
HSMO2	5-GCA CGC ATT GAC GTA GAA GA-3
IGF2L	5-TGG CAT CGT TGA GGA GTG CT-3
IGF2R	5-TGG GTA GAG CAA TCA GGG GA-3

Band shift-oligos:

CTC-up	5-GAG CCT CCT GGC TCC TCC TCT TCC CCG CGC-3
CTC-lo	5-GCG CGG GGA AGA GGA GGA GCC AGG AGG CTC-3
RCE5-up	5-CAA CTC CCG GCC ACC CAA CTG AGG G-3
RCE5-lo	5-CCC TCA GTT GGG TGG CCG GGA GTT G-3
RCE3-up	5-GGA ACC CAC AAA GGG CCA CCT CTT TCC-3
RCE3-lo	5-GGA AAG AGG TGG CCC TTT GTG GGT TCC-3
GC-up	5-AGC TTC CGT TGG GGC GGG GCT TCA CGT CGA-3
GC-lo	5-TCG ACG TGA AGC CCC GCC CCA ACG GAA GCT-3

3 ERGEBNISSE

Projekte zur Identifikation von Kandidatengen für das Nephroblastom führten in der Vergangenheit zur Klonierung des *WT1*-Gens und zur Beschreibung weiterer Gene bzw. Genloci, die bei Mutation oder genomischer Aberration zum klinischen Krankheitsbild beitragen (vgl. Kap. 1.2). Die Initiation, Manifestation und Progression dieses embryonalen Tumors ist durch die bisher beschriebenen Gene jedoch nicht ausreichend erklärbar, und die Suche nach weiteren Genen, die mit der Tumorgenese assoziiert sind, ist notwendig. Im Gegensatz zu den klassischen Ansätzen des positionellen Klonierens von Kandidatengen sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein funktionelles Merkmal als Kriterium für Kandidaten im Vordergrund stehen: die differenzielle Genexpression während der Nierenentwicklung und Wilmstumorgenese. Solche Kandidatengene sollten mit Hilfe von zwei Strategien identifiziert werden. Erstens sollte durch Analyse der transkriptionellen Regulation des *WT1*-Gens Faktoren bzw. Bindungsstellen identifiziert werden, die an der Transkriptionskontrolle dieses für die Nierenentwicklung essenziellen Gens beteiligt sind. Die zu diesem Zweck durchgeführten Protein-DNA-Bindungsstudien (Gelretardationsanalysen) und Transfektionsexperimente sind in Kapitel 3.1 dargestellt. Die Experimente dienten der Etablierung der verwendeten Techniken im Labor, um sie gegebenenfalls auch auf andere Kandidatengene übertragen zu können. Zweitens wurden mit Hilfe der *differential display*-Technik die Genexpressionsprofile während der Nierenentwicklung und der Wilmstumorgenese vergleichend analysiert (vgl. Kap. 3.2). Dabei wurde der *differential display*-Technik der Vorzug gegenüber anderen Methoden zur Klonierung differenziell exprimierter Sequenzen (wie z.B. subtraktive Hybridisierung, SAGE, cDNA-Microarrays) gegeben, da nur sie es erlaubt, parallel mehr als zwei Expressionsprofile zu untersuchen. Der Vergleich verschiedener Gewebe und die Fokussierung auf musterhaft differenziell auftretende Transkripte erschien dabei insbesondere aufgrund der genetischen und histologischen Heterogenität des Wilmstumors essenziell.

3.1 Transkriptionelle Regulation des *WT1*-Gens

Das *WT1*-Genprodukt ist auf molekularer Ebene ein entscheidender Vermittler der Induktionsvorgänge, die im Zuge der Metanephrogenese ablaufen. Das diesem Zinkfinger-Transkriptionsfaktor zugrundeliegende Gen ist das einzige bisher identifizierte Kandidatengen für die Wilmstumorgenese. Im Gegensatz zur Regulation anderer

Tumorsuppressorgene (z.B. *RB* und *P53*), die eine eher ubiquitäre Expression ohne Gewebespezifität aufweisen, ist die Expression von *WT1* räumlich und zeitlich sehr stringent reguliert. Das Verständnis der transkriptionellen Regulation des *WT1*-Gens, dessen Genprodukt vermutlich wichtige Gene der Metanephrogenese direkt reguliert, ist entscheidend für das Verständnis der Differenzierungsvorgänge während der Entwicklung der bleibenden Niere des Menschen. Durch seine zentrale Rolle - auch in der Wilmstumorgenese - ist die Identifikation von Faktoren, die die transkriptionelle Regulation von *WT1* bewirken, gleichbedeutend mit der Identifikation neuer Kandidatengene für die Erkrankung (vgl. Kap. 1.2 und 1.3).

Die transkriptionelle Regulation der *WT1*-Expression durch Mitglieder der SP-Proteinfamilie (SP1 und SP3) wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht. Dies geschah im Zuge der Etablierung von Gelretardationsanalysen („*band shift*“; vgl. Kap. 2.10) und Reporteranalysen (Luciferaseassays; vgl. Kap. 2.13.6) im Labor. Die Verfügbarkeit solcher Methoden zusammen mit Kopplungs- und Mutationsuntersuchungen ermöglicht eine umfassende Charakterisierung von Kandidatengenen für genetisch bedingte Krankheiten. Die Ergebnisse der Gelretardationsexperimente sind in Kapitel 3.1.1 beschrieben. Die Darstellung und Auswertung der Reporteranalysen finden sich in Kapitel 3.1.2. Sie wurden mit einer für diesen Zweck klonierten Deletionsreihe des *WT1*-Promotors in einem Luciferase-Reportervektor durchgeführt (die Sequenz der chromosomalen Region 11p13, in der *WT1* lokalisiert ist, ist in der Genbank abgelegt unter der Zugangsnummer NT_002677).

3.1.1 Gelretardationsanalysen

Die Bindung der Transkriptionsfaktoren SP1 und SP3 an den *WT1*-Promotor wurde mit Hilfe von Gelretardationsanalysen demonstriert. Dabei stand die Darstellung der Bindung von SP3 an funktionell relevante SP1-Bindungsstellen im Vordergrund, da bereits mehrfach gezeigt wurde, dass SP3 die SP1-vermittelte Transaktivierung von Zielgenen reprimieren kann (Dennig *et al.*, 1995; Apt *et al.*, 1996). Der Nachweis der Bindung von SP3 sollte einen ersten Hinweis für einen funktionellen Antagonismus (SP1 aktiviert vs. SP3 reprimiert) dieser Transkriptionsfaktoren am *WT1*-Promotor liefern.

Bei den untersuchten Bereichen handelt es sich um zwei Regionen des Promotors von *WT1*, die bereits beschriebene, funktionelle SP1-Bindungsstellen besitzen (XbaI/TaqI-Fragment von nt -511 bis -341 des *WT1*-Promotors; EagI-Fragment von nt -89 bis +186 des *WT1*-Promotors), und um einen Bereich, der gemäß einer Analyse mit dem *factor*-Algorithmus des Programmpakets HUSAR (EMBL Heidelberg) zwei sog. GT-Boxen (PvuI/XbaI-Fragment von -660 bis -511) aufweist. Abbildung 3.1 zeigt die Lage der drei

untersuchten Regionen relativ zum *WT1*-Promotor und zeigt die beinhalteten Konsensuselemente, die in der vorliegenden Dissertation näher analysiert wurden.

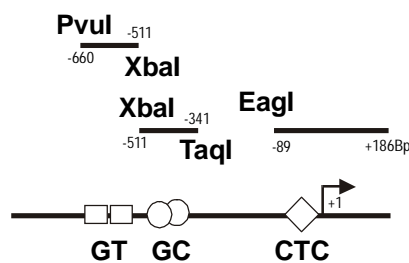


Abbildung 3.1: Übersicht über die in den Gelretardationsanalysen verwendeten *WT1*-Promotorfragmente. Die Lage der verschiedenen SP-Konsensuselemente relativ zum *WT1*-Promotor ist angedeutet. GC= GC-Box; CTC= CTC-repeat; GT= GT-Box. Der Haupttranskriptionsstart (+1) ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. Seine Lokalisation entspricht der des Transkriptionsstarts in Cohen *et al.*, 1997. Weiter stromaufwärts gelegene alternative Transkriptionsstarts von *WT1* sind aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht eingezeichnet.

Nachdem die Spezifität der Bindung von SP-Faktoren an die drei verwendeten Promotorfragmente demonstriert wurde (Daten nicht abgebildet), erfolgte zunächst die Analyse, inwieweit SP3 die für die *WT1*-Expression funktionell relevante CTC-Sequenzwiederholung nahe des Haupttranskriptionsstartpunktes (vgl. Cohen *et al.*, 1997 und Abb. 3.1) binden kann. Abbildung 3.2A zeigt die Ergebnisse der Bindungsexperimente in der Promotorregion von -89 bis +186 des *WT1*-Gens (EagI-Fragment). Sie enthält mehrere potenzielle SP-Bindungsselemente (über dem Autoradiogramm abgebildet), von denen offensichtlich mindestens eine mit SP-Faktoren interagiert (am rechten Rand der Abbildung bezeichnete Banden in Spur 3). Die Identität der retardierten Komplexe in Spur 3 wurde dabei durch spezifische Konkurrenz (GC-Oligo, Spur 4) und durch *supershift*-Analysen (weitere Mobilitätseinschränkung der Protein-DNA-Komplexe durch Bindung spezifischer Antikörper; Spuren 5 und 6) aufgeklärt: Während der starke Komplex durch Inkubation des Bindungsansatzes mit einem SP1-spezifischen Antikörper ausgelöscht wird, verschwinden der darüber und der darunter lokalisierte Komplex bei Inkubation mit dem SP3-spezifischen Antikörper. Der Nachweis, dass es sich bei der von SP1 bzw. insbesondere auch von SP3 gebundenen Sequenz innerhalb des EagI-Fragments um die CTC-Sequenzwiederholung (3x CTC nt -71 bis -62) handelt, wurde durch das in Abbildung 3.2B gezeigte Experiment erbracht. So ist ein unmarkiertes Oligonukleotid, das die CTC-Sequenzwiederholung trägt (CTC-Oligo; nt -81 bis -52), in der Lage, die SP3- (und SP1-) spezifischen Protein-DNA-Komplexe zu kompetieren (vgl. Spur 3 in Abb. 3.2B). Ausserdem kann auch eine spezifische Bindung von SP3 (und SP1) an das CTC-Oligo nachgewiesen werden (retardierte Komplexe in Spur 5; auslöscherbar durch spezifische Konkurrenz mit GC-Oligo [Spur 6]; *supershift* der Komplexe mit SP1- [Spur 7] und SP3- [Spur 8] spezifischen Antikörper).

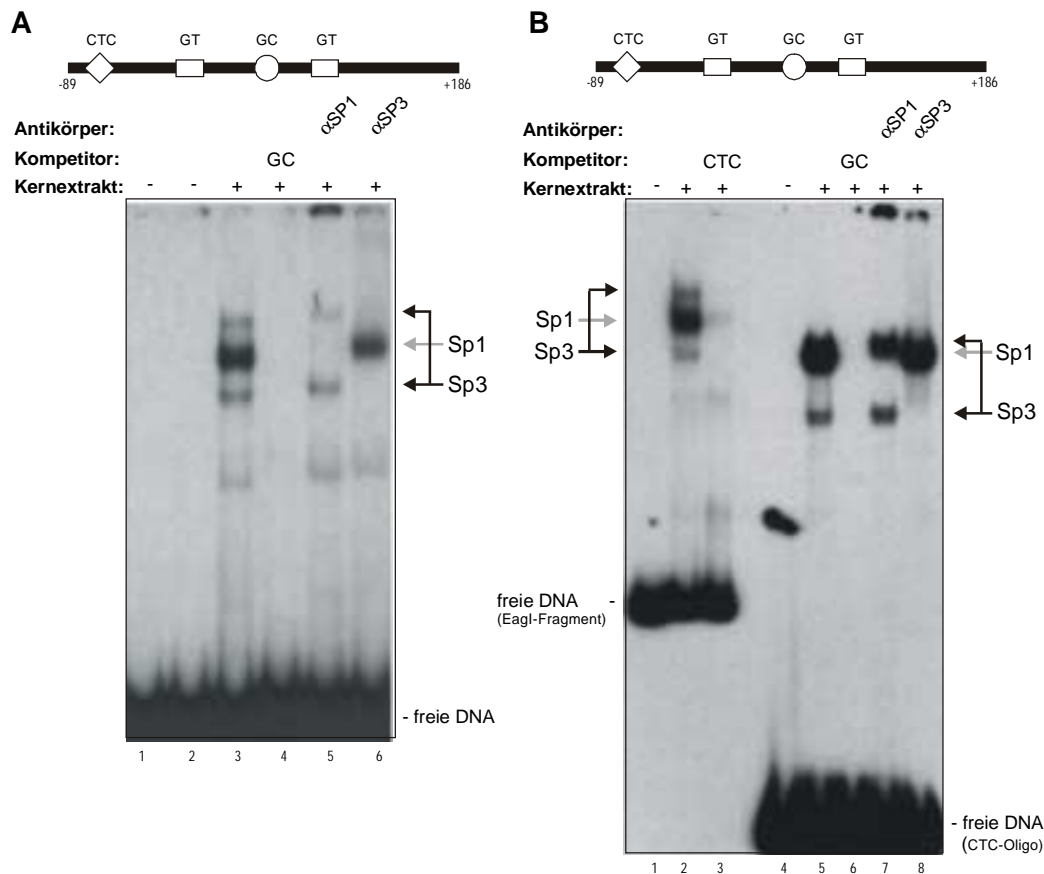


Abb. 3.2: Bindung von SP-Faktoren an die CTC-Sequenzwiederholung im *WTI*-Promotor. Das für das jeweilige Experiment verwendete Promotorfragment ist über den Gelbildern schematisch gezeigt (inkl. SP-Konsenselementen). Das in **A** gezeigte Experiment demonstriert die Bindung von SP-Faktoren an das EagI-Fragment des *WTI*-Promotors (Nachweis der Identität der bindenden Proteine durch spezifische Konkurrenz [GC-Oligo; Spur 4] und durch *supershift* [Spuren 5 und 6]). Die Konkurrenz dieser Komplexe durch ein unmarkiertes Oligonukleotid, das die CTC-Sequenzwiederholung trägt (Spur 3 in **B**), zeigt, dass dieser Teil spezifisch durch SP-Faktoren gebunden wird. Die direkte Bindung an das CTC-Oligo wird in den Spuren 4 bis 8 in **B** demonstriert. Auch hier wurde die Identität der Komplexe durch *supershifts* aufgeklärt. Die Lage der verschiedenen Protein-DNA-Komplexe ist mit Pfeilen am rechten Rand der Abbildungen gezeigt. Das Signal der freien, ungebundenen DNA ist im unteren Teil der Autoradiogramme zu erkennen.

Darüberhinaus wurde die Funktionalität zwei weiterer SP-Bindungsstellen im *WTI*-Promotor untersucht. Bei diesen Sequenzen handelt es sich um zwei mit Hilfe des *factor*-Algorithmus (enthalten im Programmpaket HUSAR des EMBL in Heidelberg) identifizierte GT-Boxen im Bereich -620 bis -615 („RCE5“) und im Bereich -564 bis -559 („RCE3“) des *WTI*-Promotors. Sie zeigen Sequenzhomologien zu Promotorsequenzen, die eine Regulation der Transkription nachgeschalteter Gene durch das Retinoblastomprotein (RB) in Kombination mit SP-Proteinen vermitteln (vgl. Kap. 3.1.2 und 4.1, sowie Robbins *et al.*, 1990 und Udvardia *et al.*, 1995). Als Teil des Promotorfragments PvuI/XbaI (vgl. Abb. 3.1) wurden sie auf ihre Fähigkeit untersucht, SP1 bzw. SP3 eine spezifische Bindung zu ermöglichen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.3A gezeigt. Eine spezifische Bindung von SP3 und SP1 an das Promotorfragment kann

direkt durch die abgebildeten Kompetitions- und *supershift*-Experimente nachgewiesen werden. Dass es sich bei der von den SP-Faktoren kontaktierten Sequenz um die mit RCE3 bezeichnete GT-Box handelt, wurde durch Konkurrenzexperimente im Rahmen von Gelretardationsanalysen mit radioaktiv markiertem RCE3-Oligo gezeigt, deren Ergebnisse in Abbildung 3.3B dargestellt sind.

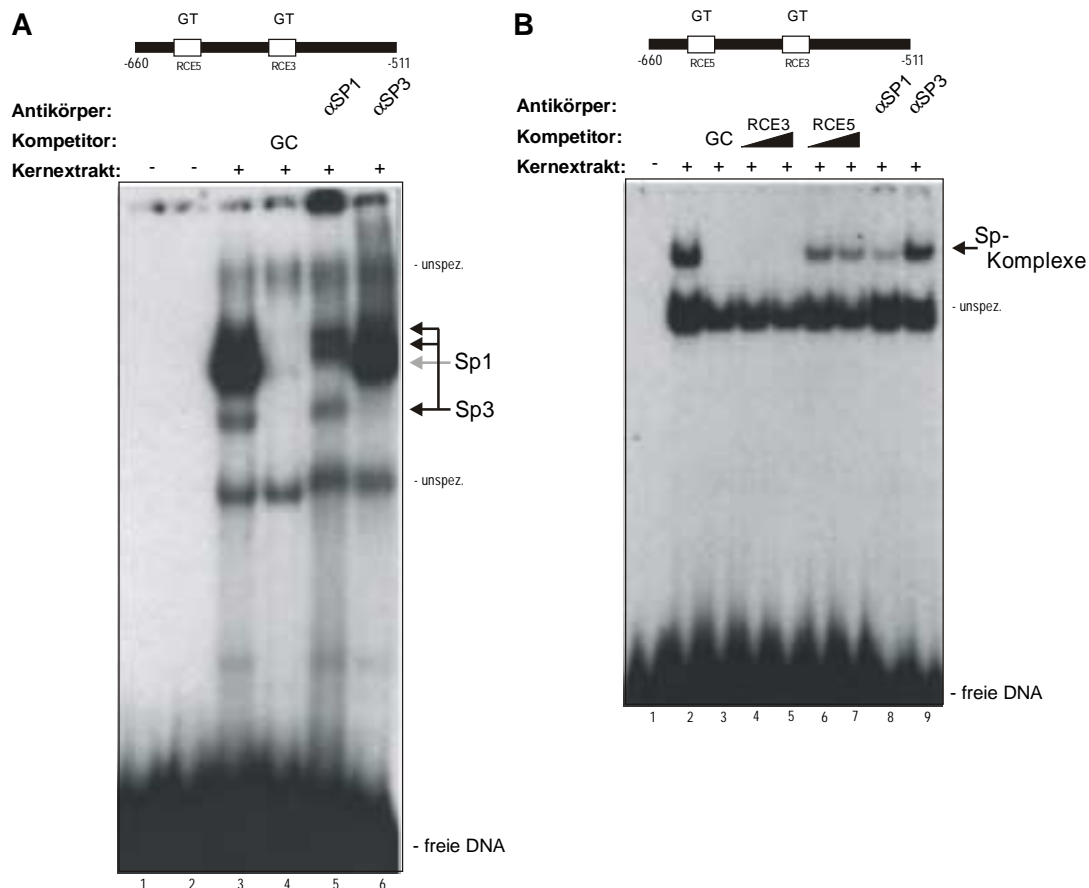


Abb. 3.3: Bindung von SP-Faktoren an eine GT-Box im PvuI/XbaI-Fragment des WTI-Promotors. In **A** wurde der Nachweis der spezifischen Bindung von SP-Proteinen an das PvuI/XbaI-Fragment des WTI-Promotors erbracht. So lassen sich die am rechten Rand des Autoradiogramms markierten Protein-DNA-Komplexe in Spur 3 durch Konkurrenz mit unmarkiertem GC-Box-Oligo auslöschen (Spur 4), bzw. durch entsprechende Antikörper in ihrer gelelektrophoretischen Mobilität weiter vermindern (Spuren 5 und 6). In **B** ist die selektive Bindung der SP-Faktoren an die mit RCE3 bezeichnete GT-Box gezeigt. Die mit SP-Komplex bezeichnete Bande (Spur 2) lässt sich durch ein GC-Box-Oligo kompetieren (Spur 3) und verschwindet bei Zugabe ansteigender Mengen von unmarkiertem RCE3-Oligo (Spuren 4 und 5). Die Abnahme der Bandenintensität ist deutlich schwächer bei Zugabe von unmarkiertem RCE5-Oligo (Spuren 6 und 7). Die *supershifts* in den Spuren 8 und 9 zeigen direkt die Bindung von SP1 und SP3 an das RCE3-Oligo an. Das für die Bindungsuntersuchungen verwendete Promotorfragment (PvuI/XbaI) samt der beinhalteten SP-Konsensuselemente ist schematisch über den Autoradiogrammen abgebildet.

Ein weiterer Beweis dafür, dass RCE3 die Nukleotide beinhaltet, die von SP1 und SP3 gebunden werden, war die Konkurrenz der Bindung dieser Faktoren an das PvuI/XbaI-Promotorfragment mit dem unmarkierten RCE3-Oligo. Die Zugabe von unmarkiertem

RCE5-Oligo zum Bindungsansatz führte nicht zum Verschwinden der SP-Protein/DNA-Komplexe (Daten nicht abgebildet).

Die Regulation des *WT1*-Promotors durch Transkriptionsfaktoren der Pax-Familie (*paired box*-Proteine Pax-2 und Pax-8; Dehbi *et al.*, 1996; Dehbi und Pelletier, 1996) wurde bereits demonstriert. Da die für die Vermittlung der Transkriptionsregulation relevanten Pax-Bindungsstellen jeweils mit GC-Boxen (Bindungsstellen für SP-Proteine) überlappen, wurde die direkte Bindung von SP1 und insbesondere auch SP3 an diese GC-Boxen (sie befinden sich innerhalb des *XbaI/TaqI*-Promotorfragments; Positionen -420 bis -415 und -396 bis -391; vgl. Abb. 3.1) untersucht. Die Ergebnisse der entsprechenden Gelretardationsexperimente, in denen die Bindung der Faktoren an diesen Teil des *WT1*-Promotors nachgewiesen werden konnte, sind in Abbildung 3.4 zusammengefaßt.

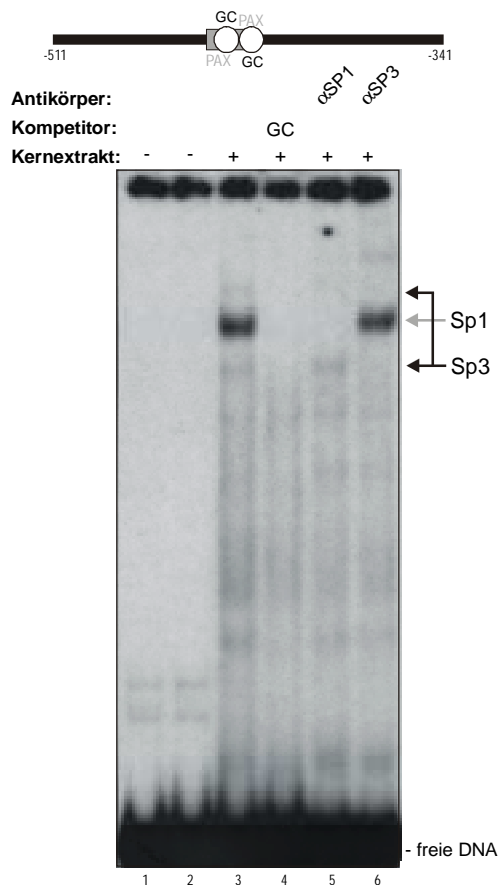


Abb. 3.4: Bindung von SP1 und SP3 an die GC-Boxen des *XbaI/TaqI*- Promotorfragments. Die Identität der durch Zugabe von Proteinextrakt entstehenden Protein-DNA-Komplexe in Spur 3 ist am rechten Rand der Autoradiografie markiert. Die Konkurrenz mit unmarkiertem GC-Box-Oligonukleotid (Spur 4), sowie die *supershifts* mit SP1- bzw. mit SP3-spezifischem Antikörper (Spuren 5 und 6) weisen die Bindung der SP-Proteine an das Promotorfragment, vermutlich an die gezeigten GC-Boxen, eindeutig nach. Das verwendete DNA-Fragment sowie die Lage der GC-Boxen ist schematisch über dem Autoradiogramm dargestellt. In grau sind die überlappenden Pax-Konsensuselemente eingezeichnet.

Eine Mengenabschätzung von SP1- und SP3-Protein in Proteinextrakten *WT1*-exprimierender (293-Zellen; vgl. Kap. 2.13.1) und nicht-exprimierender Zelllinien (WCCS1-Zellen; vgl. Kap. 2.13.1) wurde durch vergleichende Gelretardationsanalysen durchgeführt. Dabei wurde das Auftreten SP1- bzw. SP3-spezifischer Protein/DNA-Komplexe nach der Inkubation von Proteinextrakten aus 293-Zellen und WCCS1-Zellen mit dem *PvuI/XbaI*-Promotorfragment untersucht. Das in Abbildung 3.5 dargestellte

Autoradiogramm zeigt, dass bei einer vergleichbaren Menge an zu beobachtender SP1-Bindungsaktivität die SP3-Bindungsaktivität im WCCS1-Proteinextrakt deutlich erhöht ist (vgl. Spuren 3 und 5 bzw. 4 und 6).

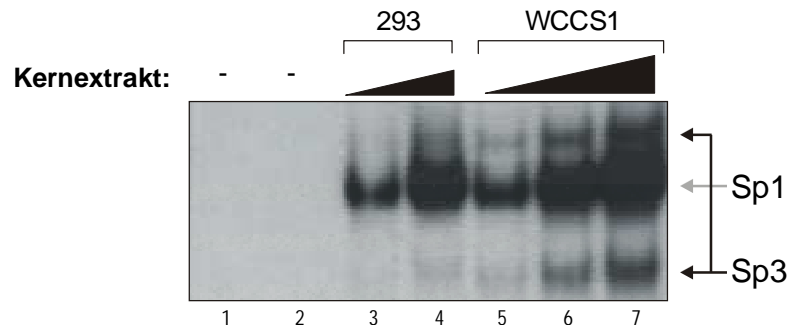


Abb. 3.5: Quantifizierung der SP1- und SP3-Menge in 293- und WCCS1-Zellen. Dargestellt ist der Ausschnitt einer Autoradiografie, der die retardierten Protein-DNA-Komplexe zeigt. Die SP1- bzw. SP3-Bindungsaktivität (markiert rechts neben der Autoradiografie) in unterschiedlichen Mengen Proteinextraktes aus 293- (Spuren 3 und 4) bzw. WCCS1-Zellen (Spuren 5-7) kann direkt verglichen werden. Man erkennt deutlich, dass bei vergleichbaren Mengen an SP1-Bindungsaktivität (z.B. in den Spuren 3 und 5 bzw. 4 und 6) die SP3-spezifischen Banden im WCCS1-Extrakt stärker ausfallen.

Zusammengenommen ergeben die Bindungsanalysen, dass der als transkriptioneller Repressor beschriebene Transkriptionsfaktor SP3 in der Lage ist, SP-Konsensuselemente des *WT1*-Promotors zu binden. Dabei wurde seine direkte Bindung an die funktionell relevanten GC-Boxen des *XbaI/TaqI*-Promotorfragments und an die CTC-Sequenzwiederholung des *EagI*-Fragments nachgewiesen. Zusätzlich wurden zwei weitere putative Bindungsstellen für SP1 und SP3 identifiziert (RCE3 und RCE5), von denen RCE3 als tatsächlich kontaktiertes Promotorelement bestätigt wurde. Schließlich wurde gezeigt, dass das Auftreten von SP1- und SP3-Bindungsaktivität in Proteinextrakten direkt mit dem in den entsprechenden Zelllinien vorliegenden *WT1*-Expressionsstatus korreliert werden kann. So ist der Quotient SP1:SP3 in den *WT1*-exprimierenden 293-Zellen größer als in den *WT1* nicht exprimierenden WCCS1-Zellen.

Die Diskussion der im Rahmen der Gelretardationsanalysen erzielten Ergebnisse findet sich in Kapitel 4.1. Sie berücksichtigt auch die im folgenden Kapitel beschriebenen Ergebnisse der funktionellen Untersuchungen zur transkriptionellen Regulation des *WT1*-Promotors durch SP1 und SP3.

3.1.2 Reporteranalysen (Luciferaseassays)

Die funktionelle Relevanz der Bindung von SP1 und insbesondere von SP3 an die identifizierten und durch Bindungsstudien analysierten Bereiche des *WT1*-Promotors

wurde anhand von Luciferaseassays untersucht. Dabei standen drei Fragestellungen im Vordergrund: [1] Inwieweit unterscheidet sich die Reporterogenaktivität der verschiedenen Promotorkonstrukte (s.u.) in der *WT1*-exprimierenden Zelllinie 293 von der Reporterogenaktivität in Zelllinie WCCS1 (keine *WT1*-Expression)? [2] Bewirkt die in Kapitel 3.1.1 beobachtete Bindung von SP3 an SP1-Konsensusstellen des *WT1*-Promotors eine Repression der SP1-vermittelten Stimulation des *WT1*-Promotors? [3] Für das Retinoblastomprotein (RB) wurde gezeigt, dass es Zielgene auf transkriptioneller Ebene über sog. „*retinoblastoma control elements*“ (RCEs) reguliert (vgl. Kap. 3.1.1 und Robbins *et al.*, 1990), die die Sequenz von GT-Boxen aufweisen. Lässt sich am *WT1*-Promotor eine RB-vermittelte Regulation, evtl. über die (neu identifizierten) GT-Boxen feststellen?

Um diese Fragestellungen zu beantworten wurde eine Deletionsreihe des *WT1*-Promotors in dem Reportergenplasmid pGL2-*basic* kloniert (vgl. Abb. 3.6). Durch das sequenzielle Abtrennen von Teilen des 5'-Promotorbereichs in den verschiedenen Plasmiden können so essenzielle Transkriptionsfaktorbindungsstellen identifiziert werden. Ausserdem kann durch Vergleich der beobachteten Luciferaseaktivitäten gleicher Promotorkonstrukte in den verschiedenen Zelllinien abgeschätzt werden, inwieweit eine zelltypspezifische Aktivierung oder Repression am *WT1*-Promotor auftritt. Durch Vergleich mit dem endogenen *Wt1*-Expressionsstatus sollten so evtl. Repressor- oder Aktivatorbindungsstellen identifiziert werden (vgl. Fragestellung [1] oben).

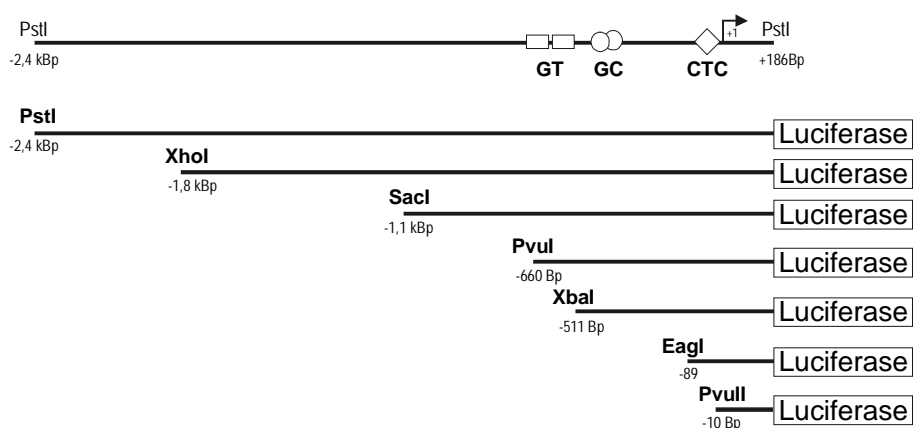


Abbildung 3.6: Übersicht über die klonierten Deletionskonstrukte des *WT1*-Promotors in pGL2-*basic*. Die Lage der auch in Gelretardationsanalysen untersuchten SP-Protein Konsensus-elemente ist oben angegeben. Dabei bedeuten GT= GT-box, GC= GC-box, CTC= CTC-Sequenzwiederholung. Der Pfeil markiert den Haupttranskriptionsstartpunkt. Die für die Subklonierung der Deletionsreihe im Plasmid pGL2-*basic* verwendeten Restriktionsenzyme (sie sind im folgenden namensgebend für die entsprechenden Promotorfragmente) sowie deren Position relativ zum Transkriptionsstart sind angegeben.

Die Untersuchung des *WT1*-Promotors auf zelltypspezifische Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen, die essenziell für die *WT1*-Transkriptionskontrolle sind, wurde durch Analyse der gesamten Deletionsreihe des *WT1*-Promotors in 293- bzw. WCCS1-Zellen erreicht. Abbildung 3.7 zeigt das Ergebnis der Luciferaseassays nach Transfektion der einzelnen Promotorkonstrukte in 293- bzw. WCCS1-Zellen. Man erkennt deutlich, dass sich die Deletionskonstrukte in den zwei verschiedenen Zellen ähnlich, jedoch nicht gleich verhalten. In beiden Zelllinien zeigt das XbaI-Fragment die stärkste Promotoraktivität (WCCS1: 7,0-fache Luciferaseaktivität des PvuII-Fragments; 293: 19,8-fache Luciferaseaktivität des PvuII-Fragments), die bei weiterer Verkürzung der Promotorsequenz abnimmt (EagI- und PvuII-Konstrukt). Dabei ist der Aktivitätsverlust in beiden Zelllinien bei der Reduktion der Promotorsequenzen zwischen der EagI- und der PvuII-Schnittstelle am signifikantesten (WCCS1: 81% Aktivitätsverlust; 293: 91% Aktivitätsverlust). Die stromaufwärts der XbaI-Schnittstelle gelegenen Promotorsequenzen wirken inhibitorisch auf die Transkription am *WT1*-Promotor, denn in beiden Zelllinien ist die durch diese Konstrukte vermittelte Luciferaseaktivität niedriger, als die des XbaI-Promotorkonstruktes. Betrachtet man dabei das Verhalten der Promotorkonstrukte im einzelnen, so ergeben sich doch signifikante Unterschiede zwischen beiden Zelllinien. In der WCCS1-Zelllinie sind die deutlichsten Steigerungen der Promotoraktivität bei Entfernung der Sequenzen zwischen der XhoI- und SacI-Schnittstelle (58%), bzw. zwischen der PvuI- und der XbaI-Schnittstelle (36%) zu beobachten. In der 293-Zelllinie haben alle Konstrukte mit Promotorsequenzen zwischen der PstI- und der XbaI-Schnittstelle eine vergleichbare Promotoraktivität. Sie entspricht etwa der Aktivität des SacI- und des PvuI-Promotorfragmentes in der WCCS1-Zelllinie. Erst bei Entfernung der Sequenzen zwischen der PvuI- und der XbaI-Schnittstelle zeigt sich eine deutliche Steigerung der gemessenen Luciferaseaktivität um 58%.

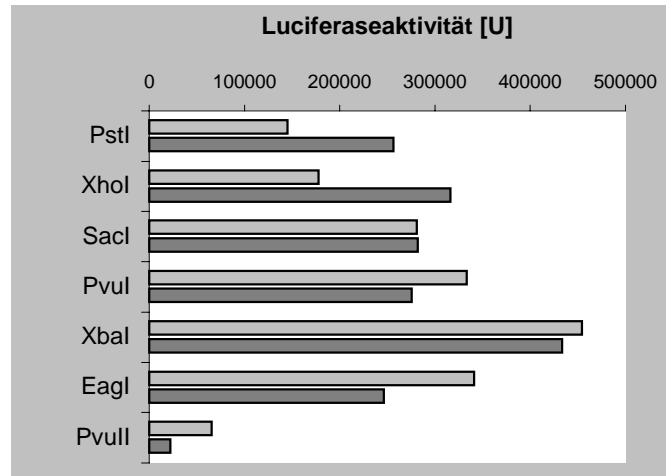


Abbildung 3.7: Luciferaseaktivität der Promotor-Deletionsreihe in WCCS1- (hellgrau) und 293-Zellen (dunkelgrau). Aufgetragen ist die Luciferaseaktivität (in relativen Einheiten) in Abhängigkeit vom transfizierten Promotorkonstrukt. Jeweils 2,5 µg des links angegebenen Reporterplasmids wurden in 293- bzw. WCCS1-Zellen transient transfiziert, und die Luciferaseaktivität der Zelllysate nach 48h bestimmt. In beiden Zelllinien zeigt das XbaI-Promotorfragment die stärkste, das PvuII-Promotorfragment die schwächste Promotoraktivität (Einzelheiten s. Text). Promotorsequenzen stromaufwärts der XbaI-Schnittstelle scheinen einen inhibitorischen Einfluss auf die Promotoraktivität in beiden Zelllinien zu haben. Der Ausgleich evtl unterschiedlicher Transfektionseffizienzen (Normalisierung) der verschiedenen Promotorkonstrukte erfolgte durch Kotransfektion eines Renillaluciferase-Expressionsvektors (pRL-TK; Fa. Promega, Mannheim).

Die Stimulierbarkeit des *WT1*-Promotors durch die Transkriptionsfaktoren SP1 bzw. SP3 wurde durch Kotransfektionsexperimente untersucht (vgl. Fragestellung [2] am Anfang dieses Kapitels). Die geschah durch Messung der Luciferaseaktivität der Promotorkonstrukte bei Anwesenheit von SP1 oder SP3 im Vergleich mit der Luciferaseaktivität der entsprechenden Reporterplasmide ohne kotransfiziertes SP-Expressionskonstrukt. Abbildung 3.8 zeigt die Ergebnisse der entsprechend durchgeführten Kotransfektionsexperimente.

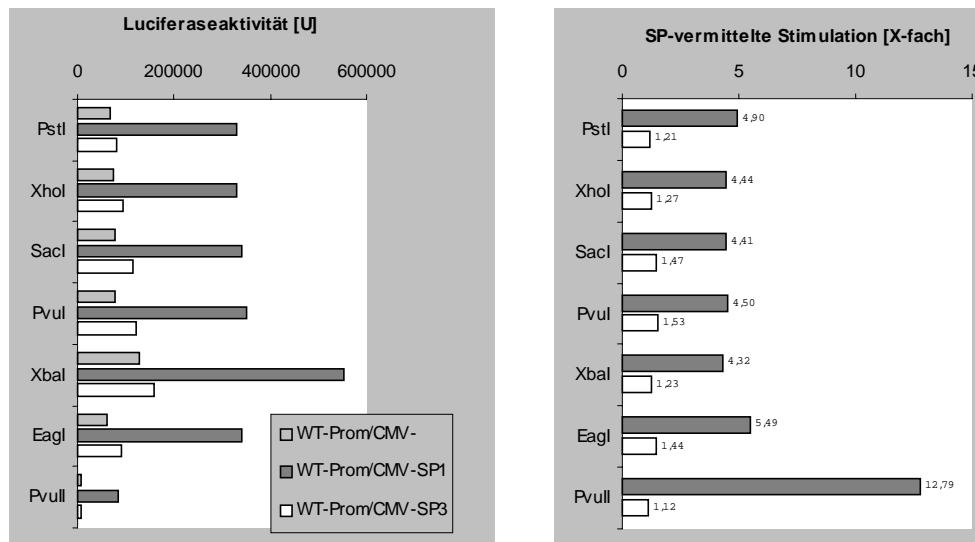


Abbildung 3.8: Stimulierbarkeit des *WT1*-Promotors durch SP-Faktoren. Im linken Teil der Abbildung ist die gemessene Luciferaseaktivität in 293-Zellen in Abhängigkeit vom Promotorkonstrukt (linke Beschriftung) gezeigt. Dabei entsprechen die mittelgrauen Balken der Luciferaseaktivität bei Kotransfektion von leerem Expressionsplasmid, die dunkelgrauen Balken der Aktivität bei Kotransfektion von SP1-Expressionsplasmid, und die weißen Balken der Promotoraktivität bei Kotransfektion von SP3-Expressionsplasmid. Während alle Promotorfragmente durch SP1 deutlich aktiviert werden, zeigt die Kotransfektion von SP3 keinen (bzw. nur sehr schwache) Effekt auf die Aktivität des *WT1*-Promotors. Das Ausmaß der SP-Faktor vermittelten Stimulation der einzelnen *WT1*-Promotorkonstrukte (Quotient aus Luciferaseaktivität bei SP1- (dunkelgrau) bzw. SP3-Kotransfektion (weiss) und Luciferaseaktivität bei Kotransfektion des leeren Expressionsvektors) ist rechts dargestellt. Die an den Balken angegebenen Zahlen entsprechen der X-fachen Luciferaseaktivität mit SP-Expressionskonstrukt im Vergleich zur Situation mit leerem Expressionsvektor.

Die analysierten Zellen wurden mit 1,5 µg DNA der entsprechenden Promotorkonstrukte und 1 µg DNA der Expressionsvektoren pcDNA3 (mittelgraue Balken), pCMV-SP1 (dunkelgraue Balken) oder pCMV-SP3 (weiße Balken) transfiziert. Die Normalisierung erfolgte durch Bestimmung der Proteinkonzentration der für die Luciferaseassays verwendeten Zelllysate.

Die durchgeführten Experimente zeigen wie erwartet, dass der *WT1*-Promotor durch den Transkriptionsfaktor SP1 reguliert wird. Die Koexpression von SP1 führt generell zu einer Aktivierung der Reportergenaktivität. Dabei fällt auf, dass sich die SP1-vermittelte Stimulation bei Deletion der Sequenzen zwischen der PstI- und der EagI-Schnittstelle nur unwesentlich ändert (konstant zwischen 4,3- und 5,5-fach). Der Anstieg der SP1-vermittelten Aktivierung des *WT1*-Promotors von 5,5-fach auf 12,8-fach bei Deletion der Sequenzen zwischen der EagI- und der PvuII-Schnittstelle ist überraschend. In diesem Bereich ist die als funktionell relevant von Cohen und Mitarbeitern (1997) charakterisierte SP1-Bindungsstelle (CTC-Sequenzwiederholung) lokalisiert. Die von der Arbeitsgruppe gemachte Beobachtung, dass die Deletion dieser Bindungsstelle eine 5 bis 10-fache Reduktion der Promotoraktivität (je nach verwendeter Zelllinie) zur Folge hat, kann innerhalb der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Vielmehr zeigt auch das kleinste Promotorfragment (PvuII) eine Stimulierbarkeit durch SP1, die sogar über der der längeren Promotorfragmente liegt. Ein entsprechendes Verhalten konnte auch in

Reportergenanalysen mit der Zelllinie WCCS1 beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Auch dort konnte eine anhaltende Stimulierbarkeit der untersuchten Promotorfragmente inklusive des PvuII-Fragments festgestellt werden. Allerdings war die gemessene SP1-Stimulation am PvuII-Fragment mit 8,2-fach ähnlich hoch, wie die SP1-Stimulation am PstI-Fragment (9,1-fach).

Darüberhinaus wird deutlich, dass die Kotransfektion von SP3 keine nennenswerte Regulation der *WT1*-Promotoraktivität zur Folge hat. Die gemessenen Werte für die Luciferaseaktivität bei SP3-Überexpression sind annähernd gleich den Werten bei Kotransfektion des leeren Expressionsvektors (vgl. Abb. 3.8).

Der Frage, inwieweit SP3 die SP1-vermittelte Transaktivierung des *WT1*-Promotors reprimieren kann, wurde durch gleichzeitige Kotransfektion von SP1- und SP3-Expressionsplasmiden mit einem *WT1*-Reporterkonstrukt (PstI-Fragment; vgl. Abb. 3.6) nachgegangen. Ist ein funktioneller Antagonismus von SP1 und SP3 am *WT1*-Promotor zu beobachten, so könnte das Mengenverhältnis von SP1 und SP3, wie schon an anderen Promotorsystemen funktionell gezeigt, eine essenzielle Bedeutung für die *WT1*-Expression besitzen (vgl. hierzu auch Kap. 4.1). Dafür spricht auch die Korrelation zwischen dem Expressionsstatus von *WT1* und den relativen Mengen von SP1- und SP3-Bindungsaktivität in nukleären Proteinextrakten der untersuchten Zelllinien (vgl. Abb. 3.5). Abbildung 3.9 zeigt die Ergebnisse der Kotransfektionsexperimente. Darin wird klar, dass die durch SP1 vermittelte Stimulation des verwendeten Promotorkonstrukts durch steigende Mengen SP3 deutlich reduziert wird (um 75% [1µg CMV-SP1+1µg CMV-SP3] auf eine Luciferaseaktivität vergleichbar der Situation ohne kotransfiziertes SP1-Expressionsplasmid [CMV-]). Es kann also funktionell demonstriert werden, dass SP3 auch am *WT1*-Promotor in der Lage ist, die SP1-vermittelte Transaktivierung zu reprimieren.

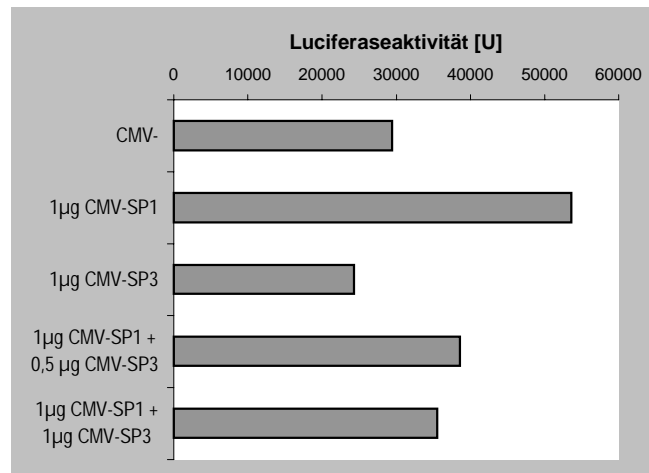


Abbildung 3.9: Wirkung von SP3 auf die SP1-vermittelte Transaktivierung am *WT1*-Promotor. Darstellung der Luciferaseaktivität des *WT1*-Promotors (PstI-Fragment) bei Kotransfektion von leerem Expressionsvektor (CMV-), SP1- und/oder SP3-Expressionsvektor. Die Abbildung zeigt, dass SP3 die SP1-vermittelte Aktivierung des *WT1*-Promotors (CMV-SP1) reprimieren kann (CMV-SP1+CMV-SP3). Die für die Kotransfektionen verwendeten Mengen an SP-Expressionskonstrukt sind am linken Rand der Abbildung angegeben. Die Normalisierung erfolgte durch Bestimmung der Proteinkonzentration der verwendeten Zelllysate.

Um zu untersuchen, inwieweit die identifizierten GT-Boxen im Bereich –620 bis –615 (RCE5) und –564 bis –559 (RCE3) des *WT1*-Promotors eine Regulation der Transkription durch das Retinoblastomprotein (pRB) vermitteln (vgl. Fragestellung [3] am Anfang dieses Kapitels), wurden Kotransfektionsexperimente mit einem Expressionsvektor für humanes RB (pCMV-hRB; zur Verfügung gestellt von Dipl. Humbiol. H. Karsunky, IFZ, Universität Essen) durchgeführt. Als Promotorfragment wurde das PstI-Fragment des *WT1*-Promotors in pGL2-*basic* verwendet (vgl. Abb. 3.6). In der Abbildung 3.10 sind die Ergebnisse der mit der Zelllinie WCCS1 durchgeführten Transfektionsexperimente dargestellt. Unter den gewählten Bedingungen wurde eine starke synergistische Wirkung von SP1 und RB festgestellt (ca. 5,9-fache Aktivierung der Reportergenaktivität gegenüber 1,8- bzw. 1,6-facher Aktivierung, wenn nur CMV-SP1 bzw. nur CMV-hRB transfiziert wurde). Die Tatsache, dass jedoch auch der pGL2-*basic* Ausgangsvektor (er enthält keine Promotorsequenzen) ca. 5-fach in seiner Reportergenaktivität induziert wird, legt den Schluss nah, dass es sich bei den beobachteten Effekten nicht um promotorspezifische Effekte handelt.

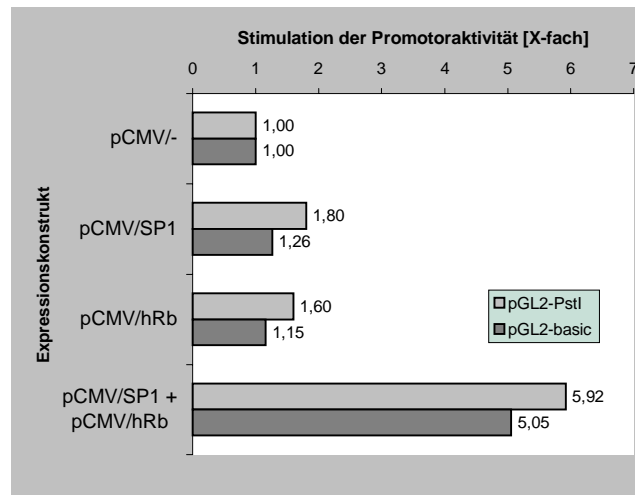


Abbildung 3.10: Effekt des Retinoblastom-Genprodukts auf den *WT1*-Promotor. Dargestellt ist der Einfluß von SP1 und RB auf die Luciferaseaktivität des *WT1*-Promotors (PstI-Fragment) in WCCS1-Zellen (eine Stimulation der Promotoraktivität von 1-fach entspricht der Luciferaseaktivität des PstI-Promotorfragments ohne kotransfiziertes Expressionskonstrukt). Es wird deutlich, dass unter den gewählten Transfektionsbedingungen (je Expressionskonstrukt wurden 1µg DNA verwendet) eine synergistische Aktivierung der Luciferaseaktivität in den mit *WT1*-Promotorkonstrukt transfizierten Zellen auftritt (hellgraue Balken; ca. 6-fache Aktivierung der Luciferaseaktivität bei Kotransfektion beider Expressionsplasmide im Vergleich zur 1,8- bzw. 1,6-fachen Aktivierung bei Transfektion eines der beiden Expressionsplasmide). Da dieser Effekt allerdings auch bei Kotransfektion des leeren Reportergenvektors (pGL2-basic, dunkelgraue Balken) auftritt (ca. 5-fache Stimulation bei Kotransfektion beider Expressionskonstrukte im Vergleich zu 1,3- bzw. 1,2-facher Stimulation bei Verwendung eines der Expressionskonstrukte), ist die beobachtete synergistische Wirkung jedoch nicht promotorspezifisch. Die Normalisierung erfolgte durch die Quantifizierung der in den Zellysaten enthaltenen Proteinmenge. Somit ist sichergestellt, dass die erhöhten Luciferaseaktivitäten der Zellen, die mit beiden Expressionsvektoren transfiziert wurden (verstärkte Proliferation; vgl. Text), nicht durch eine erhöhte Proteinmenge im Lysat zustande kommen.

Bei genauerer Beobachtung konnte im Rahmen der geschilderten Untersuchungen festgestellt werden, dass prinzipiell die Zellen, die mit CMV-SP1 *und* CMV-hRB kotransfiziert worden waren, deutlich stärker proliferierten. Vor diesem Hintergrund ist nicht anzunehmen, dass eine der GT-Boxen (insbesondere die als RCE3 bezeichnete GT-Box an Position –564 bis –559 [RCE3] des *WT1*-Promotors; vgl. Bindungsstudien in Kap. 3.1.1) eine transkriptionelle Regulation des *WT1*-Gens durch das RB-Genprodukt vermittelt. Nichtsdestotrotz ist die Beobachtung bemerkenswert, dass eine Wilmstumorzelllinie bei gleichzeitiger SP1- und RB-Überexpression stärker als zuvor proliferiert.

Die Diskussion der Ergebnisse der Reportergenanalysen unter Einbeziehung der Bindungsstudien findet sich in Kapitel 4.1.

3.2 Differenzielle Genexpressionsanalyse mit der Methode des *differential display*

3.2.1 Darstellung und Analyse differenzieller Genexpression

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde die Methode des *differential display* (Liang und Pardee, 1992) im Labor etabliert. Dabei galt es zunächst, die für die Einzelschritte gewählten Bedingungen so zu standardisieren, dass mit einer Minimalmenge an Gesamt-RNA aus begrenzt zur Verfügung stehendem Nierengewebe die initialen *differential display*-Experimente durchzuführen waren. Ferner sollte durch Titration der in der radioaktiven PCR (DD-PCR) eingesetzten Nukleotidmenge ein Maximum an Reproduzierbarkeit der Methodik in vergleichbaren Ansätzen erreicht werden (vgl. Kap. 2.9).

Die Ergebnisse der entsprechenden Experimente zur Bestimmung der minimal in der reversen Transkriptionsreaktion einsetzbaren RNA-Menge und zur Ermittlung der optimalen Konzentration an dNTPs in den DD-PCR-Reaktionen sind nicht abgebildet. Sie lieferten die detailliert im Methodenteil (vgl. Kapitel 2.9) beschriebene Menge an einzusetzender Gesamt-RNA (500 ng pro reversem Transkriptionsansatz) und die für die DD-PCR optimierte dNTP-Konzentration (2 μ M).

Die Untersuchung der im Rahmen der vorliegenden Arbeit bearbeiteten Nierengewebe geschah genau wie im Methodenteil unter Kapitel 2.9 beschrieben. Das in Abbildung 3.11 exemplarisch dargestellte Autoradiogramm eines denaturierenden Polyacrylamidgels zeigt die typischen Bandenmuster, die durch Auftrennung der radioaktiv markierten cDNA-Produkte einer DD-PCR entstehen.

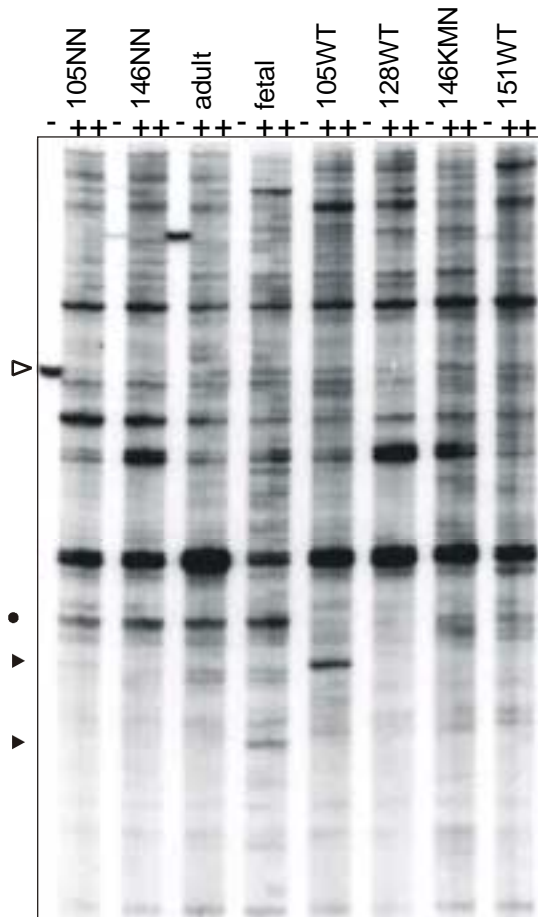


Abbildung 3.11: Autoradiogramm eines denaturierenden PAA-Gels mit aufgetrennten DD-PCR-Produkten (primer T11-A/10-7). Die Art der analysierten Gewebe ist über den jeweiligen Spuren (drei je Gewebe) angegeben. Für jedes Gewebe wurden eine Negativkontrolle (PCR auf nicht revers transkribierter RNA; -) und zwei Analyseansätze (++) angefertigt. Die geschlossenen Pfeilspitzen markieren die Position zwei jeweils in einem Ansatz differenziell auftretender Banden (in Gewebe 105WT bzw. fetal). Der Punkt markiert die Position einer musterhaft differenziell auftretenden Bande (stark in allen analysierten „Normalnierengeweben“). Die offene Pfeilspitze markiert die Position einer in der Negativkontrolle auftretenden Bande (105NN). Banden der Analyseansätze auf gleicher Höhe wurden prinzipiell nicht weiter analysiert (einzelheiten s. Text).

3.2.2 Auswahl differenziell auftretender cDNA-Fragmente

Im Verlauf der Arbeit wurden zunächst vergleichend adultes und fetales Nierengewebe mittels der *differential display*-Technik untersucht. Später wurden, im Rahmen der Betreuung der Diplomarbeit von Frau Jutta Trübenbach (1998), zusätzlich noch verschiedene Tumorgewebe in die Analysen miteinbezogen (insgesamt wurden drei adulte Nierengewebe, ein fetales Nierengewebe und vier Wilmstumorgewebe parallel analysiert; vgl. Abb. 3.11). Die Abbildung 3.12 zeigt schematisch die beiden Projektteile, im Rahmen derer die *differential display*-Experimente durchgeführt wurden, die anschließenden Verifikationsstrategien und benennt die Fragmente, die letztlich näher im Rahmen der vorliegenden Arbeit charakterisiert wurden. Insgesamt kamen neben den drei in der reversen Transkription eingesetzten T11-N-Oligonukleotiden (vgl. Kap. 2.9.1 und 2.15.8) elf verschiedene 5'-Dekamer-Oligonukleotide (10-1 – 10-11; vgl. Kap. 2.9.2 und 2.15.8) zur Anwendung. Ihr Einsatz in verschiedenen DD-PCR-Reaktionen (vgl. Abb. 3.12) resultierte in der initialen Isolation, Reamplifikation und Subklonierung von 107 cDNA-Fragmenten.

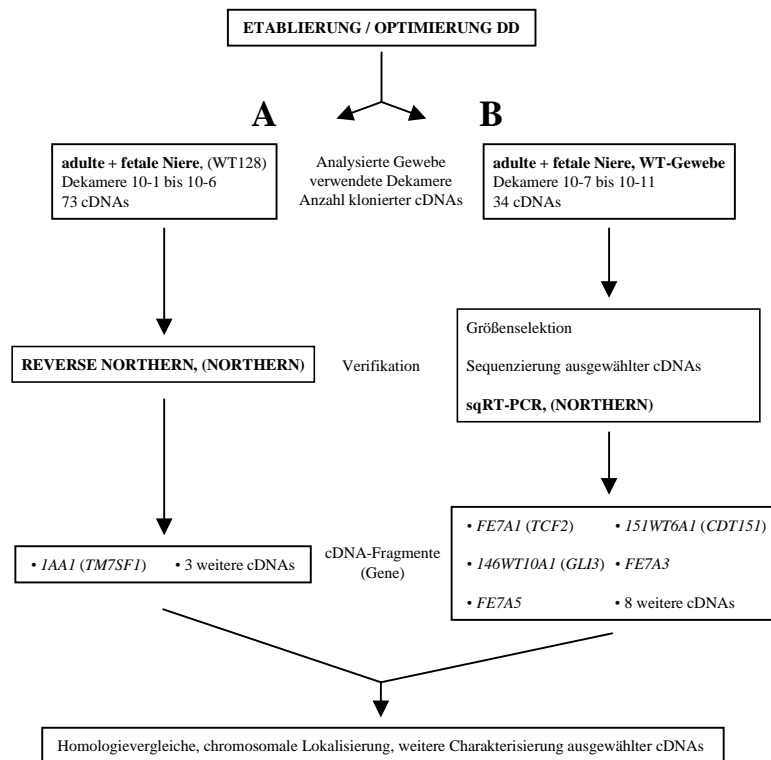


Abbildung 3.12: Schematische Darstellung des Verlaufs der durchgeführten *differential display*-Analysen. Nach der Etablierung und Optimierung der Versuchsbedingungen sind zwei Projektteile (A und B) zu unterscheiden, im Rahmen derer die Genexpression in verschiedenen Geweben analysiert wurden. Innerhalb dieser zwei Projektteile kamen unterschiedliche Dekamer-*primer* im DD zur Anwendung und die differenzielle Expression der subklonierten DD-cDNA-Fragmente wurden durch verschiedene Strategien verifiziert („Verifikation“). cDNA-Fragmente, deren differenzielle Genexpression bestätigt werden konnte, sind aufgeführt. Dabei sind diejenigen namentlich genannt, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit weiterführend charakterisiert wurden („cDNA-Fragmente [Gene]“).

Die Auswahl differenziell auftretender cDNA-Fragmente erfolgte durch Vergleich der im Autoradiogramm auftretenden Bandenmuster. Innerhalb von Projektteil B wurden insbesondere solche Fragmente als interessant eingestuft, die entweder nur in adultem oder fetalem Nierengewebe auftraten, solche, die deutlich in einem der untersuchten Tumorgewebe hervortraten oder fehlten, bzw. es wurden cDNA-Fragmente isoliert, die nur in Tumorgewebe oder nur in den „Normalnierengeweben“ (adult und fetal) zu detektieren waren. Dabei wurden auch Banden berücksichtigt, die zwar in verschiedenen Geweben auftraten, deren Intensitätsunterschiede aber einem der oben geschilderten Muster entsprachen.

3.2.3 Verifikation differenziell auftretender cDNA-Fragmente und deren weitere Charakterisierung

Ein wesentlicher Punkt beim *differential display* ist die Anfälligkeit der Methode für falsch positive cDNA-Fragmente (vgl. Kap. 4.2). Dabei handelt es sich um Fragmente, die zwar auf dem vergleichenden Sequenzgel differenziell erscheinen, deren differenzielle Expression in anschließenden Untersuchungen nicht bestätigt werden kann.

Zur frühen Detektion falsch positiver Signale diene sowohl die Anfertigung von Negativkontrollen der DD-PCR (nicht revers transkribierte RNA als Matrize für die radioaktive PCR), als auch das Anfertigen der eigentlichen DD-PCR-Reaktionen im Duplikat. So wurden keine Banden berücksichtigt, die zwar differenziell in den verschiedenen Geweben, die aber auch in einer Spur einer Negativkontrolle auftraten. Ferner wurden Banden von den weiteren Untersuchungen ausgeschlossen, die deutliche Intensitätsunterschiede zwischen den Duplikatansätzen aufwiesen.

Da falsch positive Signale (trotz Anwendung der beschriebenen „Vorsichtsmaßnahmen“) innerhalb der *differential display*-Methodik zu erwarten sind, ist es generell notwendig, die differenzielle Expression initial isolierter cDNA-Fragmente mit einer zweiten Methode zu verifizieren. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation kamen verschiedene Techniken, die der Verifikation dienten, zur Anwendung. Neben der Verifikation durch die *Northern*-Hybridisierung (vgl. Kap. 2.7.4), wurden Gruppen klonierter cDNA-Fragmente entweder durch semiquantitative RT-PCR-Experimente (vgl. Kap. 2.5.2) bzw. mittels *reverse Northern*-Hybridisierungen (vgl. Kap. 2.7.5) bezüglich ihrer tatsächlichen differenziellen Genexpression untersucht.

Die im Zuge vergleichender Genexpressionsuntersuchungen von adultem und fetalem Nierengewebe, sowie später zusätzlich mit RNA aus einer Primärzelllinie ohne funktionelles WT1-Protein (WT128; Löbber *et al.*, 1998) isolierten und subklonierten cDNA-Fragmente (Projektteil A in Abb. 3.12) wurden zunächst mittels der *reverse Northern*-Technik untersucht. Dabei wurden gleiche Mengen von Produkten einer T3/T7-PCR auf den Fragmentklonen nach Fällung und chemischer Denaturierung unter Verwendung einer 96-Loch *Slot blot*-Apparatur auf zwei Hybond N+ Filter im Duplikat aufgebracht (vgl. Kap. 2.7.5). Die Hybridisierung einer komplexen cDNA-Sonde aus adulter bzw. fetaler Niere an die integratspezifischen PCR-Produkte erfolgte analog der in Kapitel 2.7.5 beschriebenen Vorgehensweise. Zum Abgleich der Markierungseffizienzen für die beiden in den Hybridisierungen verwendeten komplexen Sonden wurden bei jeder Hybridisierung Nylonmembranen mit aufgebracht GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase)-spezifischer cDNA mitgeführt. Der quantitative Vergleich der Hybridisierungsintensitäten an der DNA dieses (konstitutiv exprimierten) „Haushaltsgens“

wurde als Grundlage für eine Normalisierung der beobachteten Hybridisierungsintensitäten an den integratspezifischen PCR-Produkten verwendet. Abbildung 3.13 zeigt beispielhaft das Autoradiogramm einer vergleichenden *reverse Northern*-Hybridisierung.

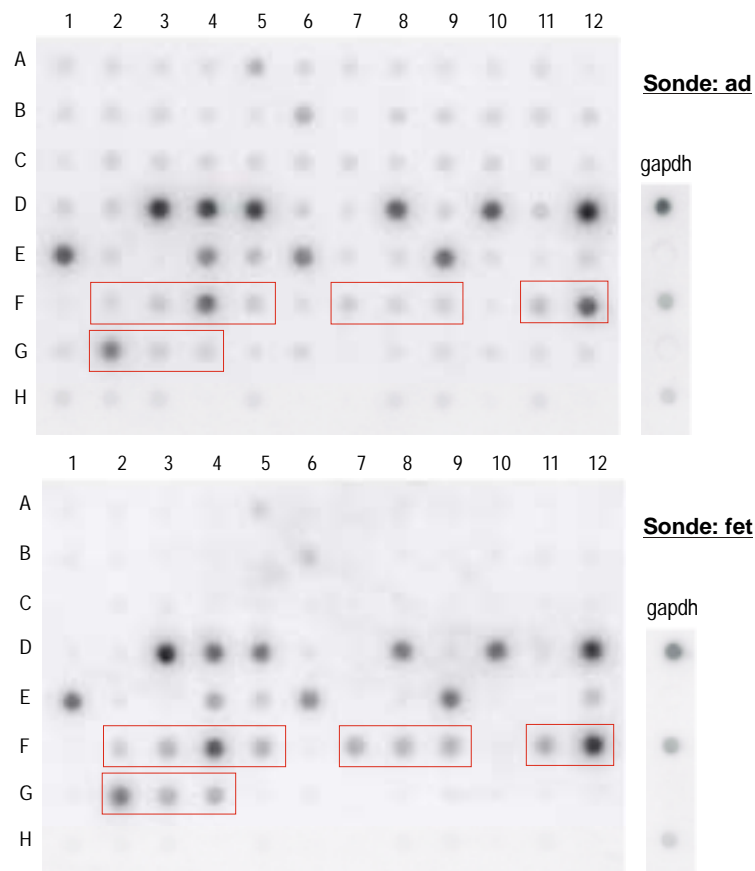


Abbildung 3.13: Reverse Northern-Hybridisierung von cDNA-Fragmentfiltern mit komplexen cDNA-Sonden aus adulten (ad; oben)- und fetaler (fet) Nieren-cDNA. Die Abbildung zeigt beispielhaft die Autoradiogramme zweier cDNA-Fragmentfilter (PCR-Amplifikate der DD-Fragmente von Platte 23; im 96well-Mikrotiterplattenformat aufgebracht). Jeweils rechts daneben finden sich die Autoradiogramme der parallel hybridisierten GAPDH-cDNAs, die zur Normalisierung verwendet wurden (Einzelheiten s. Text). Jeweils drei verschiedene Mengen GAPDH-spezifischer cDNA wurden auf den Membranen immobilisiert. Rot umrandet sind cDNAs, die bei Hybridisierung mit fetaler cDNA deutlich stärkere Signale im Autoradiogramm liefern (Positionen F2-5, F8-10, F11-12, G2-4). Es handelt sich dabei um die cDNA des DD-Fragments *3CFE3*.

Die durch Exposition und Auslesen auf einem *Phosphorimager* gewonnenen Daten über die Hybridisierungsintensitäten der „adulten“ und „fetalen“ Sonde an die verschiedenen Klon-DNAs wurden im Anschluß mit Hilfe der Excel-Software verglichen. Mit dieser Methodik konnten 4 cDNA-Fragmente aus ursprünglich 73 isolierten und subklonierten Banden im *differential display* bestätigt werden (ca. 5,5%). Es handelt sich dabei um die Fragmente *IAA1*, *FE3C3*, *FE4G1*, *Z5C4*.

Die im Zuge der vergleichenden Genexpressionsuntersuchungen von adultem, fetalem und tumorösem Nierengewebe isolierten und subklonierten cDNA-Fragmente wurden zunächst durch semiquantitative RT-PCR verifiziert (Projektteil B in Abb. 3.12). Zu diesem Zweck wurde zunächst die Integrat-DNA der verschiedenen Bakterienklone unter Verwendung der Oligonukleotide T3 und T7 als *primer* in einer PCR amplifiziert (im 96-Loch Mikrotiterplattenformat), und die erhaltenen Produkte auf einem Agarosegel analysiert. Dies wurde nötig, da es sich bei den initial isolierten und reamplifizierten DNAs z. T. um Fragmentgemische handelte. Der Größenvergleich der aus der T3/T7-PCR resultierenden cDNA-Produkte ermöglichte eine Abschätzung der Heterogenität des Fragmentgemischs. Von den Fragmentklonen mit Integraten gleicher Länge wurden zwei bis drei Einzelklone für eine nachfolgende Sequenzierung ausgewählt und die erhaltenen Sequenzen verglichen. Zeigte die T3/T7-PCR, dass die Fragmentklone Integrate unterschiedlicher Länge trugen, so wurden aus jedem Längenbereich zwei Klone für die nachfolgende Sequenzierung mit dem T3-Oligonukleotid ausgewählt. Entsprachen die Integratlängen der Fragmentklone überwiegend einer bestimmten Größe, so wurden zwei Klone mit mehrheitlich auftretender Integratlänge zur Sequenzierung ausgewählt. Die erhaltenen Sequenzen wurden als Grundlage für die Generierung spezifischer *primer* verwendet. Mit deren Hilfe wurde im Anschluss die differenzielle Expression des korrespondierenden Transkripts im Zuge semiquantitativer RT-PCR-Experimente überprüft (vgl. Kap. 2.5.2).

Die Abbildung 3.14 zeigt exemplarisch die Ergebnisse mehrerer solcher semiquantitativer RT-PCR-Experimente mit integratspezifischen *primern*. Die deutlich unterschiedliche Bandenintensität der spezifischen RT-PCR-Produkte in den verschiedenen Geweben bestätigt die ursprünglich innerhalb des *differential display* beobachtete differenzielle Expression der zugrundeliegenden Gene.

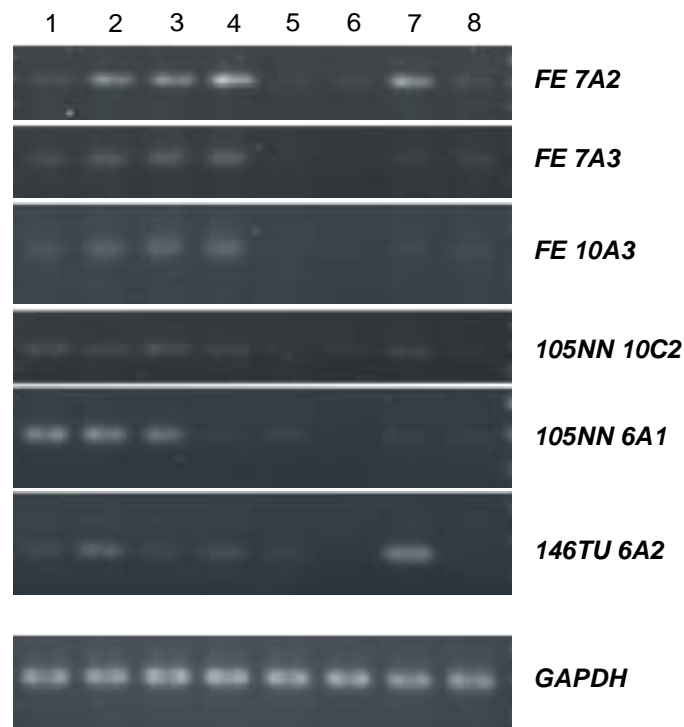


Abbildung 3.14: Ergebnisse semiquantitativer RT-PCR-Experimente zur Verifikation differenziell exprimierter cDNA-Fragmente. Exemplarisch sind hier die Ergebnisse für die cDNA-Fragmente *FE7A2*, *FE7A3*, *FE10A3*, *105NN10C2*, *105NN6A1* und *146TU6A2* gezeigt. Aufgetragen und aufgetrennt wurden je 5 µl der PCR-Reaktionen. Die zugrundeliegenden RNAs wurden aus den folgenden Geweben präpariert: 105NN (Spur 1), 146NN (2), adultes Nierengewebe (3), fetales Nierengewebe (4), 105WT (5), 128WT (6), 151WT (7). Die Probenentnahme erfolgte für das Fragment *FE7A3* (primer FE7A3-R/-L) nach 28 Amplifikationszyklen, für die übrigen Fragmente (*FE7A2* [primer FE7A2-R/-L], *FE10A3* [primer FE10A3-R/-L], *105NN10C2* [primer 105NN10C2-R/-L], *105NN6A1* [primer 105NN6A1-R/-L], *146TU6A2* [primer 146TU6A2-R/-L]) nach 35 Amplifikationszyklen. Die für die PCR-Reaktionen eingesetzten cDNA-Mengen entsprachen genau denjenigen, die für die im unteren Bildteil dargestellten, GAPDH-spezifischen RT-PCR-Reaktionen verwendet wurden (Probenentnahme nach 20 Amplifikationszyklen; primer GAPDH-1/-2). Die Abbildung verdeutlicht die differenzielle Expression der untersuchten cDNA-Fragmente in den Geweben (zur Auswertung s. Tab. 3.1). Parallel durchgeführte Negativkontrollen (PCR auf nicht revers transkribierter RNA bzw. Wasser) zeigten keine Amplifikate (Daten nicht abgebildet).

Mit dieser Vorgehensweise konnten 13 cDNA-Fragmente aus ursprünglich 34 isolierten und subklonierten Banden im *differential display* bestätigt werden (ca. 38%).

Insgesamt konnten innerhalb der vorliegenden Dissertation 17 cDNA-Fragmente der *differential display*-Experimente als differenziell exprimiert bestätigt werden. Dies entspricht einem Anteil von ca. 16% an den insgesamt 107 isolierten und klonierten cDNA-Fragmenten. Eine Diskussion der Effektivität der verschiedenen Verifikationsstrategien, sowie ein Vergleich der *differential display*-Methodik mit anderen Techniken zur Identifikation differenziell exprimierter Gene findet sich in Kapitel 4.2).

FE7A3

CAGAAGAGGAGAAGGAAAAGGAGATGCTGTTGGCACCGTTAAACATGCCTCTTAATGTCAACGGCTGGCAAATGCAAAA
GGGCTTAAAAATCAGCGATATAATTTTGTGCCGGAAAAAGCACAGAACGGCTCTGCAGCTTAAAACTTTCATTCTCTCATTT
CTCCGGATGGATGTTCTTCTTGACATTTTTTCTCTTTCGCTCTATTGTATTTTTGTCTTTCAGAGTCTTGGTTCCTCTG
TCCTCTTCTG

FE7A5

CAGAAGAGGACACAAAACAAAATGGTCAGCTGTCACCTTCTTCTTAGCAGATGAAAGTTCATCATAAATACTCAGAACCTT
GGTAAAAATACCCCATATACAGGGTCTTATGTTTTGGATACAAATGGGGTAAAGTGAAAAATAGCAAACCTGCAAGTCT
GGGCTCTGGAGCTTCTGCTGCCACCACGCTGGGCAGGAGTAGCCGCATGGGATGTCTCTCTCTCTG

FE7A6

CAGAAGAGGAGGGCATCCAGAGAATAGGCACCTAGTGGGACGGAAGCAGCCACGAGTTTTCATTAGCGTGTTTTACAGA
GAGATGAAGGGAGCTGGGAATCCAGACAAAGAGCTTCTATTATACATATAACTCCACATTGGAATTGTTAAAAAGTTGCT
TTCTTTTTGTTTTAATTAGCTTCTACTTCCCTATTCTAGAGTCCATTCTATTGTTCATCTTGGTCTCTCTG

FE10A3

AAGGAGGAAGGGACAGAAGTAGACAGGGACCAGCCTTCTCTAGAGAGCAAGAGGCCTTGACCACCTAATGCTTCCAGAG
TAAGGACAAAATCTCCAGGGTTAAAGAAAGAACAGAAACACTACCAACTGTGAGCTTTAATTACATCATAGATGTTAG
ATCAAATTATGTTTCATTTCTTGGAGACCAGTAGAAAAAAAATATTAGCTGAGCCATTTACTCGCTATGTGGTAGTAAC
AGCTACCATAATGAGCTGCAATTAGATATCTGTGCTCTCTCT

105N6A1

TGAACTGGACTACTATGAGGACAGACAATTATATCTATCAAAGTATTGGTAGTAGTGTCTAGCACATGATGGGCATTCCA
TTAATGACAAATATTACTGTAATCTCAAAAATAACATCTGAGATGCGAATAACTCTCTAATGCCTCATGAACTCAAAAGTT
TGCTTGTGTTGATGAGGGGAAAATGAAATAAACTTGAAAAATATCTCTAGAATAATGTTTTCTCAGAATGTCTATGGA
ATACAAATGTCCAATAGTGTTCATTAATCAGACTTCTGGGCAAGGATAATCTCTTTGGGACTAATCTCCCTGGTGGTTT
TCCCTGCGTCCAGTTCA

105NI0C2

AAGGAGGAAGCCGAACAGGGCCCTTCCAATGAATCTGCCGAAAGGAACCAATCTTTCAGTGGCAGCTGATTTTACAA
ATAATGTTGAGATACGAATAGCAAGGTGCTTCCCTCCCATCTTCTACCTGGTAAGAAAAATTTAGGATTTTAACTCCCCT
AAATGACATTTAGGGGACTCGTGTATGCCTAATCTTCTCTCTCT

146NI0C1

TGGAGAAGTCATTTCTTTTCTGGTCTGAGAGCAGCAGGCTGCTCTATCCACAATGACTGTCCAGTGGTAGGAGCCAGA
AGCAGGGGATCACGGGCTGTGGAGAGGCAGACAGAGAAGGAACAGAGATTCTGGGGTGGAAAAGCTGCTGCCTGAGG
ACTGGGGAGAGTGAGGTGGGTGATGGATGGGTATTGCCTGGTGGCCATGGTTGCATGCCTGAGCGCCTTGGCCAGCCAGC
CATAGGTGTGTGCTGGGCAAGAGGGCTCACTTGTGAAACTGAGTGTCTCCTTTCAAGAAGTGTCTAGGTGCAAAATCTCCC
CTCACCCAAGACAAAGGCCGGGTTCCACAAAGGGCTTTTGTGTTTCTGCGCCGAAGTGGGAGGCTAATCTCTGGGTCTGG
GGCACCCCTGGAGACGGGGTCCCGGCACACACAGCATACACACAGTGAAGGCTGCGCACTCATATGCCTGCTCTCT
CCTT

146WT6A2

TGAACTGGACCCACAGGTATCAGTATAAACTCATGATTTATATGTATACACATGCCTGATAGGTAAATATGGACATAAA
TATAGATATGTGTACAGATGTGGATAGATGTTAATGAACCTACATACATTTCTAGCTGTGTAATAACAGACGTGTATAG
ATGTGGGTAGGTGTTAATAAACTTACACACATTTCTAGCTCTATCTACTGAGAAGACCTAAAAGCAATGACACCCCTCAT
AGCAATAAACACACCTACTGTCCAGTTCA

151WT6C2

TGAACTGGACATGAGGGAAATGGAGTGACCTTACAGAAAGTACACCATTTGTAAGTGAACATTCTACAGATAATACACAA
ACTTACATGCTAGAAATACGTACATTTGATCACAACAGAGATGCATAAGGATATCAGGGAGGGATGAATGGTCCCAGAC
CAGAATCAAACCTAAGGGAAGCTATTAACATTTCTGAAGAGAGGTGGTGGTGGTCCAGTTCA

Z5C4 [*]

CTGATCCATGTGAAGTACAAGACATTTGAGATTCCAGTTATAAAAATTGAAAGTTTTGTGGTGGAGGATATTGCAACTGG
AGTTACAGACACTGTACTCGAAGTGGAAAGACTTTCAATTTGAGAAGATAACATTTGATCCAGCAGAAATGTCCAAATGAT
ATCAGTCTCAATCTCAGCTACAGGGAATGAGTAACTTTGAGTGGAGAAGAAACAAACATAGTGGGTATAATCATGG
ATCAG

Eine erste Charakterisierung der als tatsächlich differenziell exprimiert bestätigten cDNA-Fragmente erfolgte durch Homologievergleiche mit Einträgen in den öffentlichen Datenbanken (vgl. Kap. 2.14). Durch solche Analysen konnte sich ein Bild darüber

verschafft werden, inwieweit es sich beim isolierten Genfragment um den Teil eines bereits bekannten Gens, um ein neues Gen, das bereits als exprimiert bestätigte Sequenz vorliegt (ein sog. „*expressed sequence tag*“ [EST]), oder aber um eine unbekannte Sequenz handelt. Bei Vorliegen einer eindeutigen Homologie zu Einträgen der EST-Datenbank wurde die bekannte Sequenzinformation des cDNA-Fragments durch überlappende cDNA-Klonsequenzen der Datenbanken *in silico* erweitert. Mittels dieser Vorgehensweise konnten auch teilweise bereits Aussagen über die chromosomale Lokalisation des zugrundeliegenden Gens im Humangenom gemacht werden. Als Beispiel ist das cDNA-Fragment *FE7A1* zu nennen, dessen Identität mit Sequenzen des Transkriptionsfaktors *TCF2* zur Ermittlung der chromosomalen Lokalisation in 17cen-17q21 führte. Ferner erfolgte für die Mehrzahl der cDNA-Fragmente eine weiterführende Charakterisierung durch Zuordnung der cDNA zu einem humanen Chromosom. Dies geschah durch genomische PCR unter Verwendung eines Einzelchromosom-Hybridzellsets (Mensch/Nager; freundlich zur Verfügung gestellt von Dr. Sue Naylor, Univ. of Texas, San Antonio, USA) (Daten nicht gezeigt). Die so ermittelte Lokalisation ermöglichte danach eine Abschätzung, inwieweit das zugrundeliegende Gen im Bereich einer bereits bekannten Kandidatenregion für das Nephroblastom platziert ist.

In Tabelle 3.1 sind die für die verschiedenen cDNA-Fragmente ermittelten zusätzlichen Informationen bezüglich evtl. vorhandener Homologien auf Nukleotidebene und die Ergebnisse der chromosomalen Lokalisations-PCRs dargestellt. In dieser Tabelle sind die Fragmente *FE7A1* (*TCF2*), *146TU10A1* (*GLI3*), *151WT6A1* (*CDT151*) und *IAA1* (*TM7SF1*) nicht aufgeführt, da sie in weiterführenden Experimenten näher charakterisiert wurden. Die Ergebnisse für diese Fragmente (bzw. die korrespondierenden Gene/Genprodukte) finden sich in den Kapiteln 3.2.4-7.

Tab. 3.1: Übersicht über differenzielle Expression, vorliegende Homologien zu Datenbankeinträgen und chromosomale Lokalisation der verifizierten cDNA-Fragmente. Die Ergebnisse von Homologievergleichen (auf Nukleotidebene) mit Sequenzen der EST- („BLASTN [dbEST]“) und der nicht redundanten Gendatenbank („BLASTN [nr]“) sind dargestellt (angegeben sind Zugangsnummer und der Grad der Nukleotidentität in Prozent). Falls die identifizierten cDNAs Teil eines *unigene clusters* sind, so ist dessen Zugangsnummer ebenfalls angegeben („*unigene cluster*“). Die chromosomalen Lokalisationen der verschiedenen Fragmente sind die Ergebnisse der Lokalisations-PCRs auf Einzelchromosom-Zellhybriden (s.o.). Für das cDNA-Fragment *FE7A3* ist die anhand eindeutiger Sequenzhomologien zu Einträgen der htgs-Datenbank ermittelte chromosomale Lokalisation ebenfalls aufgeführt. In der Spalte „differenz. Expression“ ist der Gewebetyp mit vorherrschender Expression der entsprechenden cDNA angegeben. Bei schwacher Expression in einem weiteren Gewebetyp ist dieser in Klammern hinzugefügt. n.b.: = nicht bestimmt; mit [*] markierte cDNA-Fragmente stammen aus Projektteil A der differential display-Experimente, alle anderen aus Projektteil B (vgl. Abb. 3.12).

cDNA-Fragment	differenz. Expression	BLASTN (dbEST)	BLASTN (nr)	<i>unigene cluster</i>	chrom. Lokalisation
<i>FE7A2</i>	fetal (Normalgewebe)	EST zw93d04.r1 Homo sapiens 240/240 (100%) EST uq83g10.y1 Mus musculus 334/335 (99%)	nicht signifikant	-	Chr. 2
<i>FE7A3</i>	fetal (Normalgewebe)	EST ok56d04.s1 Homo sapiens 166/166 (100%)	AB037821 Homo sapiens mRNA for KIAA1400 protein, partial cds 239/247 (96%)	Hs. 146858	Chr. 4, 10, 15 (db htgs: Chr.4)
<i>FE7A5</i>	fetal (Tumorgewebe)	EST zf62b08.r1 Homo sapiens 77/77 (100%) EST #AW402519 UI-HF-BK0-aas-e-05-0- UI.r1 NIH_MGC_36 Homo sapiens 77/77 (100%)	nicht signifikant	Hs. 155575	Chr. 1
<i>FE7A6</i>	Normalgewebe	nicht signifikant	nicht signifikant	-	Chr. 1
<i>FE10A3</i>	fetal (Normalgewebe)	nicht signifikant	nicht signifikant	-	Chr. 2
<i>I05N6A1</i>	adult	nicht signifikant	nicht signifikant	-	Chr. 10
<i>I05N10C2</i>	Normalgewebe	EST xs46d04.x1 Homo sapiens 204/207 (98%)	nicht signifikant	Hs. 134417	Chr. 1, 2
<i>I46N10C1</i>	adult	EST wc26f09.x1 Homo sapiens 257/262 (98%)	nicht signifikant	-	n.b.

Fortsetzung Tabelle 3.1.

cDNA-Fragment	differenz. Expression	BLASTN (dbEST)	BLASTN (nr)	<i>unigene cluster</i>	chrom. Lokalisation
<i>146TU6A2</i>	WT146 (Normalgewebe)	nicht signifikant	nicht signifikant	-	Chr. 1
<i>151TU6C2</i>	(Tumorgewebe)	nicht signifikant	nicht signifikant	-	Chr. 12
<i>Z5C4</i> [*]	adult (Zelllinie WT128)	-	NM_014314.1 Homo sapiens RNA helicase (RIG-I), mRNA 237/239 (99%)	-	Chr. 9p12 (db nr)
<i>FE3C3</i> [*]	fetal	-	Homo sapiens alpha gene sequence 152/152 (100%) Human heart mRNA for heat shock protein 90, partial cds 139/139 (100%)	Hs. 180532	11q13 (db nr)
<i>FE4G1</i> [*]	fetal	MR4-BT0358-090300-004-h12 BT0358 Homo sapiens cDNA 585/598 (97%)	Homo sapiens chromosome 8 clone HPAC24 map 8q24.1, complete sequence 604/604 (98%)	-	8q24.1 (db nr)

3.2.4 Das Gen *TM7SF1*

Im Rahmen der *differential display*-Experimente konnte unter Verwendung der Primerkombination T11A und 10-1 (vgl. Kapitel 2.14.8) ein cDNA-Fragment isoliert werden, das durch seine bevorzugte Expression in adultem Nierengewebe auffiel. Die Reamplifikation, Sequenzierung und Klonierung ergaben ein DNA-Fragment von 436bp Länge, das im Verlauf als *IAAI* bezeichnet wird. Wie im folgenden beschrieben konnte anschließend die bekannte Sequenz erweitert und ein offener Leserahmen identifiziert werden. Das zugrundeliegende Gen wurde aufgrund von Strukturvorhersagen (s.u.) *TM7SF1* (für *transmembrane 7 superfamily member 1*) genannt (Zugangsnummer der Gendatenbank: AF027826).

3.2.4.1 Die *TM7SF1* cDNA

Datenbankanalysen mit der ermittelten Nukleotidsequenz des *IAAI* cDNA-Fragments ergaben keine signifikanten Homologien mit Einträgen der nicht redundanten Sequenzdatenbank, lieferten jedoch verschiedene überlappende Klone der EST-Datenbank als Sequenzen mit signifikanter Homologie. Diese Klone zeichneten sich alle dadurch aus, dass sie die Sequenzinformation um ca. 800 bp 3'-wärts erweiterten. Einer dieser Klone (IMAGp998P011414; im folgenden als *EST32* bezeichnet) wurde beim Ressourcenzentrum des deutschen Humangenomprojekts (RZPD) bestellt und im Rahmen der vorliegenden Arbeit sequenziert. Eine 100%ige Sequenzidentität im Überlappungsbereich mit *IAAI* bestätigte die zuvor durchgeführten Datenbankanalysen.

Um die bekannte Sequenz im 5'-Bereich von *IAAI* zu verlängern, wurde eine aus humanem, adultem Nierengewebe gewonnene cDNA-Bank (Bell *et al.*, 1986) mit Hilfe einer radioaktiv markierten *IAAI*-spezifischen Sonde untersucht. Dabei konnten zwei positive Phagenklone (*cIAAIA* und *cIAAIB*) isoliert werden. Die Sequenzanalyse der Phagenintegrate zeigten eine 100%ige Sequenzidentität untereinander. Ein Vergleich mit der Sequenz des *IAAI*-Fragments lieferte einen Überlappungsbereich von 300 bp und eine Erweiterung der bekannten cDNA-Sequenz um 842 bp. Mit der durch *cIAAIA* erhaltenen neuen Sequenzinformation wurden erneut Datenbank-Homologievergleiche durchgeführt. Sie ergaben Sequenzübereinstimmungen mit weiteren EST-Klonen, welche die bereits bekannte Sequenz am 5'-Ende jedoch nicht erweiterten. Auffällig war jedoch das Vorliegen verschiedener EST-Sequenzen mit zusätzlichen Nukleotiden innerhalb der *in silico* aus 3'-*EST32-IAAI-cIAAIA*-5' zusammengesetzten cDNA-Sequenz (s.u.).

Das Vorhandensein entsprechender Transkripte wurde mit Hilfe von RT-PCR Analysen verifiziert. Dabei zeigte sich, dass bei Verwendung der Oligonukleotide Phage-R und 5'For als *primer* für die PCR neben einem Hauptprodukt mit einer Länge von 575 bp ein

um ca. 200 bp verlängertes und ein um 120 bp verkürztes Produkt entstanden (Daten nicht gezeigt). Deren Klonierung und Sequenzanalyse bestätigte die Insertion von 223 bp ab Position nt 517 bzw. die Deletion von 125 bp ab Position nt 1018 im Vergleich zur *in silico* ermittelten cDNA-Sequenz. Die eindeutig vorherrschende Produktgröße der RT-PCR Experimente entsprach dabei der längstmöglichen cDNA-Variante von insgesamt 1998 bp. Das Auftreten verschiedener Transkriptgrößen lässt ein alternatives Spleißen der *TM7SF1* mRNA vermuten.

Die Lage der verschiedenen cDNA-Fragmente relativ zur gesamten bekannten Sequenz, die Position der alternativ gespleißten Exons, sowie die Lokalisation der verschiedenen als *primer* verwendeten Oligonukleotide sind in Abbildung 3.15 schematisch dargestellt.

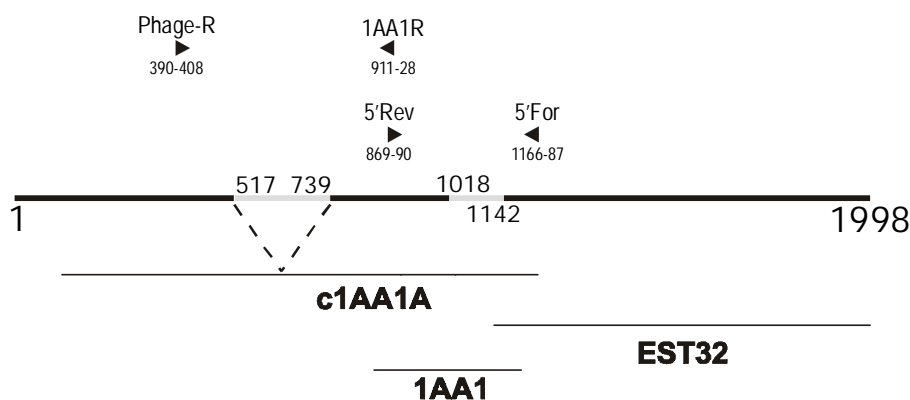


Abbildung 3.15: Schematische Darstellung der *TM7SF1*-cDNA. Die Lage der verschiedenen cDNA-Klone, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit generiert und sequenziert wurden (dünne horizontale Linien) relativ zur bekannten cDNA-Sequenz (obere fette horizontale Linie) ist dargestellt. Die grauen Bereiche der cDNA symbolisieren alternativ gespleißte Exons (die Zahlen oberhalb bzw. unterhalb der alternativ gespleißten Exons geben deren Anfangs- bzw. Endnucleotid innerhalb der Gesamt-cDNA an). Das erste alternativ gespleißte Exon (nt517-nt739) ist im Phagen-cDNA-Klon c1AA1A nicht enthalten, wurde allerdings im Rahmen verschiedener RT-PCR-Produkte (u. a. mit den Oligonukleotiden Phage-R und 1AA1R als *primer*) nachgewiesen und ist Bestandteil der vorherrschenden Transkriptisofom (Daten nicht abgebildet). Lage und Orientierung verschiedener als *primer* verwendeter Oligonukleotide sind im oberen Bereich der Grafik dargestellt.

Die aus doppelsträngiger Sequenzierung der verschiedenen cDNA-Klone und RT-PCR-Produkte erhaltenen cDNA-Sequenzen, sowie die aus den verschiedenen ORFs abgeleiteten Aminosäureabfolgen für *TM7SF1*-L, -I und -S (entsprechend der cDNA- und Proteingrößen steht „L“ für *long*, „I“ für *intermediate*, „S“ für *short*) sind in Abbildung 3.16 gezeigt.

```

1      cggcgcgatgcgcgagagacccccgggggcgggcgggcgccgtagccccg
52      ATGAGGCCCGAGCGTCCCCGGCCGCGCGGCGAGCGCCCCGGCCCGATGGAGACCCCGCCG
      M R P E R P R P R G S A P G P M E T P P
112     TGGGACCCAGCCGCAACGACTCGCTGCCGCCACGCTGACCCCGGCGGTGCCCCCTAC
      W D P A R N D S L P P T L T P A V P P Y
172     GTGAAGCTTGGCCTCACCCTGCTTACACCGTGTCTACGCGCTGCTCTTCGTGTTTCATC
      V K L G L T V V Y T V F Y A L L F V F I
232     TACGTGCAGCTCTGGCTGGTGTGCGTTACCGCCACAAGCGGCTCAGCTACCAGAGCGTC
      Y V Q L W L V L R Y R H K R L S Y Q S V
292     TTCTCTTTCTCTGCTCTTCTGGGCTCCCTGCGGACCGTCTCTCTCTCTCTACTTC
      F L F L C L F W A S L R T V L F S F Y F
352     AAAGACTTCGTGGCGCCAATTGCTCAGCCCCTTCGTCTTCTGGCTGCTCTACTGCTTC
      K D F V A A N S L S P F V F W L L Y C F
412     CCTGTGTGCTGCGATTTTTACCCCTCACGCTGATGAACCTGTACTTCACGCAGGTGATT
      P V C L Q F F T L T L M N L Y F T Q V I
472     TTCAAAGCCAAGTCAAATATTCTCCAGAATTACTCAAATACCGGTTGCCCTCTACCTG
      F K A K S K Y S P E L L K Y R L P L Y L
532     GCCTCCCTTTCATCAGCCTTGTTCCTGTTGGTGAATTTAACCTGTGCTGTGCTGGTA
      A S L F I S L V F L L V N L T C A V L V
592     AAGACGGGAAATGGGAGAGGAAGTTATCGTCTCTGTGCGAGTGGCCATTAATGACACG
      K T G N W E R K V I V S V R V A I N D T
652     CTCTTCGTGCTGTGTGCCGTCTCTCTCCATCTGTCTTACAAAATCTCTAAGATGTC
      L F V L C A V S L S I C L Y K I S K M S
712     TTAGCCAACATTTACTTGGAGTCCAAGGGCTCCCTCCGTGTGCAAGTACTGCCATCGGT
      L A N I Y L E S K G S S V C Q V T A I G
      A P P C V K stp
772     GTCACCGTGACTGCTTTACACCTCTCGGCCTGTACAACTGTTCATCCTGTCATTT
      V T V I L L Y T S R A C Y N L F I L S F
832     TCTCAGAACAAGAGCGTCCATTCCTTTGATTGACTGGTACAATGTATCAGACCAGGCA
      S Q N K S V H S F D Y D W Y N V S D Q A
892     GATTTGAAGAATCAGCTGGGAGATGCTGGATACGTATTATTTGGAGTGGTGTATTGTT
      D L K N Q L G D A G Y V L F G V V L F V
952     TGGGAACCTTACCTACCACCTTAGTCGTTTATTCTCCGAGTTAGAAATCCTACAAAG
      W E L L P T T L V V Y F F R V R N P T K
1012    GACCTTACCAACCTGGAATGGTCCCAGCCATGGATTTCAGTCCCAGATCTTATTTCTTT
      D L T N P G M V P S H G F S P R S Y F F
1072    GACAACCCCTCGAAGATATGACAGTGTGATGACCTTGCCTGGAACATTGGCCCTCAGGGA
      D N P R R R Y D S D D D L A W N I A P Q G
1132    CTTCAGGGAGGTTTGTCTCCAGATTACTATGATTGGGGACAACAACTAACAGCTTCCTG
      L Q G G F A P D Y Y D W G Q Q T N S F L
      F C S R L L stp
1192    GCACAAGCAGGAACCTTTGCAAGACTCAACTTTGGATCCTGACAAAACCAAGCCTTGGGTAG
      A Q A G T L Q D S T L D P D K P S L G stp
1252    catcagttaacagttttatggacgattcctcagatgaaaagcttcagaaaagcatagtga
1312    cagctgaatTTTTAGGGCacttttcccttaagaaatagaacttgatttttatttggttacag
1372    gtttccaatggcccataggaataagcaataatgtagactgataaaccttatttttagta
1432    ctaaagaggagccttctatttcagtggtataaattaaactttttaagaaaatctgt
1492    acttttataaagatgtattttgtataacttaataataatgctaaagtatactagggttt
1552    ttttttcttgagaatgttactgcaatcatggttagtttgacacagacttttatgcataat
1612    tcactttaaaaatagaaatataatggtctaatagttttttaagcttttgactaaagta
1672    ttccacaaatcttacctcttttaggtcactgatggcactccgattctgagtgccacattg
1732    gtgactcctaaaatacagttgacaacttagccaattgcaactccagtggtgataattaa
1792    aatgaaatggtaagcagcagactgtaaggtcttttagagatttttttaaggttcaggc
1852    cgtaggttcccaaggaatccttaagtttggcccaagactggtaactcctttcagtag
1912    ggcgctaagtatacacattaatgataagttgataacattaaaaatgtagctgacttatc
1972    ctattaaacctcctctgctatgttcaac

```

Abbildung 3.16: cDNA- und abgeleitete Aminosäuresequenz von TM7SF1. Nukleotide des offenen Leserahmens sind in Großbuchstaben hervorgehoben, Kleinbuchstaben stehen für flankierende nicht kodierende Sequenzen (5'- und 3'-UTR). Die aus der Sequenz des offenen Leserahmens ermittelte Aminosäuresequenz ist unter den korrespondierenden Basentriplets angegeben. Das in frame Stop-Codon im 5'-UTR ist durchgestrichen dargestellt. Die beiden alternativ verwendeten Exons sind einfach bzw. doppelt unterstrichen. Die durch ihre Aussparung resultierenden Veränderungen der Aminosäuresequenz (Verschiebung des Leserahmens) ist in Fettdruck unter den korrespondierenden Basentriplets angegeben. stp:= Stop-Codon am Ende des jeweiligen ORF.

Dass es sich bei den verkürzten Transkripten *TM7SF1-I* und *-S* nicht um PCR-Artefakte sondern um Produkte alternativen Spleißens handelt, wurde mittels Sequenzierung der

entsprechenden genomischen Bereiche gezeigt. Zu diesem Zweck wurde der PAC-Klon 43C3 aus einer hierarchisch angeordneten humanen PAC-Bank (Ioannou *et al.*, 1994) mit Hilfe einer *TM7SF1*-spezifischen PCR-Reaktion (verwendete *primer*: local-5/local-3) und anschließender Koloniefilterhybridisierung isoliert, und die Exon-Intron-Übergänge im Bereich der (wahrscheinlich) alternativ gespleißten Exons sequenziert (verwendete Oligonukleotide: local-5/-3 und local-x/-y). Abbildung 3.17 zeigt die genomische Sequenz an den entsprechenden Exon-Intron-Grenzen. Das Vorliegen der konservierten, exonflankierenden GT und AG-Nukleotide spricht dafür, dass die beiden angesprochenen Exons von *TM7SF1* alternativ transkribiert werden.

```

5'-ccttccagGTGCCCCTCTACCTGGCCTCCCTCTTCATCAGCCTTGTTTTCTGTGGTGAATTTAACCTGTGCTGTG
CTGGTAAAGACGGGAAATGGGAGAGGAAGTTATCGTCTCTGTGCGAGTGGCCATTAATGACACGCTCTTCGTGCTGTGT
GCCGTCTCTCTCCATCTGTCTCTACAAAATCTCTAAGATGTCTTAGCCAACATTTACTTGGAGTCCAAGgtaggtgg-3'

5'-ccttctagACCAACCCTGGAATGGTCCCCAGCCATGGATTTCAGTCCCAGATCTTATTTCTTTGACAACCCTCGAAGAT
ATGACAGTGATGATGACCTTGCCCTGGAACATTGCCCTCAGGGACTTCAGGGAGgttaagacc-3'

```

Abbildung 3.17: Exon-Intron-Grenzen der alternativ gespleißten Exons. Der obere Teil zeigt den für *TM7SF1-S*, der untere Teil der Grafik den für *TM7SF1-I* verantwortlichen alternativen Spleiß. Exonsequenzen sind als Großbuchstaben, Intronsequenzen als Kleinbuchstaben dargestellt. Die konservierten AG und GT-Nukleotide der Introngrenzen sind fett hervorgehoben.

Die tatsächliche Transkriptgröße von *TM7SF1* wurde mit Hilfe von *Northern Blot* Experimenten untersucht. Zu diesem Zweck wurde das radioaktiv markierte 1AA1 cDNA-Fragment in einer *Northern*-Hybridisierung mit RNA aus humaner adulter bzw. fetaler Niere untersucht. Die Abbildung 3.18 zeigt das Auftreten einer ca. 2,4 kbp großen Bande in RNA aus adultem Nierengewebe. Dieses Hybridisierungssignal entspricht wahrscheinlich der längsten *TM7SF1*-Isoform (*TM7SF1-L*), da auch schon in RT-PCR-Experimenten das entsprechende Produkt generell am stärksten amplifiziert wurde (s.o.).

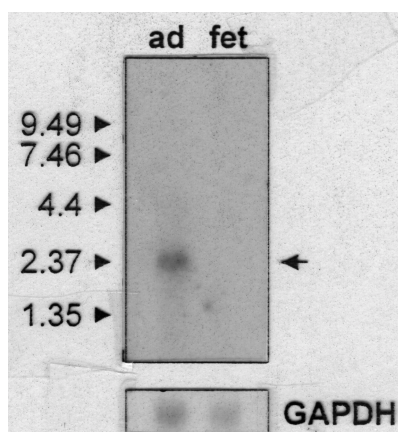


Abbildung 3.18: Northern-Hybridisierung *TM7SF1* (Transkriptgröße und differenzielle Expression). Gezeigt ist das Autoradiogramm eines *Northern blots* mit RNA aus adulter (ad) und fetaler (fet) Niere, der mit dem radioaktiv markierten 1AA1 cDNA-Fragment hybridisiert wurde. Die Position des *TM7SF1*-spezifischen Signals ist mit einem Pfeil rechts markiert. Die Größenangaben am linken Rand der Autoradiografie sind in der Dimension „kbp“.

Der für die Verifikation der differentiellen Expression von *TM7SF1* notwendige Abgleich des *blots* durch die Hybridisierung mit einer *GAPDH*-spezifischen Sonde ist im unteren Teil der Abbildung gezeigt.

Da zwischen im *Northern blot* beobachteter Transkriptgröße und der klonierten cDNA eine Diskrepanz von ca. 400 bp besteht, wurden 5'-RACE-Experimente (RACE= *rapid amplification of cDNA ends*) mit für den bekannten 5'-Bereich spezifischen *primern* durchgeführt. Die isolierten Amplifikate dieser Experimente verlängerten die Nukleotidsequenz im 5'-Bereich von *TM7SF1* nicht (Daten nicht abgebildet). Da der 5'-Bereich der *TM7SF1*-cDNA einen sehr hohen GC-Gehalt aufweist, ist ein möglicher Grund für die negativen Ergebnisse der RACE-Experimente die Bildung stabiler Sekundärstrukturen während der Erststrangsynthese. Diese könnten eine effektive reverse Transkription verhindern und zu einem verfrühten Abbruch der DNA-Polymerisation führen. Alternativ kann es sich bei Nukleotid eins der *TM7SF1*-cDNA auch um den tatsächlichen Transkriptionsstart handeln. Die beobachtete Größendiskrepanz wäre dann durch eine entsprechende Anzahl an Adenin-Nukleotiden im Poly-A-Schwanz des Transkripts zu erklären.

3.2.4.2 Untersuchungen zur differentiellen und gewebespezifischen Expression

Neben der Transkriptgröße verifiziert das Ergebnis des *Northern blot*-Experiments (Abbildung 3.18; Kapitel 3.2.4.1) die bereits im *differential display* beobachtete differenzielle Expression von *TM7SF1*: Das Auftreten einer intensiveren Bande in RNA aus adulter Niere im Vergleich zu fetaler Niere beweist eine ansteigende Expression von *TM7SF1* im Zuge der Nierenentwicklung.

Zur Analyse der gewebespezifischen Expression wurden *Multiple Tissue Northern Blots* (Fa. Clontech, Heidelberg) mit einer *TM7SF1*-spezifischen Sonde hybridisiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.19 dargestellt.

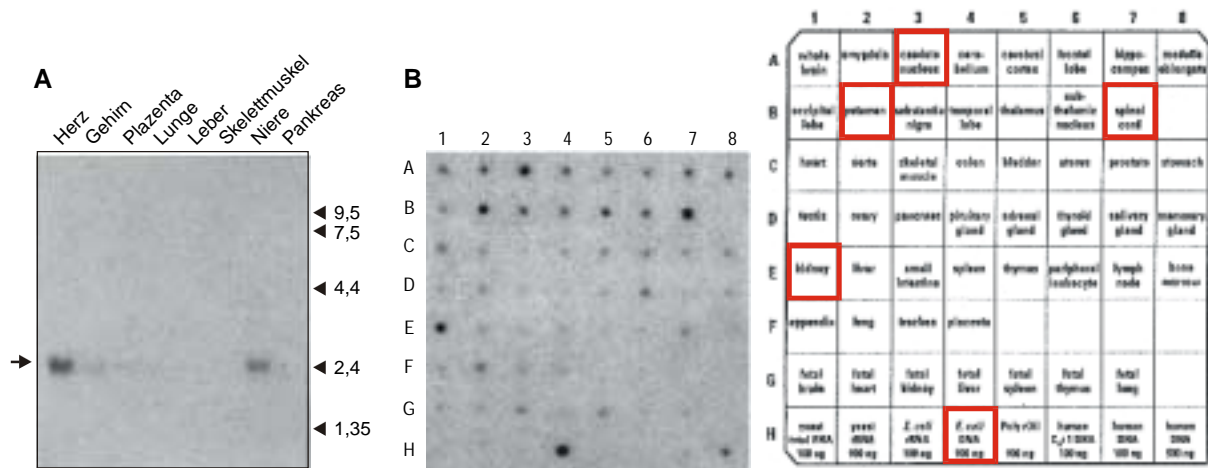


Abbildung 3.19: Northern blot-Experimente zur Untersuchung der gewebespezifischen Expression von *TM7SF1*. In A ist die Hybridisierung einer *TM7SF1*-spezifischen Sonde (3'-UTR; Sequenz zwischen den Oligonukleotiden local-5 und local-3) auf einem *Human Multiple Tissue Northern Blot I* (Fa. Clontech, Heidelberg) gezeigt. Die Position der spezifischen Signale in den Spuren mit RNA aus Herz, Niere, Gehirn, Plazenta (2 µg poly A⁺-RNA je Gewebe/Spur) ist am linken Bildrand durch einen Pfeil markiert. Die Positionen der Banden eines RNA-Größenmarkers sind rechts (in kbp) vermerkt. B zeigt das Autoradiogramm einer Hybridisierung der gleichen Sonde auf einem *Human Multiple Tissue RNA Master Blot* (Fa. Clontech; Heidelberg). Die Gewebeerherkunft der RNA-spots mit den stärksten Signalen (Nucleus Caudatus, Putamen, Rückenmark, Niere, *E. coli*-DNA) kann aus dem Schema rechts entnommen werden.

Deutlich zu erkennen ist das Auftreten der 24 kbp großen Bande in den Spuren mit RNA aus Niere und Herz (Abb. 3.19A). Schwächere Signale konnten nach längerer Exposition in RNAs der Plazenta und Gehirn detektiert werden. Das in Abbildung 3.19B gezeigte Autoradiogramm einer Hybridisierung der gleichen Sonde auf einem *Human Multiple Tissue RNA Master Blot* zeigt neben den sehr schwachen Signalen in nahezu allen Geweben starke Signale in RNA aus adulter Niere, Herz, Nucleus Caudatus, Putamen und Rückenmark. Der Grund für die starke Hybridisierung der Sonde mit DNA aus *E. coli* ist unklar. Da das komplette Genom von *E. coli* sequenziert und in öffentlichen Datenbanken zugänglich ist, müsste eine auf hoher Homologie basierende Hybridisierung der Sonde mit *E. coli*-Sequenzen in Datenbanksuchen angezeigt werden. Dies war jedoch nicht der Fall. Da die im Labor für die PCR verwendete Taq-Polymerase aus Bakterien isoliert wurde, könnte es sich beim beobachteten Signal um eine Hybridisierung mit „verunreinigender“ *E. coli* DNA handeln. Diese wäre dann im Rahmen der radioaktiven Markierung des *TM7SF1*-cDNA-Fragments auch markiert worden.

3.2.4.3 In silico-Analyse des offenen Leserahmens

Da auf Nukleotidebene keine signifikante Homologie von *TM7SF1* zu bereits bekannten Genen festgestellt werden konnte, wurde die *TM7SF1*-cDNA auf das Vorliegen eines offenen Leserahmens (ORF) hin untersucht. Dabei zeigte sich, dass sowohl die längste (*TM7SF1-L*) als auch die mittlere Spleißvariante von *TM7SF1* (*TM7SF1-I*) einen vollständigen ORF von 1198 bp (399 Aminosäuren; *TM7SF1-L*) bzw. 987 bp (329 Aminosäuren; *TM7SF1-I*) beinhalten, die sich lediglich im äußersten 3'-Bereich durch den alternativen Spleiß unterscheiden. Der ORF beider Transkripte wird unmittelbar vor dem putativen Start-Codon (ATG) durch ein *in frame*-Stop-Codon (TGA; vgl. Abb. 3.16 in Kap. 3.2.4.1) flankiert.

Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen wurden anschließend mit Hilfe verschiedener Strukturvorhersageprogramme analysiert. Dabei wurde deutlich, dass verschiedenste Transmembrandomänen-Vorhersageprogramme sieben helikale Transmembrandomänen (TMD) innerhalb von *TM7SF1* anzeigten. Je nach verwendetem Vorhersagealgorithmus schwankte dabei die Anzahl der TMDs nicht, ihre relative Lage und Länge nur um wenige Aminosäuren. Exemplarisch für eine Strukturvorhersage für *TM7SF1-L* und *-I* ist in der Abbildung 3.20 das Ergebnis des „*DAS Transmembrane Prediction Algorithm*“ dargestellt. Dieser Algorithmus stellt in seiner Ergebnisgrafik die Wahrscheinlichkeit des Vorliegens einer helikalen TMD (in relativen Einheiten) in Abhängigkeit von der Aminosäuresequenz dar. Zu Erkennen ist das Vorliegen von sieben deutlich über den Signifikanzschwellen liegenden Maxima der Funktion sowohl für *TM7SF1-L* als auch für *TM7SF1-I*. Die *TM7SF1-I*-cDNA endet dabei direkt hinter der letzten vorhergesagten TMD.

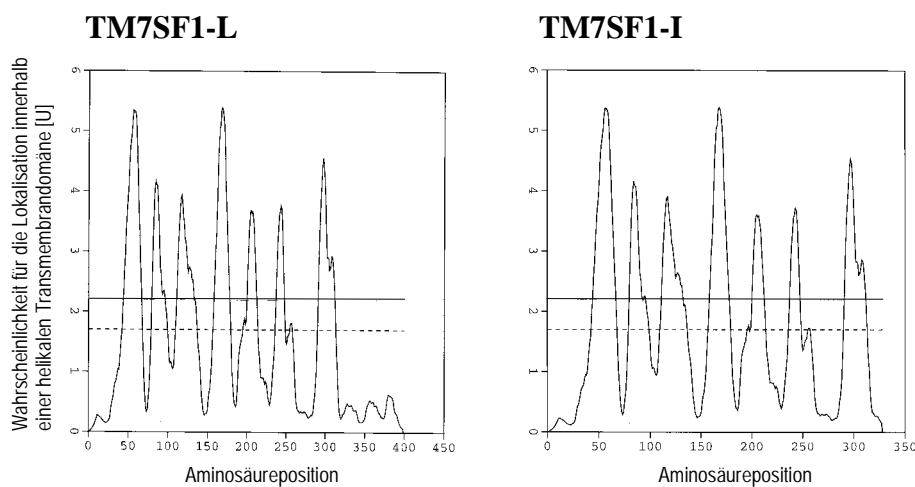


Abbildung 3.20: Sekundärstrukturvorhersage für *TM7SF1* mit dem *DAS Transmembrane Prediction Algorithm*. Die Wahrscheinlichkeit mit der sich eine Aminosäure innerhalb einer helikalen TMD befindet, ist als Funktion ihrer Position dargestellt. Sieben Maxima (entsprechen sieben TMDs) sind auszumachen. Ein strikter (durchgezogene Linie) und ein weniger strikter (gestrichelte Linie) Signifikanz-Schwellenwert sind eingezeichnet. Alle Maxima übersteigen diese Werte deutlich.

Sieben helikale Transmembrandomänen sind charakteristisch für die Familie der G Protein-gekoppelten Rezeptorproteine. Inwieweit es sich bei TM7SF1 um einen G Protein-gekoppelten Rezeptor handelt, kann nicht abschließend festgestellt werden. Die Mitglieder dieser Familie zeichnen sich nicht durch eine hohe Konservierung ihrer Primärstruktur (Aminosäuresequenz) aus. Vielmehr ist eine charakteristische Sekundär- und Tertiärstruktur der Familienmitglieder beschrieben.

Die Diskussion über eine mögliche Zugehörigkeit von TM7SF1 (-L und -I) zur Proteinfamilie der G Protein-gekoppelten Rezeptoren findet sich in Kapitel 4.3.2.

Weitere Analysen des putativen Proteins hinsichtlich seiner Lokalisierung innerhalb der Zelle (PSORT-Algorithmensammlung; Ergebnis: vermutlich in der Plasmamembran), Orientierung innerhalb der Zellmembran und potenzieller posttranslationaler Modifikationen (PROSITE-Datenbank) konnten zu einem Modell für das Aussehen der putativen TM7SF1-L und -I Genprodukte zusammengetragen werden, das in Abbildung 3.21 gezeigt ist und die verschiedenen Eigenschaften zusammenfasst.

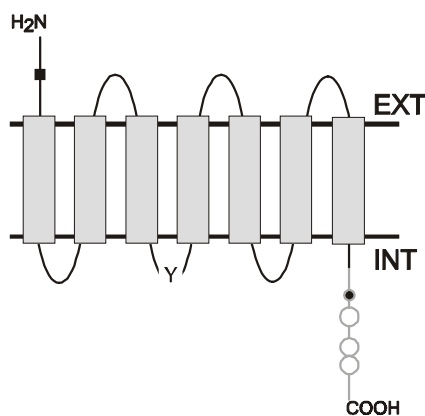


Abbildung 3.21: Schematische Darstellung der TM7SF1-Struktur (Modell). TM7SF1 als Protein der Zellmembran mit sieben helikalen Transmembrandomänen (graue Rechtecke). Der Aminoterminus (H_2N) des Proteins wird als extrazellulär gelegen (EXT), der Carboxyterminus ($COOH$) als intrazellulär gelegen (INT) vorhergesagt. Schwarze Vierecke symbolisieren potenzielle N-gekoppelte Glykosylierungsstellen (Asn26). Putative Phosphorylierungsstellen für Tyrosinkinasen (Y; Tyr154), und Serin/Threoninkinasen (Proteinkinase C, Ser334, schwarzer Kreis; Casein Kinase 2, Ser348/Thr385/Ser389, offene Kreise) sind hervorgehoben. Der in der I-Version von TM7SF1 fehlende, putativ zytoplasmatische „Schwanz“ des Proteins ist grau dargestellt.

3.2.4.4 Chromosomale Lokalisierung mittels Fluoreszenz in situ-Hybridisierung (FISH)

Die Pathogenese des Nephroblastoms wurde mit verschiedenen genomischen Loci in Verbindung gebracht (vgl. Kapitel 1.2.1). Um zu überprüfen, ob *TM7SF1* an einem mit der Erkrankung gekoppelten chromosomalen Locus liegt, wurden FISH-Experimente mit *TM7SF1*-enthaltenden PAC-Klonen durchgeführt. Mittels genspezifischer PCR auf DNA somatischer Zellhybride konnte *TM7SF1* zuvor auf Chromosom 1 lokalisiert werden (Daten nicht gezeigt).

Abbildung 3.22 zeigt das Ergebnis einer Hybridisierung des PAC-Klons 43C3 auf humanen Metaphasechromosomen. Die Hybridisierung der fluoreszenzmarkierten PAC-DNA auf dem langen Arm beider Chromosomen 1 in der Region q42-43 ist deutlich zu erkennen.

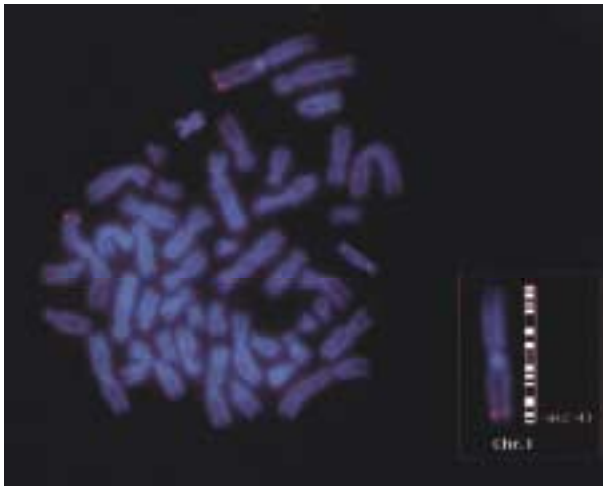


Abbildung 3.22: Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierung des PAC-Klons 43C3 auf humanen Metaphasechromosomen. Die Hybridisierungen der PAC-DNA sind als rote Punkte auf allen vier Chromatiden der langen Arme beider Chromosomen 1 zu erkennen. Die schematische Darstellung unten rechts ermöglicht die Lokalisierung der PAC-DNA (und damit die Platzierung von *TM7SF1*) in die chromosomale Region 1q42-43.

3.2.4.5 Isolation und Charakterisierung des homologen Gens der Maus (*Tm7sf1*)

Funktionelle Analysen von Genen bzw. von Genprodukten werden vornehmlich in Modellorganismen durchgeführt. Um eine Untersuchung von *TM7SF1* im Maussystem zu ermöglichen wurde das homologe Gen der Maus isoliert und charakterisiert (Spangenberg *et al.*, 1999; Spangenberg *et al.*, Manuskript in Vorbereitung).

Datenbankanalysen mit der Nukleotidsequenz der humanen cDNA lieferten verschiedene Maus spezifische EST-Klone, die vom Ressourcenzentrum des Deutschen Humangenomprojektes bestellt und doppelsträngig sequenziert wurden. Aus der erhaltenen Sequenz wurden anschließend Oligonukleotide abgeleitet, die im Rahmen von RT-PCR Experimenten auf revers transkribierter Maus Nieren-RNA (von Mäusen des Stammes *Japanese Fancy 1*) als *primer* eingesetzt wurden. Die aus doppelsträngiger Sequenzierung dieser Produkte erhaltene Sequenzinformation bestätigten die zuvor mittels Datenbankanalysen bzw. die auf Grundlage der EST-Klone ermittelte cDNA-Sequenz von *Tm7sf1* (die cDNA-Sequenz von *Tm7sf1* ist in der Gendatenbank (*GenBank*) unter der Zugriffsnummer AF154337 abgelegt). *Primer*, die auf Maus-cDNA die entsprechenden Bereiche der beim humanen Gen alternativ gespleißten Exons amplifizierten, lieferten keine den humanen Spleißformen entsprechenden Produkte. Vielmehr wurden jeweils nur cDNA-Produkte amplifiziert, die der längsten humanen Form (*TM7SF1-L*) entsprechen (Daten nicht abgebildet). Unterschiedliche cDNA-Varianten von *Tm7sf1* konnten lediglich im 3'-UTR der Maus-cDNA (PCR mit den Oligonukleotiden MTM7-S und MTM7-AS als *primer*) beobachtet werden. Die doppelsträngige Sequenzierung der subklonierten Produkte ergab als Ursache für die Längenunterschiede die verschieden häufige Wiederholung des Trinukleotids CAG (ab nt 1795) in diesem Bereich der cDNA.

Um Aussagen über die Transkriptgröße von *Tm7sf1* machen zu können, wurden *Northern* Analysen durchgeführt. Die Abbildung 3.23 zeigt die Hybridisierungsergebnisse zwei verschiedener Sonden mit unterschiedlicher Lage innerhalb der *Tm7sf1*-cDNA.

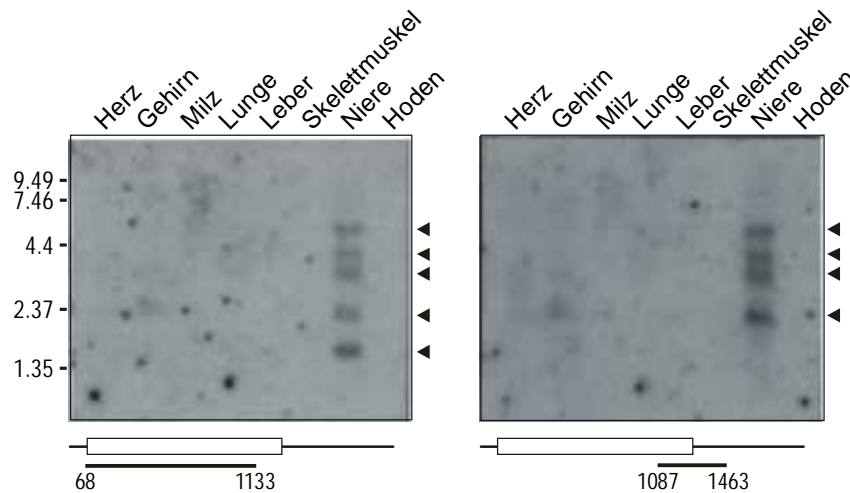


Abbildung 3.23: Northern blot-Experimente (I) zur Untersuchung der Transkriptgröße und gewebespezifischen Expression von *Tm7sf1*. Die Ergebnisse der Hybridisierung zwei verschiedener *Tm7sf1*-spezifischer Sonden auf einem *Mouse Multiple Tissue Northern Blot I* (Fa. Clontech, Heidelberg) ist gezeigt. Die Lage der für die Hybridisierungen verwendeten Sonden ist unterhalb der Autoradiogramme skizziert (das offene Rechteck symbolisiert dabei den ORF; die dicke Linie darunter zeigt die Lage der verwendeten Sonde relativ zur *Tm7sf1*-cDNA). Während für die links gezeigte Hybridisierung eine Sonde, die große Teile des ORF abdeckt, verwendet wurde (Nukleotide 68 bis 1133; generiert mit den Oligonukleotiden MVER-1/MTM7-F1), liegt die Sonde des rechts dargestellten Hybridisierungsexperimentes im Übergangsbereich von ORF und 3'-UTR (Nukleotide 1087 bis 1463; generiert mit den Oligonukleotiden MTM7-S/MTM7-AS). Die Positionen der in der Autoradiografie auftretenden Banden sind am jeweiligen rechten Rand der Abbildungen durch Pfeilspitzen markiert. Die Herkunft der RNAs aus den entsprechenden Geweben (jeweils 2,0 µg poly A⁺-RNA pro Spur) sind über den korrespondierenden Spuren, die Positionen und Größen des verwendeten Längenstandards (in kbp) sind am linken Bildrand angegeben.

Wie aus den Autoradiogrammen zu entnehmen ist, detektieren die verwendeten Sonden mehrere Transkripte unterschiedlicher Größe in RNAs der Gewebe Niere (starke Expression) und Gehirn (schwache Expression). Während die große Teile des ORF abdeckende Sonde fünf spezifische Banden der Größen 1,4 kbp, 2,2 kbp, 3,2 kbp, 3,8 kbp und 5,2 kbp liefert (vgl. Abb. 3.23 links), fehlt im rechten Autoradiogramm die kleinste Bande. Die Diskussion über mögliche Ursachen für diese Beobachtung (Redundanz oder alternative Polyadenylierung) findet sich in Kapitel 4.3.2.

Das Ergebnis der Hybridisierung eines *Mouse RNA Master Blot* lieferte das in Abbildung 3.24 gezeigte Autoradiogramm.

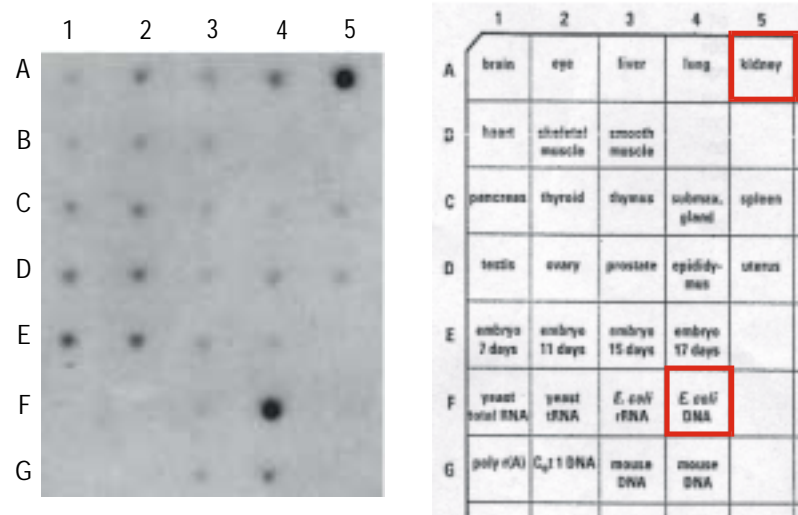


Abbildung 3.24: Northern blot-Experiment (II) zur Untersuchung der gewebespezifischen Expression von *Tm7sf1*. Die Abbildung zeigt das Ergebnis der Hybridisierung einer *Tm7sf1*-spezifischen Sonde (entsprechend Abb. 3.23 links) auf einem *Mouse Multiple Tissue RNA Master Blot* (Fa. Clontech, Heidelberg). Die Gewebeerkrankung der RNA-spots mit den stärksten Hybridisierungssignalen (Niere, *E. coli*-DNA) kann aus dem Schema rechts entnommen werden. Das starke Signal in *E. coli*-DNA ist wahrscheinlich bedingt durch parallel mit der cDNA-Sonde radioaktiv markierte *E. coli*-DNA (vgl. hierzu Kap. 3.2.4.2).

Die chromosomale Lokalisation von *Tm7sf1* innerhalb des Mausgenoms wurde mit Hilfe des *T31 mouse radiation hybrid panel* (Fa. Research Genetics, Inc., USA) ermittelt. Zu diesem Zweck wurden DNAs der 100 Maus/Hamster-Hybridzelllinien mit Hilfe der PCR unter Verwendung der Oligonukleotide MVER-1 und MVER-2 als *primer* untersucht. Anhand der An- oder Abwesenheit von *Tm7sf1*-Sequenzen in den DNAs der verschiedenen Hybridzelllinien kann durch ein solches Experiment die genomische Lokalisation des Gens experimentell bestimmt werden. Die Ergebnisse zweier unabhängig voneinander durchgeführter PCR-Untersuchungen wurden mit Hilfe des *Radiation Hybrid Data Submission Web Interface* des *Jackson Laboratory* (<http://www.jax.org/resources/documents/cmdata/rhmap/rhsubmit.html>) in eine genomische Lokalisation umgesetzt. Dabei wurden nur solche PCR-Ergebnisse als positiv gewertet, in denen beide durchgeführten PCRs das entsprechende *Tm7sf1*-Produkt lieferten. Wie aus Abbildung 3.25 hervorgeht ist *Tm7sf1* 23 cR distal des Chromosom 13-spezifischen Markers D13Mit173 (*LOD score*: 15,6) lokalisiert. Der proximale Bereich von Mauschromosom 13 ist homolog zum äußersten distalen Bereich des langen Arms von Chromosom 1 des Menschen. Dieser Schluss kann aus der Beobachtung gezogen werden, dass sich eine Syntäniegruppe von Genen aus 1q distal (Mensch) als Syntäniegruppe auf Chromosom 13 proximal (Maus) befindet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Homology/>). Bei den Genen handelt es sich neben *TM7SF1* um *NID*, *RYR2* und *LYST*.

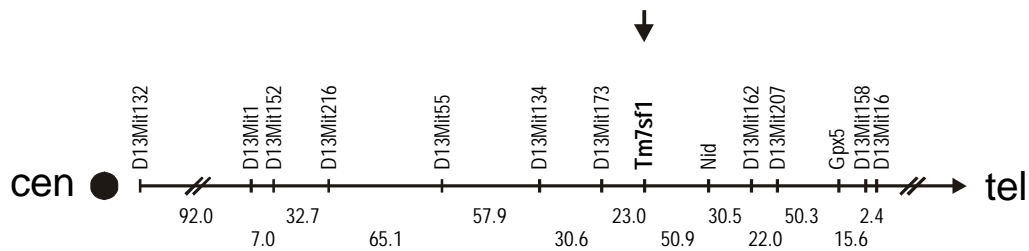


Abbildung 3.25: Chromosomale Lokalisation von *Tm7sf1* im Mausgenom. Ein Teil von Mause Chromosom 13 ist als horizontale Linie mit links gelegenem Centromer (cen) schematisch dargestellt. Auf ihr ist die Lage verschiedener chromosomaler Marker skizziert. Die Abstände zwischen den Markern (in centi Ray 3000) sind unten angegeben. *Tm7sf1* ist in fetter Schreibweise hervorgehoben und mit einer Pfeilspitze markiert. Das syntäne *Nid*-Gen ist ebenfalls verzeichnet.

Die Diskussion über die Bedeutung der dargestellten Ergebnisse findet sich in Kapitel 4.3.2.

3.2.4.6 Interspeziesvergleich auf Nukleotid- und Aminosäureebene

Die Isolation und Charakterisierung homologer Gene verschiedener Spezies erlaubt einen direkten Vergleich der Gene und Genprodukte hinsichtlich ihrer Nukleotid- und Aminosäuresequenzen, sowie bezüglich der für sie analysierten Strukturmerkmale. Abbildung 3.26 zeigt den Homologievergleich TM7SF1/*Tm7sf1* auf Nukleotidebene. Dabei wurden die verschiedenen funktionellen Abschnitte (5'-UTR, ORF, 3'-UTR) getrennt voneinander analysiert. Es ergeben sich Sequenzidentitäten von 50,5% für den 5'-UTR, 89,8% für den ORF und 75,6% für den 3'-UTR. Ein Vergleich der Homologiewerte untereinander zeigt, dass der Bereich des ORF am stärksten konserviert ist und dass die Konservierung vor und hinter dem ORF deutlich abfällt.

Der hohe Grad der Konservierung zeigt sich auch beim Vergleich der aus den ORFs abgeleiteten Aminosäuresequenzen in Abbildung 3.27.

TM7SF1	Ccgatg A	Ccgatg G	
Tm7sf1		Ccgatg G	
TM7SF1	1	MRPERPRPRGSAPGPMETPPWDPARND SLP PTLTPAVPPYVK LGLTVVYTVFYALLFVFI	
Tm7sf1	1	MEAPPWEPVRND SLP PTLSPAVPPYVK LGLTAVYTVFYALLFVFI	n-glyc
			x x x x x
TM7SF1	61	YVQLWLVLR YRHKRL SYQSVFLFCLFWASLRTVLF SFYFKDFVAANS LS PFVFWLLYCF	
Tm7sf1	46	YAQLWLVLR YRHKRL SYQSVFLFCLFWASLRTVLF SFYFRDFVAANS SP FVFWLLYCF	
			x x x
TM7SF1	121	PVCLQFFTLTLMNLYFTQVIFKAKSKY SPELLKYR LPLYLASLFI SLV FLLVNLTCAVLV	Tyr-kin
Tm7sf1	106	PVCLQFFTLTLMNLYFTQVIFKAKSKY SPELLKYR LPLYLASLFI SLV FLLVNLTCAVLV	
TM7SF1	181	KTGNWERK VIVSVRVAINDTLFVLC AVLSICLYKISKMSLANIY LES KGSSVCQ VTAIG	
Tm7sf1	166	KTGDWDRK VIVSVRVAINDTLFVLC AI SLS ICLYKISKMSLANIY LES KGSSVCQ VTAIG	
			x x x
TM7SF1	241	VTVILLYTSRACYNLFILSF QNKSVHSFDYD WYNVSDQ ADLKNQ LGD AGYVLF GVVLFV	n-glyc
Tm7sf1	226	VTVILLYASRACYNLFILSF QIKNVHSFDYD WYNVSDQ ADLKS QLGD AGYV VF GVVLFV	
			x x x x
TM7SF1	301	WELLPTTLVVYFFR VRNPTKDLTNP GMVPSHGFS PRSYFFDN PRRYDS DDDLAWN IA PQ Q	PKC CK2
Tm7sf1	286	WELLPTTLVVYFFR VRNPTKDLTNP GMVPSHGFS PRSYFFDN PRRYDS DDDLAWN IA PQ Q	
TM7SF1	361	LQGGFAPDYD WGQQTNSFLAQAGTL-QD STLDPDKPSLG 399	CK2
Tm7sf1	346	LQGSFAPDYD WGQQNSFLAQAGTLHQD STLDPDKASQ 385	
			x x x x

Abbildung 3.27: Aminosäuresequenzvergleich von TM7SF1(-L) und Tm7sf1. Unterschiedliche Aminosäuren zwischen den Spezies sind durch ein x unterhalb der Sequenzen dargestellt. Die vorhergesagten Transmembrandomänen sind eingerahmt; putative posttranslationale Modifikationsstellen sind durch einen horizontalen Balken oberhalb der Konsensussequenz dargestellt (nglyc:= N-gekoppelte Glykosylierung; Tyr-kin:= Tyrosinkinase-Phosphorylierungsstelle; CK2 bzw. PKC:= Phosphorylierungsstelle für Casein Kinase 2 bzw. Proteinkinase C). Die von Kozak (1996) als relevant für die Translationsinitiation beschriebenen Nukleotide, die das ATG Start-Codon umgeben, sind im aminoterminalen Bereich über der Sequenz angedeutet (fett und in Großbuchstaben hervorgehoben sind die entscheidenden Nukleotidpositionen +4 und -3). Dabei entspricht die Nukleotidsequenz im Bereich des zwischen humaner und muriner cDNA konservierten ATG einer der angegebenen Literatursequenzen (YNNatg**G**, mit Y:= Pyrimidinbase; vgl. Kozak et al., 1996), die Nukleotidsequenz im Bereich des nur in der humanen cDNA auftretenden ATG-Basentriplets hingegen nicht.

Abbildung 3.27 zeigt, dass sich über eine Länge von 385 Aminosäuren nur 21 zwischen den Spezies unterschiedliche Aminosäuren befinden. Dies entspricht einer Aminosäureidentität der Genprodukte beider Spezies von 94,5%. Die Lage der sieben Transmembrandomänen und auch die Sequenz im Bereich putativer posttranslationaler Modifikationsstellen ist nahezu identisch. Als Hauptunterschied zwischen TM7SF1-L und Tm7sf1 fällt der unterschiedliche Translationsstart auf. Das erste ATG des menschlichen Gens ist in der Maus-cDNA nicht konserviert. Ein Vergleich der Kozaksequenz dieses Codons mit der beschriebenen Konsensussequenz (Kozak *et al.*, 1996) zeigt jedoch, dass dort vermutlich keine effektive Translationsinitiation stattfinden kann.

3.2.4.7 Generierung *TM7SF1-L* überexprimierender Zelllinien

Um für weitere Untersuchungen ein System zu generieren, das funktionelle Studien von *TM7SF1(-L)* ermöglicht, wurden Zelllinien etabliert, die *TM7SF1-L* stabil überexprimieren. Als Zelllinien wurden die humanen Tumorzelllinien 293 und WCCS1 verwendet. Das für die Transfektion der Zellen verwendete Expressionsplasmid beinhaltet die cDNA im Bereich des *TM7SF1-L* ORF, die in entsprechende Restriktionsendonuklease-Schnittstellen des eukaryontischen Expressionsvektors pcDNA3 (Fa. Clontech, Heidelberg) eingefügt wurde. Zu diesem Zweck wurde der für den ORF codierende cDNA-Bereich mittels RT-PCR mit den Oligonukleotiden TM7-For (nt 42-59 der *TM7SF1*-cDNA) und TM7-Rev2 (nt 1282-1262 der *TM7SF1*-cDNA) synthetisiert und über verschiedene Subklonierungsschritte in den pcDNA3-Expressionsvektor ligiert. Abbildung 3.28 zeigt schematisch das synthetisierte Expressionskonstrukt CMV-*TM7SF1L*, das eine starke Expression von *TM7SF1-L* unter der Kontrolle des viralen CMV-Promotors in eukaryontischen Zellen gewährleistet.

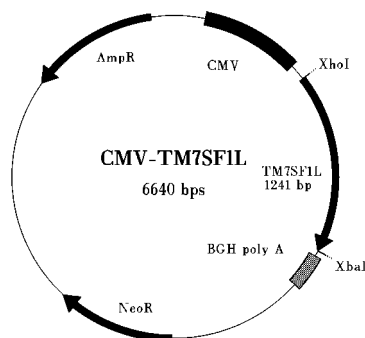


Abbildung 3.28: Das Expressionsplasmid CMV-*TM7SF1L*. Die Grafik zeigt die wichtigsten Charakteristika des Plasmids, das eine starke Expression von *TM7SF1* (Isoform L) in eukaryontischen Zellen gewährleistet. Nach Klonierung der *TM7SF1L*-cDNA im Plasmid pBlueskript wurde sie über die flankierenden Restriktionsendonukleasenschnittstellen *XhoI* und *XbaI* in das Plasmid pcDNA3 eingefügt. Es bedeuten: AmpR:= ORF β -Lactamase, NeoR:= ORF Aminoglykosid-Phosphotransferase, BGH poly A:= Nukleotidsequenz für Polyadenylierungssignal (aus β -Globingen), *TM7SF1L*:= Nukleotide im Bereich des ORF von *TM7SF1-L*, CMV:= CMV-Promotor.

Nach Transfektion, Selektion, Vereinzelung (im Falle der 293 Transfektanten wurden die Zellklone vereinigt und als sog. *pools* verwendet) und Expansion der stabil transfizierten Zellklone wurde die Expression der *TM7SF1-L* mRNA in *Northern blot*-Experimenten überprüft. Abbildung 3.29 zeigt das Ergebnis der Hybridisierung einer *TM7SF1*-spezifischen Sonde auf Gesamtzell-RNAs verschiedener transgener WCCS1-Klone und des *pools* transgener 293-Zellen. Die Überexpression der *TM7SF1-L* cDNA in den entsprechenden Zellklonen bzw. -*pools* ist deutlich zu erkennen.

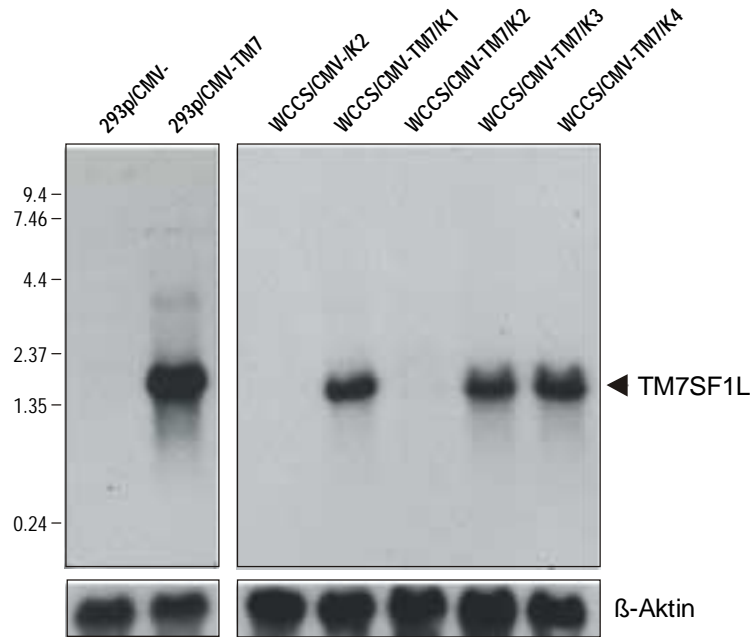


Abbildung 3.29: Hybridisierung einer *TM7SF1*-spezifischen Sonde auf Gesamtzell-RNA stabil transfizierter 293- und WCCS1-Zellen. Geblotet wurde RNA von Zellen, die nur mit dem leeren pcDNA3-Vektor (Spuren 1 und 3) oder mit CMV-*TM7SF1L* stabil transfiziert wurden (Spuren 2, 4-7). Bei den transgenen 293 Zellen handelt es sich um Zellpools, während die für die RNA-Präparation verwendeten transgenen WCCS1 Zellen auf Einzelkolonien zurückgehen. Das spezifische Hybridisierungssignal ist am rechten Bildrand markiert. Die Hybridisierung einer β -Aktin Sonde auf dem gleichen blot zeigt die Autoradiografie im unteren Bildteil.

3.2.4.8 Expression des extrazellulären NH_2 -Terminus von *TM7SF1* in *E. coli*

Zur Generierung spezifisch gegen *TM7SF1* gerichteter Antikörper wurde ein bakterielles Plasmid synthetisiert, das die Expression des wahrscheinlich extrazellulär lokalisierten Aminoterminus von *TM7SF1* (und zwar die Aminosäuren 6 bis 50) als Fusionsprotein mit der Glutathion-S-Transferase (GST) gewährleistet. Ein solches Konstrukt ermöglicht die spätere Aufreinigung des rekombinanten Proteins über die Affinität des GST-Anteils zu Glutathion. Zu diesem Zweck wurde das pGEX-4T-Plasmidsystem der Firma Pharmacia (Freiburg) verwendet, das verschiedene Ausgangsplasmide (pGEX-4T-1/-2/-3), die eine multiple Klonierungsstelle hinter der cDNA für den ORF von GST besitzen, beinhaltet. Nach der Wahl geeigneter *primer* (*gst-eco2*, *gst-sal*) mit Restriktionsendonuklease-schnittstellen für die Amplifikation und spätere Subklonierung in pGEX-4T-2 wurden Teile des Aminoterminus von *TM7SF1* in einer PCR amplifiziert (mit den Oligonukleotiden *gst-eco2* und *gst-sal* als *primer*) und das entstehende Produkt nach Restriktion in den entsprechend vorbereiteten pGEX-4T-2-Vektor ligiert. Ein positiver Klon wurde nach Überprüfung der Integratsequenz durch doppelsträngige Sequenzierung

für die weiteren Versuche verwendet. Abbildung 3.30 zeigt das Expressionskonstrukt GST-TM7.

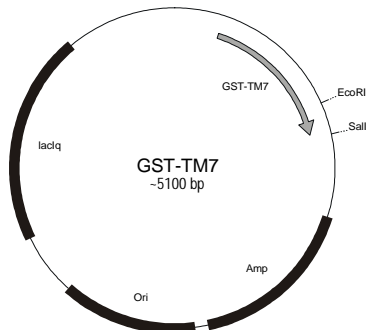


Abbildung 3.30: Das Expressionsplasmid GST-TM7. Die Grafik zeigt die wichtigsten Charakteristika des Plasmids, das eine IPTG-induzierbare Expression von GST-TM7 (Aminosäuren 6-50 von TM7SF1 als Fusionsprotein mit GST; grauer Pfeil) in Bakterien gewährleistet. Nach Amplifikation des entsprechenden Bereichs der *TM7SF1*-cDNA durch PCR (*primer* *gst-eco2/gst-sal*) wurde das Produkt über die flankierenden Restriktionsendonukleaseschnittstellen EcoRI und SalI in das Plasmid pGEX-4T-2 eingefügt (Einzelheiten s. Text).

Wie in Kapitel 2.12 beschrieben wurde anschließend das rekombinante GST-TM7SF1-Fusionsprotein in *E. coli* exprimiert und über eine Glutathionagarosesäule aufgereinigt. Der Test auf tatsächlich vorliegendes GST-TM7SF1-Fusionsprotein erfolgte anschließend durch SDS-PAGE (Daten nicht gezeigt). Das rekombinante Protein wurde nach Dialyse gefriergetrocknet und es wurden ca. 0,7 mg für die Immunisierung zweier Kaninchen durch die Firma Eurogentech (Belgien) verwendet. Dabei sollte, da es sich beim TM7SF1-Anteil des Fusionsproteins nur um 45 Aminosäuren handelt die evtl. nicht immunogen sind, das gesamte Fusionsprotein zur Immunisierung verwendet werden. Das entstehende Antiserum musste dadurch allerdings im Rahmen von *Western blots* auf Antikörper getestet werden, die auch spezifisch nur den TM7SF1-Anteil des Fusionsproteins binden.

3.2.4.9 Test zweier Kaninchenserum auf α TM7SF1-Antikörper

Der Test der Antiseren auf TM7SF1-spezifische Antikörper wurde mit Hilfe von *Western blots* und anschließender Immunfärbung durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde rekombinantes Fusionsprotein und mit Thrombin verdautes Fusionsprotein über SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembranen übertragen. Der Nachweis der Proteine erfolgte im Anschluß durch Inkubation der Membranen mit unterschiedlichen Konzentrationen der verschiedenen polyklonalen Antiseren (bzw. mit den jeweiligen Präimmunsereen in den Negativkontrollen; Daten nicht abgebildet). Abbildung 3.31 zeigt die Ergebnisse dieser Experimente. Dort ist deutlich zu erkennen, dass das Antiserum 5539 (PAS5539) sowohl das Fusionsprotein GST-TM7, als auch den durch Thrombinverdau abgetrennten TM7SF1-Anteil allein bindet (linker Bildteil; analoges gilt für das Antiserum 5538 [Daten nicht abgebildet]). In rechten Teil der Abbildung ist das Ergebnis eines Immunoblots, bei dem affinitätsaufgereinigtes Antiserum 5539 (agPAS5539) für die

Detektion der rekombinanten Proteine verwendet wurde, abgebildet. Die Reduktion der Hintergrundbanden im Vergleich zum nativen Antiserum ist deutlich auszumachen. Allerdings muss angemerkt werden, dass die Affinitätsaufreinigung des Antiserums mit einer deutlichen Titerreduktion verbunden war (der in der Abbildung links gezeigte *blot* entstand bei einer Verwendung des Antiserums in einer Verdünnung von 1:1000, während für die in der Abbildung rechts gezeigten *blots* das affinitätsaufgereinigte Antiserum in Verdünnungen von 1:200 bzw. 1:50 verwendet wurde).

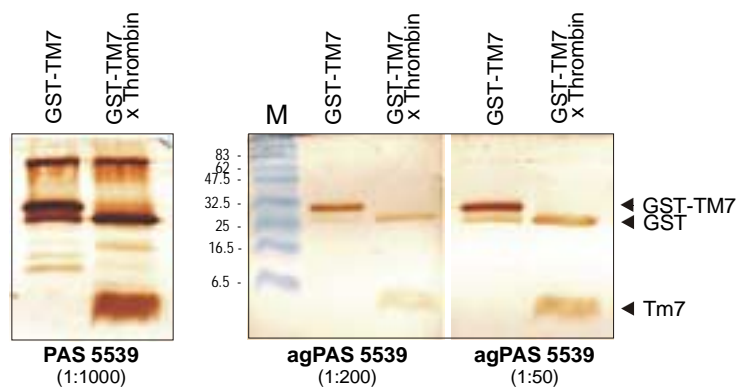


Abbildung 3.31: Immunoblots mit Antiserum 5539. Detektion von GST-TM7- und mit Thrombin verdaulichem GST-TM7-Fusionsprotein mit nativem (PAS; links) bzw. affinitätsgereinigtem (agPAS; rechts) Antiserum 5539. Die eingesetzte Verdünnung des Antiserums ist unter den jeweiligen Bildausschnitten angegeben. Bei Verwendung des Präimmunserums wurden keine spezifischen Proteinbanden detektiert (Daten nicht abgebildet). Die Pfeilspitzen am rechten Rand markieren die Position des Fusionsproteins (GST-TM7; Molekulargewicht ~32 kDa), der Glutathion-S-Transferase (GST; Molekulargewicht 26 kDa) bzw. des durch Thrombinverdau freigesetzten Aminoterminus von TM7SF1 (TM7; Molekulargewicht ~6,3 kDa) auf der Membran. Die Markerspur ist mit M bezeichnet. Die Molekulargewichte (in kDa) der verschiedenen Markerproteine sind angegeben.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Immunisierung beider Kaninchen erfolgreich in der Generierung polyklonaler Antiseren mit gegen den Aminoterminus von TM7SF1 gerichteten Antikörpern resultierte. Diese Antiseren stehen für weitere Analysen (vgl. Diskussion in Kap. 4.3.2) zur Verfügung.

3.2.5 Das Gen *TCF2* (*HNF1 β* , *vHNF1*, *LFB3*)

Im Rahmen der *differential display*-Experimente konnte unter Verwendung der Primerkombination T11A und 10-7 ein cDNA-Fragment isoliert werden, das durch seine verminderte Expression in Wilmstumorgewebe auffiel. Die Reamplifikation, Klonierung und Sequenzierung ergaben ein cDNA-Fragment von 270 bp Länge, das identisch mit Teilen der cDNA-Sequenz des Gens *TCF2* ist (Zugangsnummer in der Gendatenbank: NM_000458). Für die im folgenden Abschnitt beschriebenen Untersuchungen zur

Expression von *TCF2* wurden aus dem 3'-UTR *primer* abgeleitet, die im Rahmen semiquantitativer RT-PCR-Experimente bzw. *Northern blot*-Experimente eingesetzt wurden. Ferner wurde die *TCF2*-Expression in embryonalen Nierenzellen mit induzierbarer *WT1*-Expression untersucht (vgl. Kap. 3.2.5.2). durchgeführt. Neben der Untersuchung der Expression des TCF2-Proteins in Nierengewebe (vgl. Kap. 3.2.5.3) wurden im Rahmen der Betreuung der Dissertation von cand. med. S. Kos Mutationsanalysen auf DNA von Patienten mit familiärem Wilmstumor durchgeführt. Aufgrund der genomischen Lokalisation von *TCF2* (17cen-q21.3), die mit dem Intervall des familiären Wilmstomers (FWT1)-Lokus überlappt (17q12-q21; Rahman *et al.*, 1996), schien eine solche Mutationsanalyse vielversprechend.

3.2.5.1 Expression von TCF2 in verschiedenen Geweben

Die Expression von *TCF2* in verschiedenen WT- und Normalnierengeweben wurde durch semiquantitative RT-PCR-Experimente (sqRT-PCR) und durch *Northern blot*-Experimente bestimmt. Zu diesem Zweck wurden die Oligonukleotide vHNF-L und vHNF-R aus dem 3'-UTR von *TCF2* als *primer* in der sqRT-PCR bzw. das entstehende Produkt als Sonde in *Northern*-Hybridisierungen verwendet. Abbildung 3.32 zeigt das Ergebnis einer sqRT-PCR auf revers transkribierter RNA, die aus adultem Nierengewebe, fetalem Nierengewebe bzw. aus verschiedenen WT-Geweben isoliert wurde.

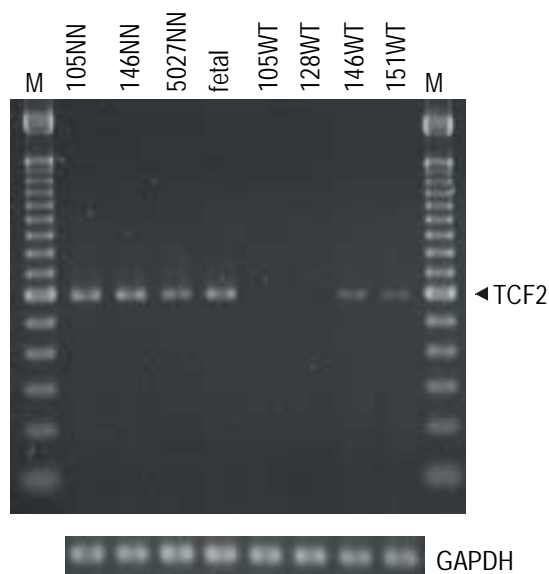


Abbildung 3.32: Vergleich der *TCF2*-Expression verschiedener Normalnieren- und WT-Gewebe. Gelelektrophoretische Auftrennung der sq RT-PCR-Produkte mit dem Oligonukleotidpaar vHNF-L/-R als *primer* (Probenentnahme nach 21 PCR-Zyklen). Die verminderte Expression von *TCF2* in den Tumorgeweben (105WT, 128WT, 146WT, 151WT) im Vergleich zu den adulten (105NN, 146NN, 5027NN) bzw. fetalen Nierengeweben (fetal) wird deutlich. Das *TCF2*-spezifische Produkt ist mit einer Pfeilspitze am rechten Bildrand markiert. Der untere Bildausschnitt zeigt das spezifische *GAPDH*-Produkt, das in sqRT-PCR-Reaktionen vergleichbaren cDNA-Proben volumina derselben RT-Reaktionen als Matrize entstand (Probenentnahme nach 20 PCR-Zyklen). Dieses Experiment soll verdeutlichen, dass für die Experimente gleiche RNA-Mengen als Ausgangsmaterial eingesetzt wurden.

Eine größere Anzahl von Tumorgeweben wurde mit Hilfe von *Northern*-Experimenten hinsichtlich der Expressionsstärke von *TCF2* untersucht. Dies geschah in Zusammenarbeit mit Dipl. Biologin G. Klemm, die die Hybridisierungsexperimente auf einem von ihr hergestellten Wilmstumor RNA-*array* durchführte. Als Sonde diente dabei das im modifizierten Plasmidvektor pBlueskript (T-Vektor) subklonierte RT-PCR-Produkt der *primer* vHNF-L/-R. Die Auswertung der Hybridisierung auf einem *Phosphoimager* (Modell Storm 840; Fa. Molecular Dynamics, Krefeld) wurde dazu verwendet, um die *TCF2*-Expressionsstärken in den untersuchten Geweben miteinander zu vergleichen. Derselbe *blot* wurde anschließend mit einer 28SrRNA-spezifischen Sonde hybridisiert, um Unterschiede in der aufgetragenen RNA-Menge in den verschiedenen Positionen des blots zu detektieren und innerhalb der Quantifizierungen zu berücksichtigen (Normalisierung). Die Abbildung 3.33 zeigt die Autoradiogramme der Hybridisierungsexperimente und die grafische Darstellung der relativen Expressionsstärke von *TCF2* in den einzelnen Geweben.

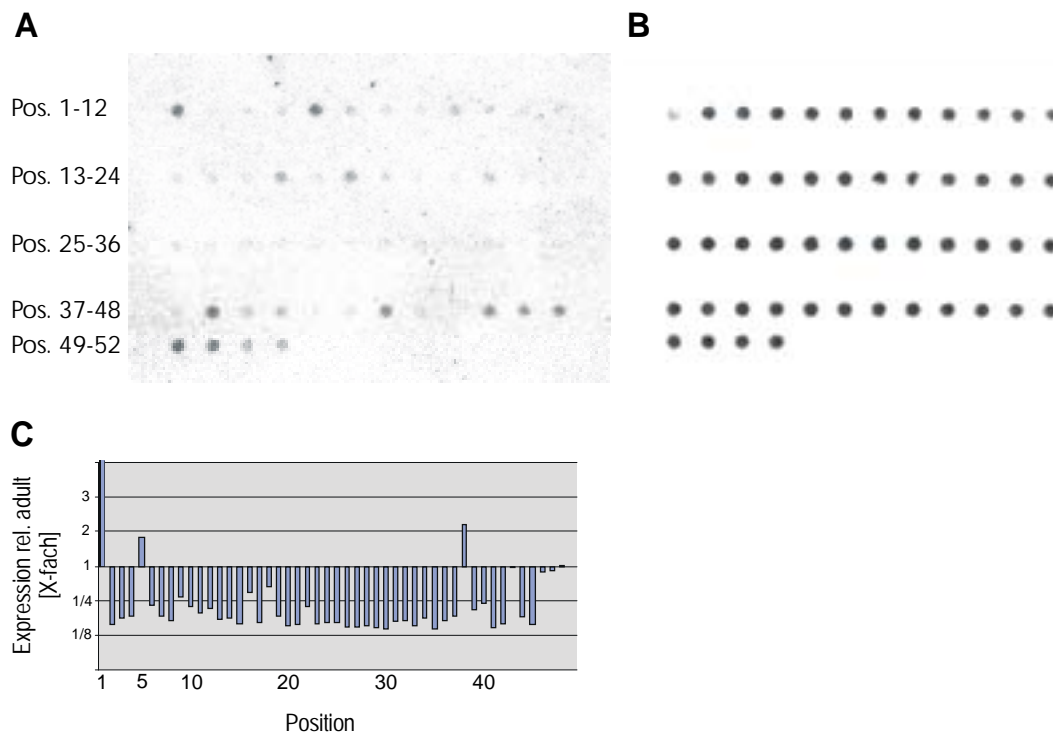


Abbildung 3.33: Quantifizierung der *TCF2*-Expression durch *Northern* Hybridisierung eines RNA-Arrays. In den Positionen 1-47 wurden 2 µg RNA verschiedener Wilmstumorgewebe aufgebracht. In Position 48 befinden sich 2 µg RNA fetaler, in den Positionen 49-52 jeweils 2 µg RNA adulter Niere. (A) Autoradiogramm der Hybridisierung mit dem radioaktiv markierten vHNF-L/-R-Produkt. (B) Autoradiogramm der Hybridisierung desselben blots mit einer radioaktiv markierten 28SrRNA-Sonde. (C) Grafische Darstellung der relativen Expressionsstärke von *TCF2* in den verschiedenen Geweben (nach Normalisierung auf vergleichbare RNA-Menge in den Positionen durch Auswertung der 28SrRNA-Signalstärken). Eine Expressionsstärke von 0 entspricht dabei der gemittelten Expressionsstärke von *TCF2* in adultem Nierengewebe. Die verminderte Expression von *TCF2* in der überwiegenden Mehrzahl der untersuchten Wilmstumorgewebe (43 von 47 [ca. 91,5 %]) wird deutlich.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die verschiedenen zur Quantifizierung der *TCF2*-Expression durchgeführten Ergebnisse den initialen Befund des *differential display* (keine detektierbare bis sehr schwache Expression in Tumorgewebe) bestätigen.

3.2.5.2 Untersuchungen zur *TCF2*-Expression in einer Zelllinie mit induzierbarer *WT1*-Expression

Die signifikant verminderte Expression eines Gens in einer großen Zahl verschiedener Wilmstumorgewebe ist ein interessanter Befund. Eine direkte Verknüpfung von Wilmstumorgene und dem Gen *TCF2* wurde erreicht, indem die mRNA-Expression in Zellen mit induzierbarer *WT1*-Expression getestet wurde. Dabei handelt es sich um Zelllinien, die von Prof. Dr. Jerry Pelletier (McGill Cancer Center, Montreal, Kanada)

hergestellt und freundlicherweise für Genexpressionsanalysen zur Verfügung gestellt wurden. Diese Zellen sind stabil mit Expressionskonstrukten für den tetrazyklinabhängigen Transaktivator (tTA) und eine Spleißform des murinen *Wt1*-Gens (-Exon5/-KTS [vgl. Kap. 1.3]; Bezeichnung 293tetWT1) bzw. mit einem leeren Expressionsvektor (Bezeichnung 293tetCTL) transfiziert (eine genaue Beschreibung der verwendeten Zellen findet sich in Kim *et al.*, 1999). Durch gezielte Zugabe bzw. Entzug von Doxizylin (Dox; ein Tetrazyklinderivat) zum Kulturmedium der Zellen besteht somit die Möglichkeit, die Expression des *WT1*-Transgens in den Zellen exogen zu steuern (+Dox: transgenische *WT1*-Expression aus; -Dox: transgenische *WT1*-Expression an).

Mit Hilfe dieses Systems wurde der Einfluß der *WT1*-Expression auf die *TCF2*-Expression untersucht. Zu diesem Zweck wurde RNA aus 293tetCTL- und 293tetWT1-Zellen, die in Abwesenheit von Dox bzw. bei einer Konzentration von 3 µg/ml Dox im Kulturmedium kultiviert worden waren in *Northern blot*-Experimenten auf die induzierbare Expression der transgenischen *WT1* mRNA untersucht. Abbildung 3.34 zeigt das Autoradiogramm der Hybridisierung der entsprechenden RNAs mit einer *WT1*-spezifischen Sonde. Die starke Induktion des transgenischen *WT1* (t-*WT1*) in den 293tetWT1-Zellen, die ohne Doxizylin kultiviert wurden, ist deutlich zu erkennen.

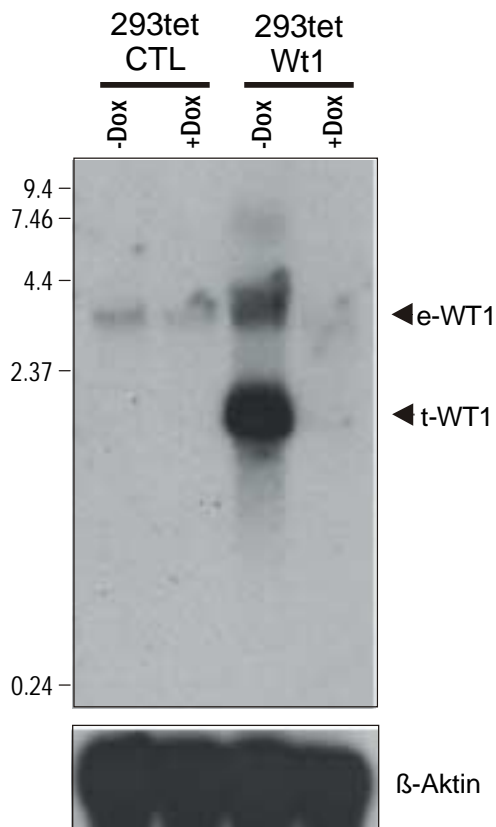


Abbildung 3.34: Kontrolle der *WT1*-Expression in 293tetCTL- bzw. 293tetWT1-Zellen. Autoradiogramm der Hybridisierung von 20µg Gesamtzell-RNA (isoliert aus den über den Spuren angegebenen Zellen) mit einer *WT1*-spezifischen Sonde. Die Positionen der Banden für endogenes *WT1*-Transkript (e-*WT1*) bzw. transgenisches *WT1*-Transkript (t-*WT1*) sind am rechten Rand der Autoradiografie angegeben. Dem Nachweis, dass vergleichbare RNA-Mengen in den Spuren aufgetragen wurden diente die Hybridisierung desselben *blots* mit einer β-Aktin-spezifischen Sonde (unten).

Nachdem die induzierbare *WT1*-Expression nachgewiesen worden war, wurde untersucht, inwieweit die Expression *TCF2*-spezifischer Transkripte mit der An- oder Abwesenheit von *WT1* korreliert. Zu diesem Zweck wurden sqRT-PCR-Experimente auf Erststrangsynthesen der verschiedenen 293tet-RNAs durchgeführt. Als *primer* für die PCR dienten dabei die Oligonukleotide vHNF-Ex3 und vHNF-R1, die in Exon3 bzw. Exon2 der *TCF2*-cDNA lokalisiert sind und auf genomischer DNA kein Produkt amplifizieren. Die Abbildung 3.35A zeigt das Ergebnis einer solchen Untersuchung. Deutlich ist auf dem Gelfoto zu erkennen, dass bei Anwesenheit von transgenisch exprimiertem *WT1* (293tetWT1/-Dox) kein *TCF2*-spezifisches cDNA-Produkt amplifiziert werden konnte. Auch konnte reproduzierbar eine schwächere *TCF2*-Expression in den Zellen mit ausgeschalteter Expression des *WT1*-Transgens (293tetWT1/+Dox) beobachtet werden. Sie korreliert mit der offensichtlich auch bei Anwesenheit von Dox im Kulturmedium auftretenden schwachen Expression des *WT1*-Transgens (vgl. Abb. 3.35B).

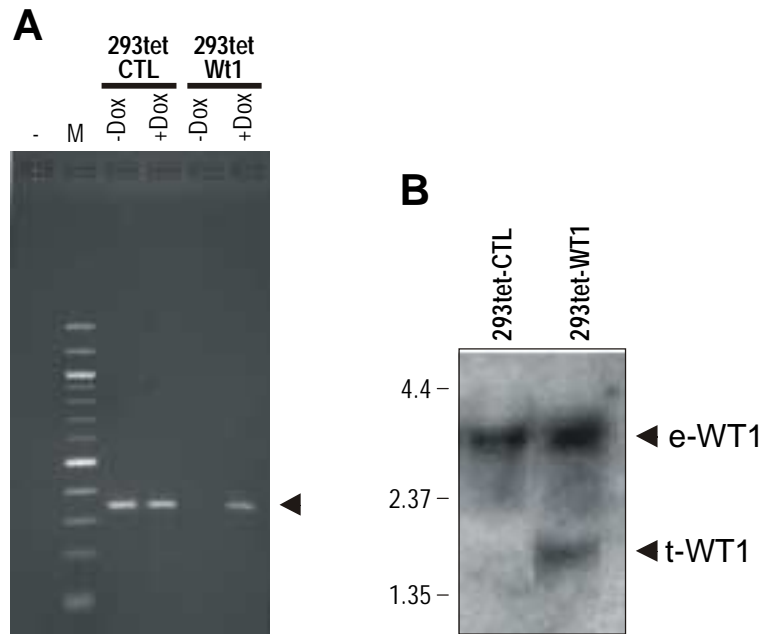


Abbildung 3.35: Abhängigkeit der *TCF2*-Transkription von *WT1*. In **A** ist die gelelektrophoretische Auftrennung der sqRT-PCR-Produkte mit den *primern* vHNF-Ex3 und vHNF-R1. Als Matrize für die PCR (45 Zyklen) dienten dabei RTs der über den Spuren angegebenen RNAs. Deutlich zu erkennen ist die Abwesenheit von *TCF2*-Transkripten in der Zelllinie mit induzierter *WT1*-Expression (kein Produkt in der Spur 3 [293tetWT1/-Dox]). Als Größenmarker (Spur M) wurde 100bp-Leiter verwendet. Die β -Aktin spezifische RT-PCR auf gleichen Mengen cDNA lieferte Produkte in allen Ansätzen (Daten nicht abgebildet). Die Kontrollen auf genomische DNA-Kontamination der RNA-Präparationen zeigten keine Produkte (Daten nicht abgebildet). Das in **B** dargestellte Autoradiogramm liefert den Nachweis, dass das transgenische *WT1* (*t-WT1*) auch bei Anwesenheit von Dox im Kulturmedium (schwach) exprimiert wird. Das Autoradiogramm zeigt das Ergebnis einer Hybridisierung von 15µg Gesamtzell-RNA (isoliert aus den über den Spuren angegebenen Zellen, die in Gegenwart von Dox kultiviert wurden) mit einer *WT1*-spezifischen Sonde. Die Positionen der Banden für endogenes *WT1*-Transkript (*e-WT1*) bzw. transgenisches *WT1*-Transkript (*t-WT1*) sind am rechten Rand der Autoradiografie angegeben. Trotz Dox-Anwesenheit im Kulturmedium sind vom Transgen exprimierte *WT1*-Transkripte in der Spur 293tetWT1 nachzuweisen. Dies liefert möglicherweise den Grund für die reproduzierbar schwächere *TCF2*-Expression in den 293tetWT1/+Dox-Ansätzen (Spur 4 in A) im Vergleich zur Kontrollzelllinie (Spur 2 in A).

Diese Ergebnisse sprechen für eine Rolle von *WT1* als Repressor der *TCF2*-Expression, womit *TCF2* direkt oder indirekt im Signaltransduktionsweg des einzigen bisher beschriebenen Wilmstumorgens – *WT1* – einzuordnen wäre. Die Diskussion über eine mögliche Rolle von *TCF2* in der Wilmstumorgengese unter Berücksichtigung der hier beschriebenen Ergebnisse findet sich in Kapitel 4.3.3.

3.2.5.3 Analyse der zelltypspezifischen Expression des *TCF2*-Proteins

Das Auftreten *TCF2*-spezifischer Transkripte im Zuge der Mausentwicklung wurde von Lazzaro und Mitarbeitern bereits untersucht (Lazzaro *et al.*, 1992). Um Aussagen über die

Expression des TCF2-Proteins in der menschlichen Niere machen zu können, wurden immunhistochemische Experimente mit TCF2-spezifischen Antikörpern durchgeführt. Sie sollten zeigen, inwieweit eine Expression des Proteins in der sich differenzierenden menschlichen Niere ebenfalls auf die epithelialen Strukturen beschränkt ist. Da der Mesenchym-Epithel-Übergang der Zellen des metanephrogenen Gewebes einen entscheidenden Schritt bei der Nierenentwicklung und vermutlich auch bei der Wilmstumorgenese darstellt (vgl. Kap. 1.2), wurde fetales Nierengewebe der 22. Schwangerschaftswoche untersucht. Auf Gewebeschnitten dieses Entwicklungsstadiums sind die charakteristischen Strukturen der Niere, wie z.B. Glomerulus und Bowman'sche Kapsel, Nierentubuli und Sammelrohre, erkennbar. Das Ergebnis eines solchen immunhistochemischen Experiments zeigt Abbildung 3.36. Die vorherrschende Expression des TCF2-Proteins in den Epithelzellen der Nierentubuli und auch der Sammelrohre ist auf ihr zu erkennen.

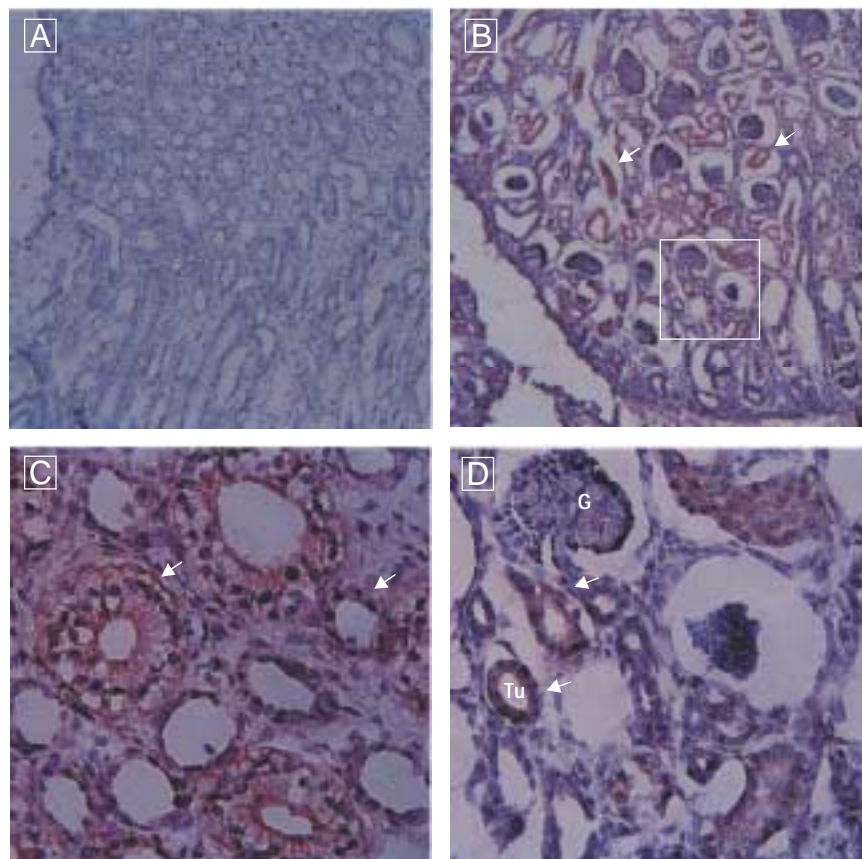


Abbildung 3.36: Immunhistochemischer Nachweis der TCF2-Expression auf Gewebeschnitten humaner Niere (22. SSW). Signale erscheinen in brauner Farbe auf den mit HE gegengefärbten Präparaten. In A ist die Negativkontrolle der immunhistochemischen Färbung gezeigt (Weglassen des TCF2-spezifischen Erstantikörpers bei ansonsten gleicher Vorgehensweise, die zu den Abb. B-C führte). B zeigt die TCF2-spezifischen Signale (z.T. mit Pfeilen markiert) in den Epithelzellen der Nierentubuli im Nierencortex (200fache Vergrößerung). In C sind die spezifischen Signale in den Epithelzellen der angeschnittenen Sammelrohre bzw. Tubulusabschnitte im Nierenmark (Pfeile) deutlich zu erkennen (Vergrößerung 400fach). In D ist der in B markierte Ausschnitt des Nierencortex bei 400facher Vergrößerung dargestellt. Pfeile markieren TCF2-positive Epithelzellen querschnittener Nierentubuli (Tu). TCF2-positive Tubuli im Längsschnitt sind im rechten oberen und rechten unteren Teil von D zu erkennen. G:= Glomerulus.

3.2.5.4 Generierung einer Wilmstumorzelllinie mit stabiler TCF2-Überexpression

Um für weitere Untersuchungen ein System zu erzeugen, das funktionelle Studien von TCF2 ermöglicht, wurden Zelllinien etabliert, die *TCF2* stabil überexprimieren. Bei der Parentalzelllinie handelt es sich um die humane Wilmstumorzelllinie WCCS1, in der endogen keine *TCF2*-Expression nachgewiesen werden kann (Daten nicht gezeigt). Das für die Transfektion der Zellen verwendete Konstrukt wurde durch verschiedene Klonierungsschritte wie in Kapitel 2.3 beschrieben synthetisiert. Es handelt sich dabei um die cDNA des *TCF2*-ORF (Spleißvariante A; vgl. hierzu Abb. 4.8 in Kap. 4.3.3), die, nach Synthese mittels RT-PCR (*primer*: vHNF-Eco und vHNF-Xba), in den eukaryontischen Expressionsvektor pcDNA3 (Fa. Clontech, Heidelberg) eingefügt wurde. Bei der Generierung dieses Expressionskonstruktes wurde dabei vergleichbar der Synthese des TM7SF1-Expressionsplasmids vorgegangen. Abbildung 3.37 zeigt schematisch den Aufbau des Expressionskonstruktes CMV-TCF2A, das für die stabile Transfektion von WCCS1-Zellen verwendet wurde.

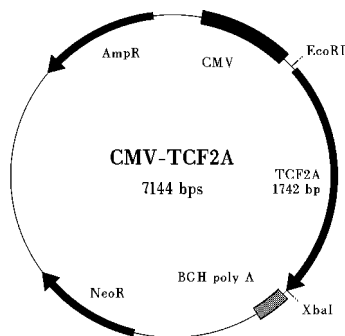


Abbildung 3.37: Das Expressionsplasmid CMV-TCF2A. Die Grafik zeigt die wichtigsten Charakteristika des Plasmids, das eine starke Expression von TCF2 (Isoform A) in eukaryontischen Zellen gewährleistet. Nach PCR-Amplifikation der *TCF2A*-cDNA mit den Oligonukleotiden vHNF-Eco und vHNF-Xba wurde sie über die flankierenden Restriktionsendonukleaseschnittstellen EcoRI und XbaI in das Plasmid pcDNA3 eingefügt. Es bedeuten: AmpR:= ORF β -Lactamase, NeoR:= ORF Aminoglykosid-Phosphotransferase, BCH poly A:= Nukleotidsequenz für Polyadenylierungssignal (aus β -Globinen), TCF2A:= Nukleotide im Bereich des ORF von TCF2A, CMV:= CMV-Promotor.

Neomycinresistente Einzelklone wurden nach Expansion mittels RT-PCR und *Northern blot* (nicht abgebildet) auf die Expression von *TCF2*-Transkripten überprüft. In Abbildung 3.38 ist das Ergebnis der RT-PCR auf RNAs, die aus verschiedenen antibiotikumresistenten Zelllinien isoliert wurden, dargestellt. Die Expression spezifischer Transkripte in den CMV-TCF2A-transfizierten Zelllinien wird durch die spezifischen PCR-Produkte nachgewiesen. Hingegen lässt sich in der mit leerem pcDNA3-Vektor transfizierten WCCS1-Zelllinie keine *TCF2*-Expression nachweisen.

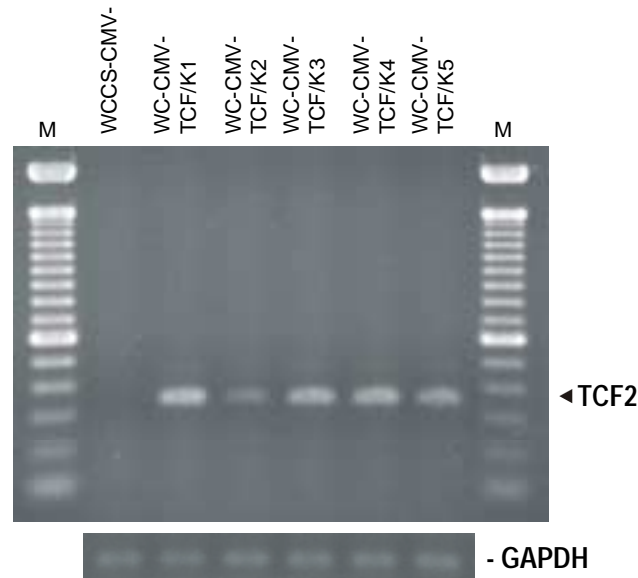


Abbildung 3.38: Test der stabil transfizierten WCCS1-Zellklone auf *TCF2*-Expression. Die gelelektrophoretische Auftrennung der RT-PCR-Produkte mit den *primern* vHNF-Ex3 und vHNF-Ex4 liefert Produkte in allen getesteten Zelllinien, die mit dem CMV-*TCF2A*-Expressionskonstrukt transfiziert wurden (aufgetragen in den mit WC-CMV-*TCF2/K1*–*K5* bezeichneten Spuren). Die aus Transfektion mit leerem pcDNA3-Vektor resultierende Zelllinie (WCCS-CMV-) zeigt (analog der Parentalzelllinie WCCS1 [Daten nicht abgebildet]) keine *TCF2*-Expression. Die Position des *TCF2*-spezifischen RT-PCR-Produktes ist am rechten Rand des Gelfotos markiert. In den parallel durchgeführten Negativkontrollen der RT-Reaktionen (Test auf verunreinigende genomische DNA) waren keine Produkte zu beobachten (Daten nicht gezeigt). Der Nachweis auf gleiche Mengen vorliegender cDNA in allen Reaktionsansätzen wurde durch eine GAPDH-spezifische RT-PCR-Reaktion gezeigt, die unten abgebildet ist (Probenentnahme nach 15 Amplifikationsrunden). Als Größenmarker (mit M markierte Spuren) wurde 100bp-Leiter verwendet.

3.2.5.5 Mutationsanalyse des proteincodierenden Bereichs von *TCF2*

Aufgrund der genomischen Lokalisation von *TCF2* (17cen-q21.3) in einem chromosomalen Bereich, der mit einer familiären Form des WT in Verbindung gebracht wird (FWT1-Lokus in 17q12-q21; Rahman *et al.*, 1996), wurde eine Mutationsanalyse des codierenden Bereichs von *TCF2* in FWT1-Patienten durchgeführt. Sie erfolgte im Rahmen der Betreuung der Doktorarbeit von cand. med. Sebastian Kos.

Die Exon-Intron-Struktur des *TCF2*-Gens wurde durch Sequenzüberlappung der in der Gendatenbank abgelegten Nukleotidsequenz für *TCF2* (Zugangsnummer X58840) und für den DNA aus Chromosom 17 enthaltenden PAC-Klon hPRC.986_F_12 (Zugangsnummer AC004132) *in silico* ermittelt. Um solche Exons, die proteincodierende Bereiche von *TCF2* aufweisen (Exons 1-9) zu amplifizieren und anschließend zu sequenzieren, wurden Oligonukleotide aus exonflankierenden Intronbereichen abgeleitet (vgl. *TCF2*-Sequenzierungsprimer in Kap. 2.15.8). Sie wurden in PCR-Reaktionen auf DNA von zwei FWT1-Patienten und zwei nicht betroffenen Familienmitgliedern verwendet und anschließend in doppelsträngigen Sequenzierungen der jeweiligen Produkte eingesetzt (alle

DNAs wurden von Dr. Jerry Pelletier, McGill Cancer Center, Kanada, zur Verfügung gestellt).

Die Sequenzierung ergab keine Abweichungen von der publizierten Nukleotidsequenz im codierenden Bereich von *TCF2* (Daten nicht gezeigt). Die einzige beobachtete Auffälligkeit war bei zwei der DNA-Proben das reproduzierbare Fehlen des Amplifikationsproduktes bei Verwendung der *primer* TCF2Ex8-F/-R. Aus diesem Grund wurden neue *primer* in größerer Entfernung der Exon-Intron-Grenzen von Exon 8 generiert (TCF2Ex8N-F/-R), die PCR für alle DNA-Proben wiederholt und die entstehenden Produkte wurden ebenfalls doppelsträngig sequenziert. Die Sequenzierung ergab eine homozygot auftretende T→G Transversion (verglichen mit der Nukleotidsequenz des Datenbankeintrages für hPRC.986_F_12; s.o.) an Nukleotidposition -46, d. h. 46 Nukleotide stromaufwärts des Beginns von Exon 8 (Daten nicht gezeigt). Sie liegt damit im Bereich der Bindungsstelle des zunächst für die Amplifikation von Exon 8 verwendeten 5'-*primers* und ist damit verantwortlich für die fehlende Amplifikation entsprechender DNA-Produkte in den DNA-Proben mit Transversion.

Bei dieser Nukleotidposition handelt es sich um eine Stelle, die in der Nähe des für den Spleißvorgang wichtigen „Verzweigungs-Adeninnukleotids“ (*branch site*; hier vermutlich Position -26) gelegen ist. Für andere Gene, so z. B. für *FBN1* und *FBN2* (Fibrillin-1 bzw. -2) konnte gezeigt werden, dass bestimmte Mutationen in der Nähe einer Spleiß-Verzweigungsstelle zu Krankheiten, wie dem Marfan-Syndrom (*FBN1*) bzw. der kongenitalen kontraktuellen Arachnodaktylie (*FBN2*) führen (Maslen *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1997). Daher wurden 60 DNA-Proben nicht betroffener Personen mit den beiden Oligonukleotidpaaren bezüglich des Auftretens der oben beschriebenen Transversion in Intron 7 von *TCF2* analysiert. Zu diesem Zweck wurde zunächst das Primerpaar TCF2Ex8-F/-R für die Amplifikation verwendet. Hier zeigten sich spezifische DNA-Produkte bei 32% (19 von 60) der untersuchten DNAs (Daten nicht gezeigt). Anschließend wurden vier zufällig ausgewählte DNA-Proben, bei denen keine Amplifikationsprodukte in der ersten PCR entstanden waren, einer PCR mit den Oligonukleotiden TCF2Ex8N-F/-R unterzogen. Hier konnten entsprechende Amplifikationsprodukte in allen Proben beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Diese Produkte wurden doppelsträngig sequenziert und wiesen alle die oben beschriebene T→G Transversion in Nukleotidposition -46 (relativ zum Start von Exon 8) auf (Daten nicht gezeigt).

Die Ergebnisse legen nahe, dass es sich bei der in zwei der analysierten DNA-Proben identifizierten Transversion nicht um eine funktionelle Mutation handelt, die den Spleißvorgang beeinflusst. Vielmehr wurde wahrscheinlich ein Polymorphismus identifiziert.

3.2.6 Das Gen *CDT151*

Im Rahmen der *differential display*-Experimente konnte unter Verwendung der Primerkombination T11A und 10-6 ein cDNA-Fragment isoliert werden (*151WT6A1*), das durch seine verstärkte Expression im Wilmstumor 151 (151WT) auffiel. Die Verifikation der differentiellen Expression, eine initiale Charakterisierung des cDNA-Fragmentes, sowie die Erweiterung der bekannten Sequenzinformation durch Untersuchen einer cDNA-Bank aus adulter Nieren-RNA wurde im Rahmen der Betreuung der Diplomarbeit von Jutta Trübenbach (Trübenbach, 1998) durchgeführt. Aufgrund seiner verstärkten Expression in WT151 wurde das zugrundeliegende Gen vorläufig mit *CDT151* bezeichnet. Die Ermittlung der Transkriptgröße von *CDT151* ergab eine Länge von ca. 6,5 kbp. Starke Signale waren dabei in RNAs der Gewebe Herz und Skelettmuskel, schwächere Signale in RNAs der Gewebe Niere und Pankreas zu finden. Sehr schwache Signale zeigten RNAs aus Gehirn, Plazenta, Lunge und Leber. Die zytogenetische Bestimmung der chromosomalen Lokalisation von *CDT151* mittels FISH ergab eine Position in 1p31-32 (vgl. zum gesamten Abschnitt: Trübenbach, 1998 und Zabel *et al.*, 1998).

3.2.6.1 Die *CDT151* cDNA

Durch die Arbeiten von Jutta Trübenbach konnte die Sequenzinformation des zunächst im *differential display* isolierten cDNA-Fragments auf eine Länge von 2895 bp erweitert werden. Abbildung 3.39 zeigt schematisch die zu diesem Zeitpunkt bestätigte cDNA für *CDT151* mit den verschiedenen Strukturmerkmalen. Die Lage des *differential display*-Fragmentes und die Position verschiedener im Rahmen von RT-PCR-Experimenten verwendeter *primer* sind in der Abbildung angedeutet.

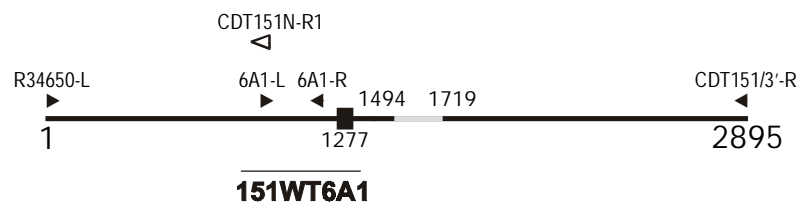


Abbildung 3.39: Schematische Darstellung der *CDT151*-cDNA (vor Sequenzerweiterung). Die im Rahmen der Diplomarbeit von J. Trübenbach ermittelte Sequenzinformation von *CDT151* ist als fette horizontale Linie dargestellt. Die Position des initial isolierten *differential display*-Fragmentes (*151WT6A1*), die Lage eines putativ alternativ gespleißten Exons (grau), sowie die Position einer polymorphen TG-Sequenzwiederholung (schwarzes Viereck) sind angedeutet. Die Lage und Orientierung von *primern*, die für die Generierung überlappender cDNA-Klone im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, sind als schwarze Dreiecke eingezeichnet. Die offene Pfeilspitze markiert das Oligonukleotid, mit dem die Klonierung des äußersten 5'-Endes der cDNA im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurde (*CDT151N-R1*).

Da die von Frau Trübenbach ermittelte Sequenzinformation von *CDT151* deutlich kürzer als die im *Northern blot* angezeigte Transkriptgröße war, wurde die cDNA im Rahmen der vorliegenden Dissertation erweitert. Dies geschah auch in der Hoffnung, in der noch fehlenden Sequenz einen ORF zu identifizieren, der dann anhand von Strukturanalysen weiter charakterisiert werden sollte. Zu diesem Zweck wurden Datenbankanalysen mit der Nukleotidsequenz der bekannten *CDT151*-cDNA durchgeführt. Sie ergaben signifikante Homologien zu Einträgen überlappender EST- und cDNA-Klone der entsprechenden Datenbanken. Die Sequenzen wurden *in silico* zu einem *contig* zusammengetragen, und aus der Konsensussequenz wurden *primer* für eine Verifikation der ermittelten Sequenz durch RT-PCR-Experimente (Daten nicht abgebildet) abgeleitet. Da es sich bei der Verlängerung der bekannten Sequenz um ca. 3,5 kbp handelte, wurde ein EST-Klon (IMAGE: 2244581; Zugangsnummer AI656832; im folgenden als EST65 bezeichnet), der das putative 5'-Ende der cDNA enthält, beim RZPD in Berlin bestellt und doppelsträngig sequenziert. Abbildung 3.40 zeigt schematisch die zur Verifikation klonierten RT-PCR-Produkte, sowie den cDNA-Klon EST65 im Bereich des äußersten 5'-Bereichs von *CDT151*.

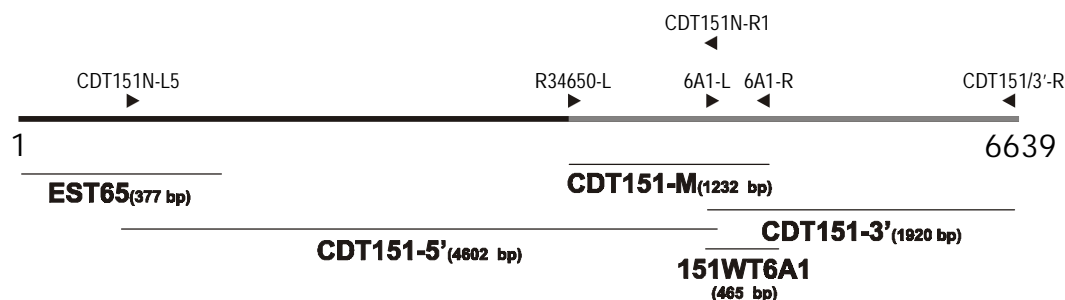


Abbildung 3.40: Schematische Darstellung der cDNA-Klonierungsstrategie von *CDT151*. Die horizontale fettgedruckte Linie symbolisiert die *CDT151*-cDNA (Gesamtlänge 6639 bp). Dabei entspricht der graue Bereich der durch Dipl. Biol. Jutta Trübenbach (1998) charakterisierten Anteile, während in schwarz die im Rahmen der vorliegenden Dissertation zusätzlich identifizierten und charakterisierten Abschnitte der *CDT151*-cDNA dargestellt sind. Lage und Orientierung wichtiger *primer* für die Generierung der dargestellten cDNA-Klone durch RT-PCR und anschließende Subklonierung sind durch schwarze Dreiecke angedeutet. Der mit EST65 bezeichnete Klon wurde als cDNA-Klon vom RZPD in Berlin bezogen und ebenfalls doppelsträngig sequenziert.

Die aus doppelsträngiger Sequenzierung der überlappenden cDNA-Klone erhaltene Nukleotidsequenz, sowie die Aminosäuresequenz im Bereich des identifizierten ORF ist in Abbildung 3.41 gezeigt.

```

1 gaggtgaagcaggcgctcttggctggcgccgcccctgcaatcogtggaggaacgcccgcgagccaccatc
74 ATGCCTGGGCACCTTACAGGAAGGCTTCGGCTCGTGTGCTACCAACCAGATTATTGACGACGAATCGGACCCTTCGAGGTG
1 M P G H L Q E G F G C V V T N R F D Q L F D D E S D P F E V
164 CTGAAGGCAGCAGAGACAAGAAAAAGAACCGGGCGGGGGCGGTGGGGGCCCTGGGGCCAAGAGCGCAGCTCAGGCCGGGCCAG
31 L K A A E N K K K E A G G G G V G G P G A K S A A Q A A A Q
254 ACCAANTCCAACGGCAGGCAACAGCTGCGCAAGAGTCCCAGAAAGACCGCAAGAACCCTGCCCCCAGCGTTGGCGTGGTTGAC
61 T N S N A G K Q L R K E S Q K D R K N P L P P S V L V V D
344 AAGAAAGAGGAGAGCGACGCCCGCTGGCCTTAAAGAAAGAAAGAAAGACGAGTTGGAAGAAGACCTGATCAACAACCTCAGGGTGA
91 K K E E T Q P P V A L K K E G I R R V G R R P D Q Q L Q G E
434 GGAAAAATAATTGATAGAAAGCAGAAAGGCGACCACTCGTGAACGAAGATTGAAAAGCCACTTGAAGAAAAGGGTGAAGGAGCGGAA
121 G K I I D R R P E R R P P R E R R F E K P L E E K G E G G E
524 TTTTCACTGTAGACGATTATTGACCGACCTATTGAGETCTGTGGTCTTGAAGAGGTCGAGGGGCCCTGGACCTGGAGTGGGC
151 F S V D R P I I D R P I R G R G G L G R G R G G R G M G
614 CGAGGAGATGGATTGATTCTCGTGGCAAACGTGAATTGATAGGCATAGTGAAGTGATAGATCTGGCTGAAGCACGAGGACAAACGT
181 R G D G F D S R G K R E F D R H S G S D R S G L K H E D K R
704 GGAGGTAGCGGATCTCAACTGGGGAACGTCAAAGACGAATTAACGACTTGGATCAATCAAAATGTGACTGAGGAAACACCTGAAGGT
211 G S G S H N W G T V K D E L T D L D Q S N V T E E T P E G
794 GAAGAACATCATCCAGTGGCAGACACTGAAAATAAGGAGAATGAAGTTGAAGAGGTAAAAGAGGAGGTCAAAAGAGATGACTTTGGAT
241 E E H H P V A D T E N K E N E V E E V K E E G P K E M T L D
884 GAGTGAAGGCTATTCAAATAAGGACCGGGCAAAAGTAGAATTTAATATCCGAAAACCAATGAAGGTGCTGATGGCAGTGAAGAAG
271 E I K A I Q N K D R A K V E F N I R K P N E G A D G Q W K K
974 GGATTTGTTCTTCAAATAAAGAGTGAAGAGCTCATGCTGAAGATTTCGGTTATGGACCATCATTTCCGGAAGCCAGCAAAATGATATA
301 G F V L H K S K S E E A H A E D S V M D H H F R K P A N D I
1064 ACGTCTCAGTGGAGATCAATTTTGGAGACCTTGGCCGCCAGGACGTGGCGGCAGGGAGGACGAGGTGGACGTGGCGTGGTGGCGCC
321 T S Q L E I N F G D L G R P G R G G R G G R G R G R G R G R G R G R
1154 CCAAACCGTGGCAGCAGGACCCACAAGTCAAGTCTTCTCTGATGTGGATGACCCAGAGGCATTTCCAGCTCTGGCTTAA
361 P N R K S R T K S A P D V D D P E A F P A S T P
1238 ctggatgccataagacaaccctgggtcccttgggaaccctctgtttcaagcttctgcatgcttaaggattccaaacgactaagaaatataaaaaaag
1338 actgtcattcacaaccattcaacactaaagactgaattttatctgttttaaaaaagaactctcccgctacacagaagtaacaaatattggttagctttt
1438 gtatttagaaatgtattggtagcagggatgttttcataaatttcagagattatgcattcttcagtaatacttttggattgctgtgcgcaaatatgcat
1538 ccaacttggaaatagaggtggaacagtggtaccagtttaagactttcaactcatttgggttttttaataaggatttagaagttcccccaatatacaaa
1638 ctggttttaaatattggacatactgggttttaatacctgctttgcatattcaacatggtcaactgggacatgttaaaacttggatttggcaaatttatgc
1738 tgtggaataactaatatgatttttaacttagtttttaaattttcaattttggggaaaaatctttttcaactctcatgatagctgttatatatata
1838 tgcataactcttatatacagaataatcagactgtaacaaattcaagacacatttggtttattaaccttgctccttgatggctcattagggtccaaat
1938 ataactgatttcatcttccagctataattacttttaaatgcttgagtttccccatttaaaactaaactagacatttaattgggtgaaagtgttttaa
2038 ctacttctgcttggtaggcaactctgctcaagtgaagtgtttataggatgggtttttctccccctccaccaggggtgggtggaataaagtgtattgg
2138 ccaatggttaataatttaaacctgcttgaataaagtctggccatttggtagattctgtgtgtgaaaggtcccaaaatcaaaatggtaacataca
2238 atcagccaccatttaacccctctctgtctcaaaaacaaaacaaagggcgctgggtggtaggggtgaggtgggggagatttttaatttttggaaattggg
2338 agcagacagctttactttgaaagttggaacagcagcactatacagaataataacccaaaaccccttactgtttcctaaattctcagatgttactatt
2438 tggtytaagttagattttccacagaagtggttaattctctctctctccacttagaaaaataggtaaaataatggattctcctataatgggagatc
2538 accacttataaaaacacacataagaatgatgaattaaaagaattttctagagttgcttttatctgcccactttattgataaacagtgaaagaattttta
2638 aaaaatttttaagaattgtttgctcagctcatttttagaattgtctacctgttatggtaattgctccagttttaaataattggacactctcaatcttaa
2738 catttctatttagctgattggttctcacataacttcaaaaagaactttatggtataagagttacttttggataagatttatatactcagttaccct
2838 actattctgaacttttaggaaggaggttaattgttttaagtaggataaacttggctgggtgtttggatcttatgatctgagcactgttctgcaactggt
2938 gctaatgtcctaataaatttatatttcaacacatcogtgcaccagagatttaatttagtccatagaaacttgaccctatttctcagacagcaaa
3038 catacgcactcctaactcagttgttttagacttttcaagatctcaactcattccaaaacatgtaccatgtttataaaactcttgattccagcaacata
3138 ctatgaaaaaacctcgtactcaaaaacacacactctcagtgctcactctgctgctgagagacaacatagcaaatctcgtgatgtgcaagcttcoa
3238 gatagctgcaacttaaaaagttggtgcatagttgattctgaggtataaaatttgcctcacttagttcactttgctcaagagctaaaactggaactaa
3338 ctctctctatttgggtgggttaaaactgaaaataaagatttttctcagctcactctcaaaagctcaaaaaaacaaataaaggatcattttatgtc
3438 atgtgttctctgggtttgctgactgtgacacacccctgtgtgttataatttttaattgaaatttatatgggggtttttatttggtaaaaacccagctgt
3538 tgaatcacatttgggaaggttacttacttaagtactaaactgaacttaattgggaaggtgaaattcttgaataacaaaacccagactctctggattta
3638 atctgattgctactcttagcagatcaactttttgataagaaagttaagcaactgaatgctacttttgatgacaacactggctataaattagctgggg
3738 aaaaatcccaaacagataaagatttcaaaagtaagggtggcagctgagtttccagtgaaactttatcttgatgcttttaaatggagaaattgccaagc
3838 tgagatttttaagccatttttcaagctgtattgaaatgatgtagagacatgggtttctttatagctatttgagacactggaggttaagcaagcttta
3938 aaaaattggccaccatacacatcagtttagtctcttactcttatttttaataaaaagtagtacacacatttccaggggtgtaaaataatattggggctt
4038 gcttttggttaggatttaaaaggagatattaagattctcaacttaatttttctgattttctgattgcccagagatggtgcaactgaaatagacaagggat
4138 tgcatacaaacgctcaactgtgatttggatttogaataactaggttgggcaatttggtaaccttggtaacctcaactgcttttaggaaggtaccatcgt
4238 ggaaggaacaacaggtgttaaaaggttcaaaaggaatgagaataggaagttaactagaacctactgatgtgaccttagaggttaagatttccaggtat
4338 attagtgacctccagctcaactggatagcaaatccagggatctcaggtgctgcaattttactttcaaaatgaacacttagaaaaatagattataaac
4438 cagaagtttggatttcaactgagacaataatgtaataaagttttagcaactgcaactgtaacagagatctcaggttaactaaagaaaagccagaa
4538 actcattattctgctgctttagttaggataactggttaaacagggcagtaaaatgatacaatattgaaactggaccatagtaataaattagatttcaata
4638 tcaatttgcagtagaaattgctagtttaattagtagtagggagcttccagaaaatttgggttatttggcctaagctgtgcccctgggatctactctca
4738 tctctcagcttttaagttcaaatttggaggtttagtgaagtgattgaaataaactctcagagctgaggaagtggttaattcaagaatattagtgaaa
4838 caaggtttagaactcaaacatgagtagcttaagtttaggaaatgtagaataaaattgctaaagctatcattgattttggcccaaaatgaaataatgaac
4938 actgaaaatgagcgcacttaaatgagatgctgtatgaagccaggggtcagcaaaagttagcctgtgacctgggtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgt
5038 tgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgt
5138 cagcataaagataccogctttcaacagaatgttctgctgcaactgcaactctgggttaacaagatttctgtcttgaacagctggctgtctgtca
5238 cccaggtggagtgagtgagtgatctcaggtcactgcaagctcccaactccccgggttcaagcaatctgctcagcctcctgagtagctgggatataag
5338 gttgtgcaaccacacagacagctaaatttacaggtgtacaccacacacacaaagaatcactgaaacccggaggtgggggtgagcagcaagatcata
5438 gcactgtactcagctcgggtgacacactgtgaaaaataaaagttagttctaggtcaaaataaagttgtctaccaacaggaagctgtgaaattaga
5538 agtaattttaaagcatactttacacctctataatacaaaagtaagggcaagataaaaactgttagtaaaaactgttttatatttttagataggtagcc
5638 tgaacataaaaaatattttgaaagctgttaaggggtgtataactgttaaaaaataccatgattagtatttcaacttttagtgaactcagactccctttgt
5738 taagttctggctgtgcaaacaggtttttctagatgagaatgaacactctataggttaaatccataggttagctgggggcagaaatatt
5838 ggtcctggagtagtgaacttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttt
5938 tggtagcctaattgttcaactctcaaatggaaggggaaaaagtaccacaacaaagttagaaaatgatttaccgaatatttttttttttttttttttttttt
6038 ttttttaaatcagtaagtgtttgttctttttgtctccctttggagtagttgggcaattctcagctgtctgtatgacattactctctgagactgtgat
6138 atgcaagaaagtataataaaagatcctgggtgtaactttgtatctgagttctgattcatttagaacttttagaaaatctatttagataattggttcaata
6238 ctaggtgctcaactctcagctgtgtgcttaactctgaactgtgttttaggtgttactgggtggaagcattggaagtgaaaggtgaaaggtcaatataag
6338 gatttttagatttactgagtaggaaaggtgggaagtagcttatcttggacagttgtatttggcactaacccactgtttgcaattgtagctgttagctgt
6438 cagttctagatttttaggacaaagaatctcaatttaaaagaacagtttttatatacactagaatgaagattctgtttaaagcgggttttggtttaacttgg
6538 tcttggacatttgcctaaaaatttggtaggtgggactaaaattgtctattagccaatgaataacgtccaagtaatttttggttttttttgggaaaaa
6638 aa

```

Abbildung 3.41: cDNA- und abgeleitete Aminosäuresequenz von CDT151. Nukleotide des ORF sind in Großbuchstaben hervorgehoben, Kleinbuchstaben stehen für flankierende, nicht kodierende Sequenzen (5'- und 3'-UTR). Die aus der Sequenz des ORF abgeleitete Aminosäuresequenz ist unter den korrespondierenden Basentriplets angegeben. Das *in frame* Stop-Codon im 5'-UTR ist durchgestrichen dargestellt. SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) sind mit Y (C oder T) bzw. R (A oder G) in fetter Schreibweise bezeichnet (nt 4647 [R], nt 4660 [R], nt 4861 [R], nt 4904 [Y]).

Wie aus der Abbildung deutlich wird, konnte durch Verlängerung der bekannten cDNA-Sequenz von *CDT151* in 5'-Richtung ein ORF identifiziert werden, der 1161 Nukleotide überspannt und potenziell für 387 Aminosäuren codiert. Die Länge des verbleibenden 5'-UTR beträgt damit 73 Nukleotide, die Länge des 3'-UTR 5405 Nukleotide. Mit einer Gesamtlänge von insgesamt 6639 bp liegt die Größe der bekannten Sequenz damit im Bereich der durch *Northern blot*-Experimente identifizierten Transkriptgröße von *CDT151* (ca. 6,5 kb; Trübenbach, 1998).

3.2.6.2 Homologievergleiche

Mit der Sequenz der *CDT151*-cDNA im Bereich des ORF wurden Homologieuntersuchungen durchgeführt (vgl. Kap. 2.14). Im folgenden Abschnitt sind die Datenbankeinträge mit signifikanter Sequenzhomologie aufgeführt, die zur initialen funktionellen Charakterisierung von *CDT151* beigetragen haben (vgl. hierzu auch die Diskussion in Kap. 4.3.4).

Die cDNA-Klone, deren Sequenz als Grundlage für die Verlängerung der *CDT151*-Sequenz verwendet wurde, zeigen (wie erwartet) eine 100%ige Homologie auf Nukleotid- (und auch Protein-)ebene zu *CDT151*. Es handelt sich dabei im wesentlichen um den cDNA-Klon mit der Zugriffsnummer AL080119 (*Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp564M2423*) der nicht redundanten Datenbank. Ein weiterer Datenbankeintrag, der nahezu Sequenzidentität sowohl auf Nukleotid- als auch auf Proteinebene aufweist, repräsentiert den cDNA-Klon mit der Zugriffsnummer AF151813 (*Homo sapiens CGI-55 protein mRNA, complete cds.*). Im Bereich des ORF ist der einzige Unterschied zwischen der abgeleiteten Proteinsequenz dieses Klonen und der von *CDT151* abgeleiteten Proteinsequenz das Fehlen von 18 Nukleotiden (bzw. 6 Aminosäuren) auf Seiten von CGI-55. Interessanterweise ist dieser Datenbankeintrag mit dem Vermerk annotiert, dass der dem CGI-55 Protein zugrundeliegende ORF durch komparative Klonierung (Vorlage: *C. elegans* Proteom) identifiziert wurde. Abbildung 3.42 zeigt einen Ausschnitt des Eintrages von CGI-55 in der Gendatenbank und darunter den Aminosäuresequenzvergleich von CGI-55 und *CDT151*.

```

LOCUS       AF151813      2099 bp      mRNA           PRI           18-MAY-2000
DEFINITION  Homo sapiens CGI-55 protein mRNA, complete cds.
ACCESSION   AF151813
VERSION     AF151813.1   GI:4929578
AUTHORS     Lai,C.-H., Chou,C.-Y., Ch'ang,L.-Y., Liu,C.-S. and Lin,W.-C.
TITLE       Identification of Novel Human Genes Evolutionarily Conserved in
            Caenorhabditis elegans by Comparative Proteomics
JOURNAL     Genome Res. 10 (5), 703-713 (2000)

>ref|NP_057089.1| CGI-55 protein
gb|AAD34050.1|AF151813_1 (AF151813) CGI-55 protein [Homo sapiens]
            Length = 393

Score = 797 bits (2035), Expect = 0.0
Identities = 385/393 (97%), Positives = 385/393 (97%), Gaps = 6/393 (1%)

CDT151:    1  MPGHLQEGFGCVVTNRFDQLFDDESDPFVFLKAAENKKKEAGGGVGGPGAKSAAQAAAQ  60
            MPGHLQEGFGCVVTNRFDQLFDDESDPFVFLKAAENKKKEAGGGVGGPGAKSA  QAAAQ
CGI55:     1  MPGHLQEGFGCVVTNRFDQLFDDESDPFVFLKAAENKKKEAGGGVGGPGAKSATQAAAQ  60

CDT151:    61  TNSNAAGKQLRKESQKDRKNPLPPSVGVVDKKEETQPPVALKKEGIRRVGRRPDQQLQGE  120
            TNSNAAGKQLRKESQKDRKNPLPPSVGVVDKKEETQPPVA  KKEGIRRVGRRPDQQLQGE
CGI55:     61  TNSNAAGKQLRKESQKDRKNPLPPSVGVVDKKEETQPPVAFKKEGIRRVGRRPDQQLQGE  120

CDT151:    121  GKIIDRRPERRPPRRERFEKPLEEKEGEGEFSVDRPIIDRPIRGRGGLGRGRRGRGMG  180
            GKIIDRRPERRPPRRERFEKPLEEKEGEGEFSVDRPIIDRPIRGRGGLGRGRRGRGMG
CGI55:     121  GKIIDRRPERRPPRRERFEKPLEEKEGEGEFSVDRPIIDRPIRGRGGLGRGRRGRGMG  180

CDT151:    181  RGDGFDSRGKREFDRHSGSDR-----SGLKHEDKRGSGSHNWGTVKDELTDLDQSNVT  234
            RGDGFDSRGKREFDRHSGSDR          SGLKHEDKRGSGSHNWGTVKDELTDLDQSNVT
CGI55:     181  RGDGFDSRGKREFDRHSGSDRSSFSHYSGLKHEDKRGSGSHNWGTVKDELTDLDQSNVT  240

CDT151:    235  EETPEGEEHHPVADTENKENEVEEVKEEGPKEMTLDEWKAIQNKDRAKVEFNIRKPNEGA  294
            EETPEGEEHHPVADTENKENEVEEVKEEGPKEMTLDEWKAIQNKDRAKVEFNIRKPNEGA
CGI55:     241  EETPEGEEHHPVADTENKENEVEEVKEEGPKEMTLDEWKAIQNKDRAKVEFNIRKPNEGA  300

CDT151:    295  DGQWKKGFVLHKSKEEAHAEDSVMDDHFRKPANDITSQLEINFGDLGRPGRRGRRGRRG  354
            DGQWKKGFVLHKSKEEAHAEDSVMDDHFRKPANDITSQLEINFGDLGRPGRRGRRGRRG
CGI55:     301  DGQWKKGFVLHKSKEEAHAEDSVMDDHFRKPANDITSQLEINFGDLGRPGRRGRRGRRG  360

CDT151:    355  RRRGGRPNRGRSRTDKSSASAPDVEDDPEAFPALA  387
            RRRGGRPNRGRSRTDKSSASAPDVEDDPEAFPALA
CGI55:     361  RRRGGRPNRGRSRTDKSSASAPDVEDDPEAFPALA  393

```

Abbildung 3.42: Vergleich der Aminosäuresequenzen von CDT151 und CGI-55. Ein Ausschnitt des in der Gendatenbank eingetragenen Vermerks für CGI-55 ist im oberen Teil der Abbildung gezeigt. Der Aminosäurevergleich der beiden Proteine (BLASTP) ist darunter dargestellt.

Durch die Datenbankanalysen konnten noch weitere interessante Genprodukte bzw. cDNAs mit signifikanter Homologie identifiziert werden. Dabei handelt es sich um das intrazelluläre Hyaluronsäure bindende Protein (Zugangsnummer AF241831; die Sequenz ist über große Bereiche identisch mit der des intrazellulären Antigens Ki-1/57 [Zugangsnummer U77327; Kobarg *et al.*, 1997]), eine aus proliferierenden Epithelzellen der Ratte isolierte cDNA (Zugangsnummer U21718), den Transkriptionsfaktor ARF6 der Maus (Zugangsnummer S53748), und verschiedene nicht näher charakterisierte Gene/Genprodukte. Die ausführlichen Sequenzvergleiche (bzw. Auszüge davon) einiger dieser Datenbankeinträge mit der CDT151-Aminosäure- bzw. Nukleotidsequenz sind in Abbildung 3.43 dargestellt.

```

>gb|AAF62546.1|AF241831_1 (AF241831) intracellular hyaluronan-binding protein [Homo sapiens]
Length = 413
Score = 259 bits (654), Expect = 4e-68
Identities = 177/412 (42%), Positives = 226/412 (53%), Gaps = 43/412 (10%)

CDT151: 5 LQEGFGCVVITNRFQDFDDESDFEVLKAAENKKKE-----AGGGVGGPGAKSA 54
+QE FGCVV NRF QL DDESDF++L+ AE ++++ A G G G +S
Sbjct: 16 MQESFGCVVANRFHQLDDESDFDILREARRRQQQLQRKRDEAAAAAGAPRGGRRSP 75

CDT151: 55 AQAAAQTNNSAAGKQLRKESQKDRKNPLPPSVGVVDKKEETQPPVALKKEGIRRVGRRPD 114
A A+ + AG R+ESQK+RK+ LP V P L+ G +R RR +
Sbjct: 76 AGASG---HRAGAGRRRESQKERKS-LPAPVA---HRPDSPGGLQAPGQKRTPRRGE 126

CDT151: 115 QQLQEGEKIIDRRPERRPPRRRRFEKPLEEKEGEG-----EFSVDRPIIDRPIRGRG 166
QQ ++ + ER R R +P E + + E DR DRP+RGRG
Sbjct: 127 QQGWNDSRGPPEGMLERAERSYREYRYPYETERQADFTEKFPDEKPGDRFDRDRPLRGRG 186

CDT151: 167 GLGRGRGGRGRGMGRG---DGFDSRGKREFDRHSGSDRSGLKHEDKRGSGSHNWGTVK 222
G G GRGRG G G D FD RGKREF+R+ G+D+ ++ ED GG G WG+ K
Sbjct: 187 GPRGGMGRGRG-GPGNRVDFDQFDRGKREFERYGGNDKIAVRTEDNMGCGVRTWGS GK 245

CDT151: 223 DELTDLQSNVTEETPEGEEHHPVADTEN--KENEVEEVKEEGPKEMTLDEWKAIQNKDR 280
D +D++ + EE EE + E+ K E+E +E +EMTLDEWK +Q + R
Sbjct: 246 DT-SDVEPTAPMEPTVVEESQGTPEEESPAKVPELEVEEETQVQEMTLDEWKNLQEQTR 304

CDT151: 281 AKVEFNIRKPNEGADGQWKGFVLHKSSEEHAEDSVMD--HHFRKPANDITSQLEINF 338
K EFNIRKP K V+HKS K + +D D H FRKPANDITSQLEINF
Sbjct: 305 PKPEFNIRKPESTVPS---KAVVIHKSRYRDDMVKDDYEDDSHVFRKPANDITSQLEINF 361

CDT151: 339 GDLGRPGRGGRG-RGGRGRGR-PNRSRTDKSSAS-APDVEDPEAFPALA 387
G+L RPRGR RGG RGRGR R N R + AP+ DDPE FPAL+
Sbjct: 362 GNLPFRPGRGARGGTRGGRIRRAENNYPRAEVVMQDVAPNPDDPEDFPALS 413

```

```

>pir||S53748 transcription factor ARF6 chain B - mouse
Length = 66
Score = 69.1 bits (166), Expect = 8e-11
Identities = 30/30 (100%), Positives = 30/30 (100%)
Frame = +1

CDT151: 4 PGHLQEGFGCVVITNRFQDFDDESDFEVL 93
PGHLQEGFGCVVITNRFQDFDDESDFEVL
Sbjct: 36 PGHLQEGFGCVVITNRFQDFDDESDFEVL 65

```

```

>gb|U21718.1|RNU21718 Rattus norvegicus clone C426 intestinal epithelium proliferating
cell-associated mRNA sequence
Length = 975
Score = 609 bits (307), Expect = e-171
Identities = 498/553 (90%), Gaps = 9/553 (1%)
Strand = Plus / Plus

CDT151: 755 ttggatcaatcaaatgtgactgaggaacacotgaaggtgaagaacatcatccagtgga 814
||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||| | |||||||
Sbjct: 390 ttggagcaatcaaatgtgactaggaacacotgaaggtgaagagacc---cagtgga 446

CDT151: 815 gacactgaaaataaaggagaatgaagttgaagaggtaaaagaggaggtccaaagagatg 874
||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| |||||||
Sbjct: 447 gacactgaaaataaaggagaacgaagttgaagaggttaaggaagagggtccaaagagatg 506

CDT151: 875 actttggatgagtgaagctattcaaaataaggaccgggcaaaagtagaatttaatatc 934
||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| |||||||
Sbjct: 507 actttggatgagtgaagctattcaaaataaaggaccgagcaaaagtaga-tttaatatc 565

CDT151: 935 cgaaaaccaaataaaggtgctgatggcagtggaagaaggatttgttcttcataaatca 994
||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| |||||||
Sbjct: 566 cgaaaaccaaataaaggtgctgatggacaatggaaaaggatttgttctgcataaatca 625

CDT151: 995 aagagtgaagaggtcatgctgaagattcggttatggaccatcatttccggaagccagca 1054
|| | ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| |||||||
Sbjct: 626 aaagtgaagaggtcatgctgaagattcagttatggaccatcatttccggaagccagaa 685

CDT151: 1055 aatgatataacgtctcagctggagatcaattt-tggagacctggccgcccaggagctgg 1113
||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| |||||||
Sbjct: 686 aatgatataacgtctcaactggagatcaatttggggagacctaggcccccaggagctgg 745

CDT151: 1114 cggcag-gggaggacgaggtggagctggcggtggcgcccaaacctggcagcagga 1172
|| | | ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| |||||||
Sbjct: 746 tgggagagagagagctcgtggacgtggccgtggctcgtcctaatcgtggcagcagga 805

CDT151: 1173 ccgacaagtcaagtgcttctgctcctgatgtggat-gaccagagggcatt-cccagctc 1229
|| | ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| |||||||
Sbjct: 806 ctgataagtcaagtgcttctgctcctgatgtagatggcccagagggcattccccgctc 865

```


Lokalisation einiger der identifizierten Gene/Proteine mit signifikanter Homologie zu CDT151 (vgl. Kap. 3.2.6.2). Weiterhin konnten mehrere potenzielle ATP-Bindungsmotive in CDT151 identifiziert werden. Die Konsensussequenz für ATP-Bindungsmotive wird mit [G-X-G-X-X-G-(X₁₃₋₂₂)-K] angegeben (Wierenga und Hol, 1983). Übereinstimmungen mit dieser Konsensussequenz finden sich innerhalb von drei Blöcken in der putativen Aminosäuresequenz von CDT151 (*cluster* 1: G⁴²-G⁴³-G-G⁴⁵-V-G-G-P-G-(X₁₇)-K⁶⁸-(X₃)-K⁷²; *cluster* 2: G¹⁶⁴-R-G-G-L-G¹⁶⁹-R-G¹⁷¹-R-G-G-R-G-(X₁₃)-K¹⁸⁵; *cluster* 3: G³⁴⁵-R-G-G³⁴⁸-R-G-G³⁵¹-R-G-G-R-G-(X₁₂)-K³⁶⁹; der Anfang eines putativen ATP-Bindungsmotivs ist durch Angabe der Aminosäureposition des entsprechenden Glycinrests und fette Schreibweise markiert). Die Lage der beschriebenen Strukturmodule innerhalb der Aminosäuresequenz von CDT151 kann aus Abbildung 3.44 entnommen werden.

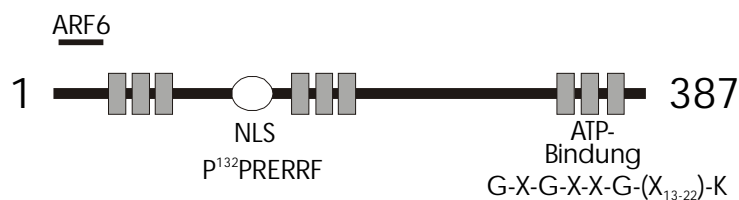


Abbildung 3.44: Schematische Darstellung der aus den Homologievergleichen und Strukturvorhersagen abgeleiteten Proteinmodule von CDT151 (Modell). Die ATP-Bindungsmotive sind als graue Rechtecke, das Kernlokalisationssignal als weißer Kreis dargestellt. Der Bereich der Aminosäureidentität von CDT151 mit dem Transkriptionsfaktor ARF6 der Maus ist links oben eingezeichnet.

3.2.6.4 Verifikation der chromosomalen Lokalisierung

Die von Jutta Trübenbach im Rahmen ihrer Diplomarbeit durchgeführten Untersuchungen zur genomischen Lokalisation von *CDT151* ergaben eine Platzierung des Gens in 1p31-32 (Trübenbach, 1998). Dass es sich bei der zunächst *in silico* angeordneten und später durch RT-PCR bestätigten cDNA-Sequenz tatsächlich um ein Transkript handelt, und nicht etwa ein artifizielles (weil chimäres) RT-PCR-Produkt, wurde durch genomische PCR-Analysen auf DNA aus Mensch/Nager-Zellhybriden und auf PAC-DNA gezeigt. Dies wurde nötig, da die Datenbanken insbesondere für die Nukleotide des ORF widersprüchliche Kartierungsinformationen aufweisen. So wird für den Klon AF131807, der im mittleren Bereich der *CDT151*-cDNA gelegen ist, eine chromosomale Lokalisation auf dem kurzen Arm von Chromosom 1 (zwischen den Markern D1S203 und D1S2865) angegeben. Im Gegensatz dazu weist die Gendatenbank für den Klon AL080119 (s.o.), dessen abgeleitetes Protein identisch mit den Aminosäuren des ORF von *CDT151* ist, Positionen auf Chromosom 1, 3 und 5 auf. Ferner ist die Lokalisation des nahezu identischen CGI-55 Proteins (vgl. Abb. 3.42 in Kap. 3.2.6.2) ebenfalls mit Chromosom 3 angegeben.

Die Abbildung 3.45 zeigt die verschiedenen PCRs mit entsprechenden *CDT151*-spezifischen *primern* auf humangenomischer DNA der Einzelchromosom-Zellhybride und den notwendigen Kontrollreaktionen.

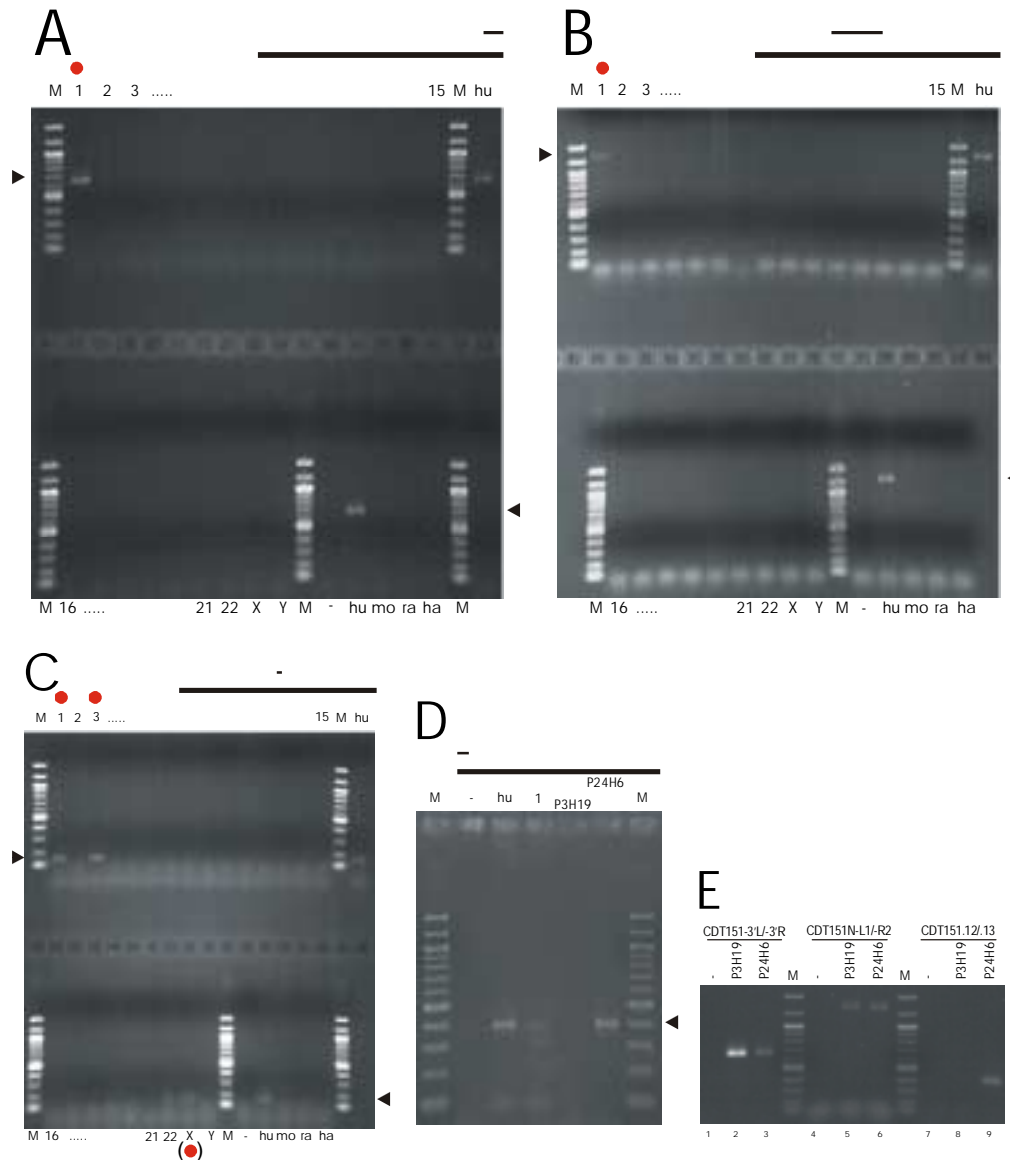


Abbildung 3.45: Genomische PCRs zur Verifikation der chromosomalen Lokalisation von *CDT151*. Jedes Gel zeigt die elektrophoretisch aufgetrennten Produkte von PCR-Reaktionen mit definiertem Material humangenomischer DNA als Matrize. Pfeilspitzen markieren die Position der entstandenen spezifischen Produkte (Spuren im Falle der Lokalisations-PCRs in A bis C mit rotem Punkt markiert). Als Marker (M) wurde die 100 bp-Leiter verwendet. Die Art der als Matrize verwendeten genomischen DNA ist über bzw. unter den jeweiligen Spuren angegeben (1= humanes Chromosom 1, 2= humanes Chromosom 2, usw., X= humanes Chromosom X, hu= gesamtgenomische humane DNA, mo= gesamtgenomische Maus-DNA, ra= gesamtgenomische Ratten-DNA, ha= gesamtgenomische Hamster-DNA, P3H19/P24H6= PAC-DNA mit Chromosom 1-spezifischem Integrat, -= Negativkontrolle [H₂O]). Die Lage des jeweiligen PCR-Produkts relativ zur *CDT151*-cDNA ist über den Teilabbildungen schematisch angedeutet. (E) zeigt die Produkte von PCR-Reaktionen auf den PAC-Klonen 3H19 und 24H6 mit den für Chromosom 1 spezifischen *primern* aus (A) (Spuren 1-3), (B) (Spuren 4-6) und (D) (Spuren 7-9). Verwendete Oligonukleotide: (A) CDT151-3'R/-3'L, (B) CDT151N-R2/-N-L1, (C) CDT151N-R3/-N-L1, (D) CDT151.12/-13.

Zusammengenommen ergeben die genomischen Lokalisations-Experimente, dass sich die gesamte bekannte Nukleotidsequenz von *CDT151* auf dem kurzen Arm von Chromosom 1 des Menschen befindet. Dies wird deutlich durch die in verschiedenen Bereichen von *CDT151* amplifizierten cDNA-Produkte auf Chromosom 1 enthaltender Hybridzell-DNA bzw. auf den für die zytogenetischen Lokalisationsexperimente verwendeten PAC-Klone (PAC 3H19 bzw. PAC 24H6). Die Verwendung eines Paares von Oligonukleotiden als *primer*, die ein kurzes cDNA-Fragment amplifizieren (vgl. Abb. 3.45C), macht deutlich, dass ähnliche Sequenzabschnitte auf anderen Chromosomen (z.B. auf Chromosom 3) zu finden sind. Die widersprüchlichen Kartierungsergebnisse der oben aufgeführten cDNA-Klone (z.B. für *CGI-55*) könnten in entsprechenden Kartierungsexperimenten mit unspezifischen PCR-Amplifikaten generiert worden sein. Die in der Gendatenbank für das *unigene cluster* Hs. 165998 (es enthält verschiedene ESTs mit Sequenzidentität zur *CDT151*-cDNA) gefundene Lokalisation zwischen den Markern D1S203 und D1S2865 entspricht einer Lage des Gens in der Bande 1p21-22.3 und kann damit als chromosomale Position von *CDT151* angenommen werden.

3.2.7 Das Gen *GLI3*

Im Rahmen der *differential display*-Experimente konnte unter Verwendung der Primerkombination T11A und 10-10 ein cDNA-Fragment isoliert werden, das durch seine stark erhöhte Expression in Gewebe eines konnatalen mesoblastischen Nephroms (KMN) auffiel. Auch in einigen weiteren untersuchten WT-Geweben und in fetalem Nierengewebe konnte eine im Vergleich zu adultem Nierengewebe erhöhte Expression nachgewiesen werden. Die Reamplifikation, Klonierung und Sequenzierung ergab ein DNA-Fragment von 204bp Länge, das identisch mit Teilen der cDNA-Sequenz des Gens *GLI3* ist. Für die im folgenden Abschnitt beschriebenen Untersuchungen zur Expression von *GLI3* wurden *primer* abgeleitet, die im Rahmen semiquantitativer und quantitativer RT-PCR-Experimente eingesetzt wurden. Neben der Untersuchung der *GLI3*-Expression in verschiedenen Normalnieren- (adult und fetal), KMN- und WT-Geweben (vgl. Kap. 3.2.7.1) wurde die Expression weiterer Gene der Signaltransduktionskaskade, in die *GLI3* eingebettet ist, auf RNA-Ebene quantifiziert (vgl. Kap. 3.2.7.2).

3.2.7.1 Expression von *GLI3* in verschiedenen Nierengeweben

Im Rahmen der Betreuung der Diplomarbeit von J. Trübenbach konnte die differenzielle Expression von *GLI3* mit Hilfe semiquantitativer RT-PCR-Experimente verifiziert werden. Dabei stand die reine Beschreibung der *GLI3*-Expression in den für die Untersuchungen

ausgewählten Geweben im Vordergrund. Eine Multiplex-PCR lieferte das in Abbildung 3.46 dargestellte Ergebnis und zeigt eindeutig die verstärkte Expression von *GLI3* in den Tumorgeweben und in fetaler Niere im Vergleich zum adulten Nierengewebe.

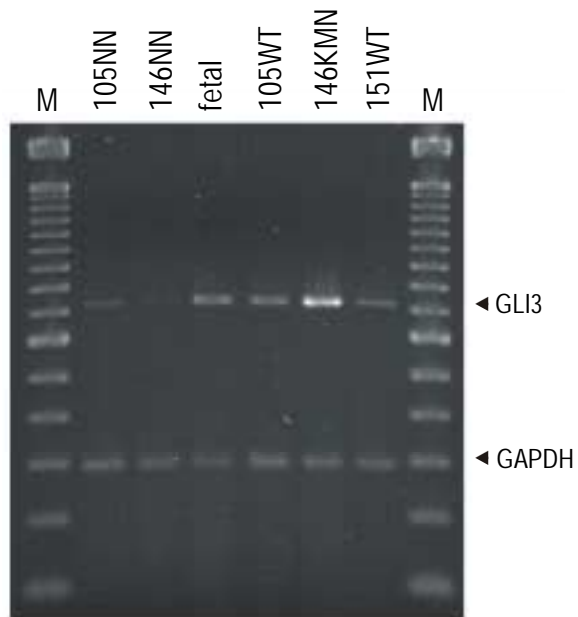


Abbildung 3.46: Vergleichende Untersuchung der *GLI3*-Expression in verschiedenen Normalnieren- und Tumorgeweben mittels sqRT-PCR (Multiplex-PCR). Aufgetragen wurden die PCR-Reaktionen auf cDNA der über den Spuren angegebenen Gewebe (Probenentnahme nach 35 Amplifikationszyklen). Die PCR-Reaktion wurde dabei zunächst für 10 Zyklen nur mit den *GLI3*-spezifischen primern *GLI3*-L/-R durchgeführt und danach kurz auf Eis inkubiert. Daraufhin wurden je 20 pmol GAPDH-spezifischer primer (*GAPDH*-1/-2) zu jedem Reaktionsansatz zugegeben und die Amplifikation fortgesetzt (Multiplex-PCR). Das Gelbild verdeutlicht die verstärkte Expression von *GLI3* in fetalem Nierengewebe und in den Tumorgeweben (insbesondere *KMN146*). Parallel durchgeführte Negativkontrollen zeigten keine Amplifikate (Daten nicht abgebildet).

Um genauere Aussagen über die *GLI3*-Expression machen zu können, und um zu untersuchen, inwieweit die stark erhöhte Expression im *KMN* spezifisch für diesen Tumortyp ist, wurden quantitative RT-PCR-Experimente durchgeführt. Dabei wurden RNAs zweier weiterer *KMNs* und zweier zusätzlicher *WTs* in die Untersuchungen mit einbezogen. Nach Normalisierung der eingesetzten RNA-Mengen über die Quantifizierung der β -Aktin-Expressionsstärke in den Geweben, wurde die cDNA einer quantitativen Untersuchung hinsichtlich der *GLI3*-Expression unterzogen. Abbildung 3.47 zeigt das Autoradiogramm der gelelektrophoretisch (auf einem Polyacrylamidgel) aufgetrennten, radioaktiven β -Aktin- (oben) und *GLI3*-spezifischen PCR-Produkte bei gleicher Menge eingesetzter cDNA als Matrize.



Abbildung 3.47: Autoradiogramm geelektrophoretisch aufgetrennter Produkte radioaktiver RT-PCR-Reaktionen zur Quantifizierung der relativen Expressionsstärke von *GLI3*. Im oberen Teil der Abbildung sind die *β-Aktin*-spezifischen Produkte gezeigt. Die Probenentnahme erfolgte nach 15 Amplifikationszyklen. In der mit einem „*“ markierten Spur 7 wurde zur Kontrolle der Methodik die doppelte Menge (im Vergleich zu den PCR-Reaktionen der anderen Spuren) der Erststrangsynthese in der PCR eingesetzt (Einzelheiten s. Text). Im unteren Teil der Abbildung ist das Ergebnis einer analog durchgeführten PCR-Reaktion mit *GLI3*-spezifischen Oligonukleotiden als *primer* gezeigt (die Probenentnahme erfolgte hier nach 22 Zyklen). Als *template* wurden die gleichen cDNA-Mengen derselben Erststrangsynthesen wie für *β-Aktin* eingesetzt (auch hier betrug die cDNA-Menge im PCR-Ansatz von Spur 7 das doppelte gegenüber den übrigen PCR-Reaktionsansätzen [„*“]). Die stark erhöhte Expression von *GLI3* im KMN146 (Signal in Spur 3) relativ zum adulten (Signal in Spur 1) und auch fetalen Nierengewebe (Spur 2) wird deutlich und bestätigt das Ergebnis der sqRT-PCR (Abb. 3.46). Die verstärkte Transkription in der Mehrzahl der Tumorgewebe (Spuren 3-5 und 7) im Vergleich zum adulten Nierengewebe ist erkennbar (vgl. hierzu auch die quantitative Auswertung in Abb. 3.48). In den Spuren wurden RT-PCR-Produkte der folgenden Gewebe aufgetrennt: Spur 1= adultes Nierengewebe; 2= fetales Nierengewebe; 3= 146KMN; Spur 4= 43WT; Spur 5= 98WT; Spur 6= 105WT; Spur 7= 82KMN; Spur 8= 174KMN.

Die Signalstärken der *β-Aktin*-spezifischen RT-PCR-Produkte im oberen Teil der Abbildung zeigen eine gleichmäßige Verteilung. Noch immer bestehende, leichte Unterschiede in den Signalstärken zwischen den einzelnen *β-Aktin*-spezifischen PCR-Reaktionen wurden durch Berechnung eines Normalisierungsfaktors relativ zur Probe der fetalen Niere ausgeglichen. Er ergibt sich aus dem Quotienten der ermittelten *β-Aktin*-Bandenintensität eines jeden Gewebes und der *β-Aktin*-Bandenintensität des fetalen Gewebes. Die Ergebnisse aller folgenden Quantifizierungen wurden mit diesem Normalisierungsfaktor multipliziert.

In der PCR-Reaktion der in Spur 7 (mit „*“ markiert) aufgetragenen Probe wurde, verglichen mit den PCR-Reaktionen der übrigen Spuren, die doppelte Menge an cDNA als *template* eingesetzt. Dieses Vorgehen sollte die Tauglichkeit der angewandten Methode für die Generierung quantitativer Aussagen über die Expressionsverhältnisse verdeutlichen. Die Quantifizierung des Signals dieser Spur ergab eine 2,02-fache Intensität im Vergleich zum Signal in Spur 2 (bzw. eine 1,99-fache Intensität im Vergleich zum Mittelwert der Signalstärken aller anderen Spuren [Spuren 1-6 und 8]). Diese geringe Abweichung bei den Quantifizierungsexperimenten (1% bzw. 2%) macht die Aussagekraft der Ergebnisse aus den Quantifizierungsexperimenten deutlich.

Abbildung 3.48 zeigt die Auswertung der *GLI3*-Expressionsanalyse. Zur Ermittlung der Expressionsstärken wurden die Signalintensitäten des im unteren Teil von Abbildung 3.47 gezeigten Experimentes mit einem *Phosphoimager* bestimmt. In der Abbildung ist die

relative Expressionsstärke von *GLI3* im Verhältnis zur Expression in fetalem Nierengewebe (relative Expression= 1, Gewebe Nr. 2) eingetragen.

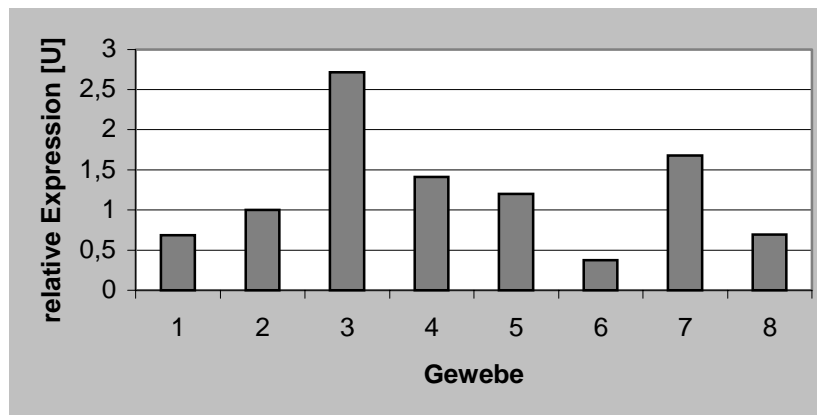


Abbildung 3.48: Grafische Darstellung der relativen Expressionsstärke von *GLI3* in den untersuchten Geweben. Im Diagramm sind die Signalintensitäten der in den entsprechenden Spuren in Abb. 3.47 auftretenden Banden dargestellt. Die Dimension der Y-Achse (relative Expression [U]) gibt dabei die Intensität der Bande einer Spur relativ zur Bandenintensität von Spur 2 an (entsprechend ist ihr Wert im Diagramm =1). Da die Bandenintensität direkt proportional zur Expressionsstärke von *GLI3* ist, läßt sich so die *GLI3*-Transkription in den untersuchten Geweben direkt vergleichen. Die stark erhöhte Expression in KMN146 (Spur 3) bestätigt die Ergebnisse der in Abbildung 3.46 gezeigten sqRT-PCR-Experimente. Vier der sechs untersuchten Tumorgewebe (KMNs in den Spuren 3 und 7; WTs in den Spuren 4 und 5) zeigen eine gegenüber adultem Nierengewebe erhöhte *GLI3*-Expression. Einzelheiten s. Text. Die Nummerierung der Gewebe entspricht derjenigen für Abb. 3.47.

Man erkennt die schon im Autoradiogramm sichtbare Verteilung der *GLI3*-Expressionsstärken in den einzelnen Geweben. Im Vergleich zur fetalen Niere ist die Expression im KMN von Patient 146 (Spur 3) um das 2,7-fache erhöht. Dies entspricht etwa dem 4,5-fachen Wert der *GLI3*-Expression in adultem Nierengewebe (Spur 1). Betrachtet man die beiden anderen KMN-Gewebe (in Spur 7 [KMN82] und Spur 8 [KMN174]), so wird deutlich, dass die *GLI3*-Expressionsstärke nicht mit dem Auftreten von KMNs direkt korreliert werden kann: Während das KMN von Patient 82 (Spur 7) ebenfalls eine gegenüber fetalem Gewebe erhöhte *GLI3*-Expression aufweist (1,7-fach), zeigt KMN 174 (Spur 8) eine verminderte Expression von *GLI3* relativ zu fetalem Nierengewebe (0,7-fach). Diese Expressionsstärke ist vergleichbar der in adultem Nierengewebe (Spur 1). Auch in den untersuchten WT-Geweben (Gewebe 4-6) zeigt sich kein einheitliches Bild der *GLI3*-Transkription: Zwei der Wilmstumorgewebe (WT43 [Spur 4] und WT98 [Spur 5]) zeigen eine leicht erhöhte, eines hingegen (WT105 [Spur 6]) eine verminderte *GLI3*-Expression im Vergleich zu fetalem Nierengewebe. Der direkte Vergleich von Tumorgeweben und adultem Nierengewebe macht deutlich, dass hier in 66% der Fälle (in 4 von 6 Tumorgeweben) eine erhöhte *GLI3*-Expression festzustellen ist.

3.2.7.2 Untersuchungen zur Expression von Mitgliedern der sonic hedgehog (SHH) Signaltransduktionskaskade

Zusammen mit den Proteinen GLI1 und GLI2 bildet GLI3 eine Familie von Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren, die eine große Übereinstimmung in ihrer DNA-Bindungsdomäne aufweisen (vgl. Kap. 4.3.5). *GLI1* wurde 1987 von Kinzler und Mitarbeitern als stark exprimiertes Gen in einem Glioblastom identifiziert und kloniert. In der Literatur sind *GLI1* und *GLI3* als mögliche Onkogene beschrieben (Ruiz i Altaba, 1999). Funktionell werden die GLI-Genprodukte in die SHH-Signaltransduktionskaskade als Transkriptionsfaktoren eingebunden. Die Tatsache, dass Mutationen in anderen Genen dieser Signaltransduktionskaskade, *SMOH* und *PTCH*, als ursächlich für das Basalzellkarzinom identifiziert wurden, legt eine Analyse der Expression verschiedener Gene des SHH-Signaltransduktionswegs in WT-Gewebe nahe. Zu diesem Zweck wurden die auf ihre *GLI3*-Expression untersuchten Gewebe auf die Expressionsstärke der Gene *patched (PTCH)*, *smoothened (SMOH)* und *insuline-like growth factor 2 (IGF2)* (vgl. Abb. 4.10 in Kap. 4.3.5) untersucht. Abbildung 3.49 zeigt die Autoradiogramme der gelelektrophoretisch aufgetrennten Produkte quantitativer RT-PCR-Experimente.



Abbildung 3.49: Autoradiogramme gelelektrophoretisch aufgetrennter Produkte radioaktiver RT-PCR-Reaktionen zur Quantifizierung der relativen Expressionsstärke von *PTCH*, *SMOH*, *IGF2*. Die Probenentnahme erfolgte nach der rechts für die verschiedenen Gene angegebenen Amplifikationszyklen. Als template für die radioaktive PCR wurden jeweils gleiche cDNA-Volumina derselben Erststrangsynthese-Reaktionsansätze wie für β -Aktin und *GLI3* verwendet. Die *IGF2*-Signale (unterer Abbildungsteil) der Tumorproben sind (bis auf WT105 in Spur 6) deutlich stärker als die Signale für adultes (Spur 1) und auch fetales Nierengewebe (Spur 2). Für die Gene *PTCH* (oben) und *SMOH* (Mitte) kann keine Gewebekorrelation der Expression festgestellt werden. In den Spuren wurden RT-PCR-Produkte der folgenden Gewebe aufgetrennt: Spur 1= adultes Nierengewebe; 2= fetales Nierengewebe; 3= 146KMN; Spur 4= 43WT; Spur 5= 98WT; Spur 6= 105WT; Spur 7= 82KMN; Spur 8= 174KMN.

Die Quantifizierung der Expression von *PTCH*, *SMOH* und *IGF2* lieferte die in Abbildung 3.50 dargestellten Ergebnisse.

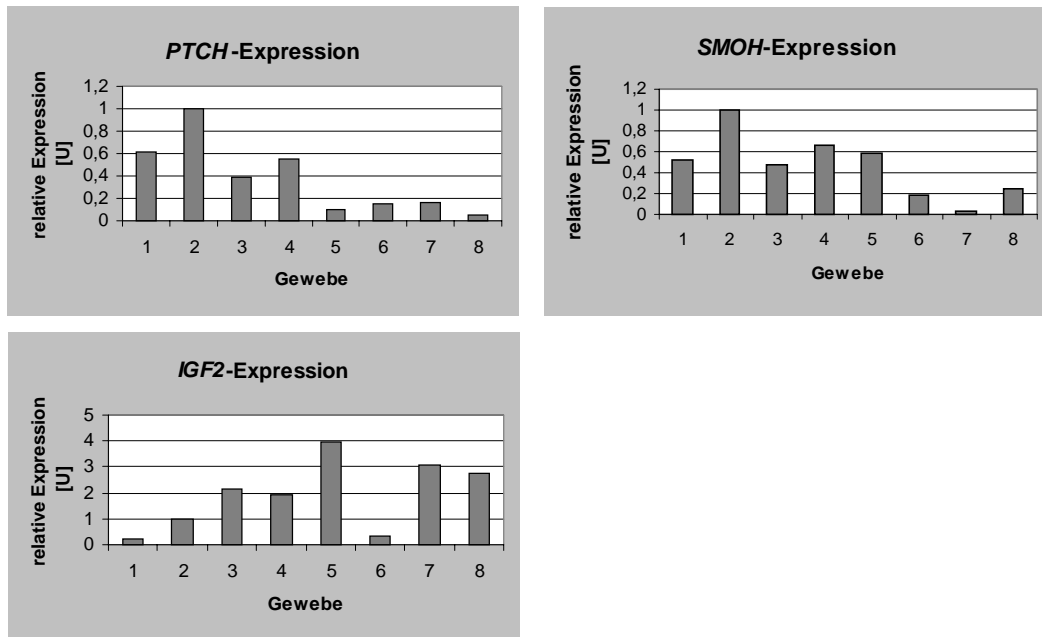


Abbildung 3.50: Grafische Darstellung der Expressionsquantifizierung von *PTCH*, *SMOH* und *IGF2*. Die Expressionsstärke der verschiedenen Gene in den untersuchten Geweben (relativ zur Expression in fetalem Nierengewebe; Gewebe Nr. 2) ist gezeigt. Eine gewebespezifische Expressionsstärke der Gene *PTCH* und *SMOH* ist nicht zu beobachten. *IGF2* (links unten) hingegen zeigt in 5 von 6 Tumorgeweben eine z.T. stark erhöhte Expression (bis zu 4-fach [Gewebe 5; 105WT]) im Vergleich zum fetalen Nierengewebe. Einzelheiten s. Text. Die Nummerierung der Gewebe entspricht derjenigen in Abb. 3.49.

Der Vergleich der Expressionsprofile der untersuchten Gene zeigt keine generelle Gewebespezifität für die Hoch- oder Herunterregulation. Greift man sich jedoch einzelne Gewebe/Gene heraus, so finden sich doch evtl. interessante Expressionsverhältnisse.

So zeigt sich, dass alle Tumorgewebe, die eine dem fetalen Nierengewebe vergleichbare oder eine stärkere *GLI3*-Expression aufweisen, auch eine deutlich erhöhte *IGF2*-Expression (doppelt bis viermal so hoch wie in fetaler Niere) besitzen (Tumorgewebe 3, 4, 5, 8). Außerdem ist festzustellen, dass in den Geweben, in denen eine nennenswerte Expression von *PTCH* oder *SMOH* nachzuweisen ist (einer der beiden relativen Expressionswerte $\geq 0,25$; Gewebe 1-5, 8), die Menge an *IGF2*-mRNA mit dem Quotienten aus relativer *SMOH*-Expression zu relativer *PTCH*-Expression (SPQ) korrelierbar ist: Ist dieser Wert größer 1 (d.h. $SMOH > PTCH$; dies gilt für die Gewebe 3, 4, 5 und 9), so ist auch eine gegenüber fetalem Gewebe erhöhte *IGF2*-Expression zu beobachten. Dabei zeigen die Gewebe 5 und 9, die einen relativ großen *SMOH:PTCH*-Quotienten von ca. 6 aufweisen, auch die stärkste *IGF2*-Expression. Gewebe 3 und 4, die einen nur leicht über eins liegenden Wert für SPQ besitzen, zeigen ebenfalls eine gegenüber fetalem Nierengewebe gesteigerte *IGF2*-Transkriptmenge, die aber lediglich im Bereich von Faktor zwei zu finden ist. In adultem Nierengewebe (Gewebe 1) überwiegt die

relative *PTCH*-Expression die relative *SMOH*-Expression ($SPQ < 1$). Dementsprechend ist *IGF2* in adultem Nierengewebe kaum detektierbar.

Prinzipiell zeigt sich, dass ein Vergleich der Genexpressionprofile aller Gewebe schwierig ist. Eine eindeutige gewebespezifische Verteilung (z.B. WT-Gewebe vs. KMN) der Expression der untersuchten Gene kann nicht festgestellt werden. Für einzelne Tumoren ist es jedoch möglich, anhand bereits aufgeklärter Funktionsbeziehungen von Genprodukten zueinander (z.B. *SMOH* und *PTCH* als direkt interagierende positive bzw. negative Mediatoren des *SHH*-Signaltransduktionsweges; vgl. Abb. 4.10 in Kap. 4.3.5) deren Wirkung (z.B. die Aktivierung eines Zielgenes, wie *IGF2*) zu untersuchen bzw. zu interpretieren. Eine Diskussion über die mögliche Beteiligung des *SHH*-Signaltransduktionswegs an der Pathogenese von Nephroblastomen (oder konnataler mesoblastischer Nephrome) unter Einbeziehung der hier dargestellten Ergebnisse findet sich in Kapitel 4.3.5.

4 DISKUSSION

Durch zahlreiche molekular- und zytogenetische Analysen wurden in den vergangenen Jahren verschiedene chromosomale Loci identifiziert, die mit der Wilmstumorgnese gekoppelt sind. Dabei gelang 1990 die Klonierung des bisher einzigen Wilmstumorgens, *WT1* (Call *et al.*, 1990; Gessler *et al.*, 1990). Neben diesem in 11p13 lokalisierten und in Tumorpatienten von Mutationen betroffenen Gen konnten weitere mit der Erkrankung gekoppelte Chromosomen bzw. chromosomale Regionen ausgemacht werden. Dabei handelt es sich um die chromosomalen Bereiche 11p15 (WT2), 1p, 1q, 3q, 4q, 5q, 7p, 7q, 9p, 9q, 11q, 12p, 12q, 16q, 17q, 19q, 20p (Altura *et al.*, 1996; Mitelman *et al.*, 1997; Mertens *et al.*, 1997, Little und Wells, 1997; Löbber *et al.*, 1998; vgl. Kap. 1.2.1). Die Fülle der betroffenen chromosomalen Loci mit signifikanter Assoziation zum Nephroblastom legt nahe, dass eine rein positionelle Klonierungsstrategie für die Identifikation von Wilmstumor Kandidatengenen schwierig zu realisieren ist. Tumorzellen dieses genetisch wie histologisch heterogenen Malignoms weisen häufig viele verschiedene chromosomale Aberrationen auf. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Dissertation eine Strategie verfolgt, die zunächst die Isolation differenziell exprimierter Transkripte während der Nierenentwicklung und/oder der Wilmstumorgnese vorsieht. Ihr Potenzial, als Kandidatengen zu gelten, wurde im Anschluss durch Zuordnung zu chromosomalen Bereichen abgeschätzt (also eine Art „reverser positioneller Kandidatengenansatz“ oder „*expression candidate approach*“). Neben der Identifikation neuer differenziell exprimierter Gene wurde die transkriptionelle Regulation des *WT1*-Gens genauer untersucht. Dabei stand (neben der Etablierung der angewandten Techniken Gelretardationsanalyse und Reportergenanalyse) die Untersuchung der zelltypspezifischen Transkriptionsregulation von *WT1* in Nierenzelllinien im Vordergrund.

4.1 Untersuchungen zur transkriptionellen Regulation des *WT1*-Gens

Die transkriptionelle Regulation des *WT1*-Gens ist von entscheidender Bedeutung für das Verstehen - zumindest eines Teils - der Wilmstumorgnese. Als einziges bisher beschriebenes Kandidatengen für die Entwicklung eines Nephroblastoms ist seine transkriptionelle Regulation, aber auch die Identifikation von *WT1*-Zielgenen, von besonderem Interesse. So ist zu vermuten, dass *WT1*-regulierende und *WT1*-regulierte Gene für die normale sowie für die pathologisch ablaufende Nierenentwicklung wichtig sind und damit als potenzielle Kandidatengene für den Wilmstumor angesehen werden

können (vgl. Kap. 1.2.1 und 1.3). Durch seine Assoziation mit verschiedenen Leukämien wird *WT1* mittlerweile auch als prognostischer Marker in hämatologischen Erkrankungen verwendet (Inoue *et al.*, 1994; Tamaki *et al.*, 1999; vgl. Kap. 1.3.1).

Die 5'-regulatorische Region des murinen *Wt1*-Gens wurde 1991 erstmals beschrieben (Pelletier *et al.*, 1991). Dies geschah im Rahmen der Expressionsanalysen von *Wt1* im murinen Urogenitalsystem. Die Promotorsequenz ist GC-reich und weist keine der klassischen TATA- oder CAAT-Boxen auf, die in der 5'-regulatorischen Region der Mehrzahl der bekannten Gene gefunden wird. Stattdessen wurden mehrere Konsensuselemente für die Bindung von SP-Faktoren identifiziert, für die neben einer Rolle bei der Transaktivierung auch eine funktionelle Bedeutung für die Positionierung des Transkriptionsinitiationskomplexes an TATA-losen Promotoren demonstriert wurde (Blake *et al.*, 1990). Neben der generellen Stimulierbarkeit des Promotors durch SP1 (Hofmann *et al.*, 1993) wurde von Cohen und Mitarbeitern (1997) die besondere Wichtigkeit einer CTC-Sequenzwiederholung im Bereich -72 bis -64 des *WT1*-Promotors für die Stimulation durch SP1 demonstriert.

Zahlreiche Untersuchungen zur gewebe- und entwicklungsspezifischen Expression haben dazu beigetragen, die transkriptionelle Regulation von *WT1* aufzuklären. Durch Transfektionsanalysen konnten sowohl neue *cis*-Elemente als auch neue in *trans* wirkende Faktoren identifiziert werden, die an der komplexen Transkriptionsregulation mitwirken. So konnten ein stromabwärts des *WT1*-Genlokus lokalisierter *enhancer* (Fraizer *et al.*, 1994) und ein in Intron drei gelegener *enhancer* identifiziert werden (Zhang *et al.*, 1997). Beide für die transkriptionelle Regulation von *WT1* wichtigen Regionen werden für die spezifische Expression in hämatopoetischen Zellen verantwortlich gemacht, wofür auch das Vorliegen von Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren GATA-1 und c-Myb (Transkriptionsfaktoren, die eine Rolle in der Hämatopoese spielen; Pevny *et al.*, 1995; Shen-Ong, G. L. C., 1990) spricht.

Über die *WT1*-Expression während der Entwicklung des Urogenitalsystems konnten wichtige Befunde bezüglich der transkriptionellen Regulation von *WT1* aus Promotoranalysen gewonnen werden. So wurde nachgewiesen, dass der Promotor vom Genprodukt selbst gebunden werden kann und dass diese Bindung zu einer Repression des *WT1*-Promotors führt (Autoregulation der *WT1*-Expression). Dieser negative Rückkopplungsmechanismus wird u.a. für die Herunterregulation der *WT1*-Expression im differenzierten Nephron verantwortlich gemacht (Rupprecht *et al.*, 1994).

Desweiteren sind die entwicklungspezifisch exprimierten Mitglieder der *paired box*-Transkriptionsfaktorfamilie PAX-2 und PAX-8 als Regulatoren der *WT1*-Transkription beschrieben (Dehbi *et al.*, 1996; Dehbi und Pelletier, 1996). Zusammen mit Ergebnissen aus vergleichenden Analysen der Expression von PAX-2, PAX-8 und WT1 während der Nierenentwicklung und in Wilmstumoren (Eccles *et al.*, 1995) wurde ein Modell entwickelt, nach dem PAX-2 und PAX-8 die *WT1*-Expression beim Mesenchym-Epithel-Übergang des metanephrischen Blastems induzieren. Während WT1 in den Zellen der charakteristischen S- und kommaförmigen Strukturen PAX-2 wieder herunterreguliert, scheint in diesem Stadium PAX-8 ausschlaggebend für die Aufrechterhaltung der *WT1*-Expression zu sein. Die zeitlich spätere Herunterregulation der *WT1*-Expression in den Zellen der reifen Glomeruli ist – nach diesem Modell - auf eine abnehmende PAX-8 Expression zurückzuführen, so dass in dieser Phase die Repression der eigenen Transkription durch WT1 selbst dominiert (vgl. Abb. 4.1).

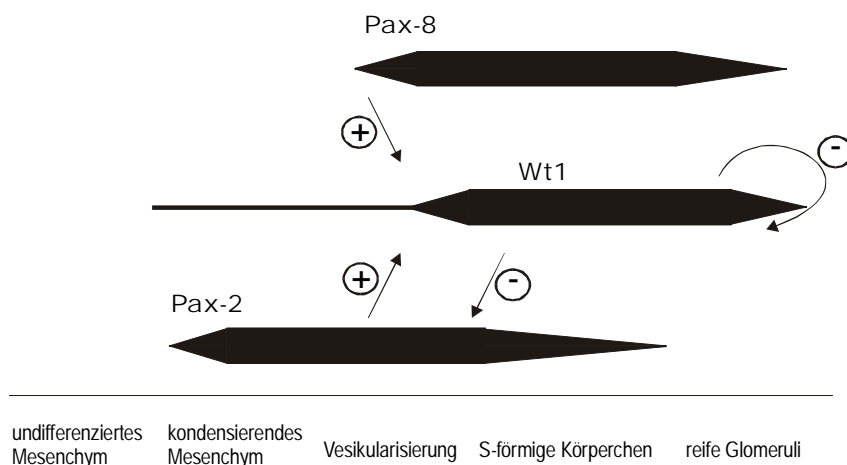


Abbildung 4.1: Zeitliches Expressionsprofil der Proteine Pax-2, Pax-8 und Wt1 während der Metanephrogenese (nach Dehbi und Pelletier, 1996). Die Expressionsstärke des jeweiligen Proteins wird durch die Stärke des entsprechenden Striches symbolisiert. Pfeile markieren die Wirkungen der Proteine auf die Transkription des jeweiligen Zielgens (+:= transkriptionelle Aktivierung; -:= transkriptionelle Repression). Die Phasen der Nierenentwicklung, in denen die jeweilige Expression beobachtet werden kann, sind am unteren Bildrand angedeutet (Einzelheiten s. Text).

Neben diesen Transkriptionsfaktoren gibt es Daten zur Regulation von *WT1* durch das NF κ B-Genprodukt (es aktiviert den *WT1*-Promotor; Dehbi *et al.*, 1998) und einen weiteren, nicht näher charakterisierten Faktor (der vermutlich als Transaktivator wirkt; Discenza *et al.*, 1997).

Interessanterweise überlappen viele Bindungsstellen der als kritisch für die *WT1*-Regulation beschriebenen Transkriptionsfaktoren mit Bindungsstellen für SP-Proteine

(Dyran und Tjian, 1983; Kadonaga *et al.*, 1987; Hagen *et al.*, 1992; Kingsley und Winoto, 1992). Dieser Überlappung mit den entsprechenden Faktorbindungsstellen konnte zum Teil eine funktionelle Relevanz für die *WT1*-Expressionsregulation zugewiesen werden (Discenza *et al.*, 1997). Die Regulation verschiedener Promotoren durch eine synergistische Wirkung von SP1 mit zahlreichen anderen Transkriptionsfaktoren wurde bereits beschrieben (Perkins *et al.*, 1993 in Dehbi 1998; Lin *et al.*, 1996; Karlseder *et al.*, 1996; Mukhopadhyay *et al.*, 1997).

Der Frage der Regulierbarkeit des *WT1*-Promotors durch SP-Faktoren wurde in der vorliegenden Dissertation durch Kotransfektionsexperimente von *WT1*-Promotorkonstrukten und SP-Expressionsplasmiden nachgegangen (vgl. Kap. 3.1.2, Abb. 3.8). Dabei konnte festgestellt werden, dass SP1 die Transkription am *WT1*-Promotor stark stimuliert (zwischen 4,3-fach und 12,8-fach; Abb. 3.8). Diese Beobachtung deckt sich mit den zuvor gemachten Befunden anderer Arbeitsgruppen (Hofmann *et al.*, 1993 und Cohen *et al.*, 1997). Die Frage, inwieweit SP3, ein anderes Familienmitglied der SP-Proteinfamilie mit reprimierenden Eigenschaften (Hagen *et al.*, 1994; De Luca *et al.*, 1996), den *WT1*-Promotor beeinflusst, wurde durch Kotransfektionsstudien der gleichen Promotorkonstrukte mit einem SP3-Expressionsplasmid angegangen. Hier zeigte sich, dass SP3 die transkriptionelle Aktivität der verwendeten Promotorkonstrukte nicht bzw. kaum beeinflusst (transkriptionelle Stimulation zwischen 1,1- und 1,5-fach [vgl. Abb. 3.8] bei nachgewiesener Bindung von SP3 an entsprechende Konsensuselemente des *WT1*-Promotors [vgl. Kap. 3.1.1]). In weiterführenden Experimenten konnte erstmals demonstriert werden, dass SP3 in der Lage ist, die SP1-vermittelte Aktivierung des *WT1*-Promotors zu reprimieren (SP3-bedingte Reduktion der SP1-vermittelten Stimulation des *WT1*-Promotors um 75%; vgl. Abb. 3.9 in Kap. 3.1.2). Diese Ergebnisse sind im Einklang mit den ebenfalls im Rahmen der vorliegenden Dissertation durchgeführten Bindungsanalysen von SP1 und SP3 (vgl. Kap. 3.1.1). Hier konnte eine eindeutige Korrelation zwischen SP1- und SP3-Bindungsaktivität in Kernextrakten von *WT1*-exprimierenden und nicht-exprimierenden Zelllinien festgestellt werden (vgl. Abb. 3.5 in Kap. 3.1.1): Kernextrakte von 293-Zellen (sie exprimieren *WT1*) enthalten bei vergleichbarer SP1-Bindungsaktivität deutlich weniger SP3-Bindungsaktivität als Kernextrakte von WCCS1-Zellen (sie exprimieren kein *WT1*). Zusammengenommen sind die vergleichenden Untersuchungen der SP1- und SP3-Rolle am *WT1*-Promotor von funktioneller Bedeutung, legen sie doch die Vermutung nah, dass das Mengenverhältnis

von SP1 und SP3 entscheidend für die transkriptionelle Aktivität des *WT1*-Promotors ist. Für die epitheliale Differenzierung konnte in anderen experimentellen Systemen gezeigt werden, dass das SP1:SP3-Mengenverhältnis charakteristischen Veränderungen unterworfen ist, was wiederum funktionelle Konsequenzen für SP-Faktor regulierte Promotoren hat, so z. B. für den E6-Promotor des humanen Papillomvirus 16 (HPV16). Für dessen Expression wird angenommen, dass die Aktivierung der HPV-Transkription in den differenzierten Epithelzellen der Oesophagusschleimhaut auf das hohe SP1:SP3-Mengenverhältnis in diesen Zellen zurückzuführen ist (Apt *et al.*, 1996). Dieses Verhalten, das einen funktionellen Antagonismus von SP1 (transkriptionelle Aktivierung von Zielgenen) und SP3 (transkriptionelle Repression von Zielgenen) widerspiegelt, wird auf die Konkurrenz zwischen den beiden Familienmitgliedern SP1 und SP3 zurückgeführt (Hagen *et al.*, 1994; Dennig *et al.*, 1995, 1996). Inwieweit der SP1-SP3-Antagonismus funktionell für die *WT1*-Expression im Rahmen der Nierenentwicklung eine Rolle spielt, muss noch näher untersucht werden. Die Quantifizierung der SP1- und SP3-Bindungsaktivität in Proteinextrakten präpariert aus fetalem und adultem Nierengewebe könnte nähere Aufschlüsse über die Relevanz der ermittelten Ergebnisse geben.

Neben der allein für die SP-Faktoren aufgezeigten Bedeutung für die Transkriptionskontrolle des *WT1*-Promotors sind auch weiterführende Experimente bezüglich einer Kooperativität von SP-Faktoren und bereits beschriebenen *WT1*-Regulatoren (s.o.) denkbar. Da SP1 in verschiedenen Experimenten zuvor trotz seiner ubiquitären Expression eine wichtige Funktion bei der signalinduzierbaren und bei der zellzyklusspezifischen Transkriptionskontrolle nachgewiesen werden konnte (Robbins *et al.*, 1990; Datto *et al.*, 1995; Nakano *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1995; Lin *et al.*, 1996), sind Experimente, die einer solchen Fragestellung bezüglich der *WT1*-Expressionsregulation nachgehen, sinnvoll. Erste Voruntersuchungen wurden im Rahmen der beschriebenen Promotionsarbeit bereits durchgeführt. So wurde der Einfluß von TGF β 1 auf die Aktivität des *WT1*-Promotors in transient transfizierten 293-Zellen untersucht (Daten nicht gezeigt). Da Mitglieder der TGF β -Familie als wichtige Signalmoleküle bei Prozessen der Metanephrogenese identifiziert wurden (Vukicevic *et al.*, 1996), erschien ein solcher Versuchsansatz sinnvoll, es konnten allerdings keine Effekte von TGF β 1 auf die *WT1*-Promotoraktivität unter den gewählten Bedingungen festgestellt werden.

Im Rahmen der in Kapitel 3.1.1 beschriebenen Gelretardationsanalysen konnte eine neue, bisher noch nicht identifizierte SP1/SP3-Bindungsstelle identifiziert werden, die eine

GT-Box-ähnliche Nukleotidsequenz aufweist (vgl. Abb. 3.1 und 3.3 in Kap. 3.1.1). Vergleichbare Promotorelemente wurden in verschiedenen Promotoren (z.B. von *cMYC* und *cFOS*) gefunden, die einer transkriptionellen Regulation durch das Retinoblastomprotein (pRB) unterliegen (man bezeichnet sie daher auch als *retinoblastoma control element*, RCE; Robbins *et al.*, 1990; Pietenpol *et al.*, 1990). Den RCEs dieser Promotoren wird die Vermittlung einer zelltypabhängigen Aktivierung oder Repression der nachgeschalteten Proteine zugeschrieben (Kim *et al.*, 1991). Neben RB erkennen und binden die Proteine SP1 und SP3 die RCE-Sequenzen (Udvardia *et al.*, 1992, 1993, 1995). Dabei kommt es zu einem als „Superaktivierung“ bezeichneten Phänomen, das die transkriptionelle Stimulation der SP-Faktor-vermittelten Transaktivierung durch RB beschreibt (Chen *et al.*, 1994; Kim *et al.*, 1992; Udvardia *et al.*, 1993). Da der *WT1*-Promotor eine starke Regulation durch SP-Faktoren erfährt (s.o.) wurde in der vorliegenden Arbeit der Frage nachgegangen, inwieweit auch die *WT1*-Expression durch RB reguliert ist. Ein funktioneller Zusammenhang zwischen WT1 und dem Retinoblastomgenprodukt wäre von besonderem Interesse, da Struktur und Funktion von RB gut untersucht sind und konkrete Wirkmechanismen für RB in der Tumorgenese beschrieben wurden (Übersichtsartikel: Weinberg, 1995; Hanahan und Weinberg, 2000). Um eine mögliche Regulation von *WT1* durch RB zu untersuchen, wurden Reporteranalysen am *WT1*-Promotor bei gleichzeitiger Kotransfektion von SP1- und/oder RB-Expressionsplasmiden in WCCS1-Zellen durchgeführt (vgl. Kap. 3.1.2). Sie zeigten eine starke synergistische Aktivierung der Luciferaseaktivität durch SP1 und RB (ca. 6-fache Stimulation der Promotoraktivität durch SP1 und RB gegenüber einer 1,8- bzw. 1,6-fachen Stimulation bei Kotransfektion gleicher Mengen von SP1 bzw. RB allein; vgl. Abb. 3.10 in Kap. 3.1.2). Allerdings wurde der gleiche Effekt auch am Luciferase-Reportervektor ohne *WT1*-Promotorsequenzen beobachtet. Daher kann ein promotorspezifischer Effekt ausgeschlossen werden. Zusammen mit der Beobachtung, dass die mit SP1 und RB kotransfizierten Zellen sehr stark proliferierten, sprechen die Daten eher für einen globalen Effekt auf die transfizierten Zellen. Dieser Effekt könnte von der Stimulation der endogenen RB-regulierten Protoonkogene *cFOS* und *cMYC* herrühren (Robbins *et al.*, 1990; Pietenpol *et al.*, 1990). In den Originalpublikationen ist ein solcher globaler Effekt auf die Proliferation der transfizierten Zellen allerdings nicht beschrieben. Damit wäre es sicherlich interessant zu untersuchen, inwieweit die beobachtete Induktion der zellulären Proliferation spezifisch für die verwendete WT-Zelllinie WCCS1 ist. Die zelltypspezifische Aktivierung des *WT1*-Promotors wurde durch komparative

Reportergenanalysen der angefertigten Deletionsreihe des *WT1*-Promotors (vgl. Abb. 3.6 in Kap. 3.1.2) in *WT1*-exprimierenden (293-Zellen) und nicht-exprimierenden Zellen (WCCS1-Zellen) untersucht. Innerhalb dieser Experimente konnte nachgewiesen werden, dass die Deletion von *WT1*-Promotorsequenzen stromaufwärts der XbaI-Schnittstelle zu einer reproduzierbar auftretenden Verstärkung der Promotoraktivität in beiden untersuchten Zelllinien führt (vgl. Abb. 3.7 in Kap. 3.1.2). Dabei war die signifikante Steigerung der Promotoraktivität in den *WT1*-exprimierenden 293-Zellen bei Deletion der Nukleotide zwischen nt -660 (PvuI-Fragment) und nt -511 (XbaI-Fragment) zu beobachten. Im Gegensatz dazu verlief die Steigerung zur maximalen Promotoraktivität in der WCCS1-Zelllinie über zwei Aktivitätsstufen: Eine den 293-Zellen vergleichbare Aktivität wurde bei Deletion der Promotorsequenzen zwischen der XhoI- (-1,8 kbp) und der SacI-Schnittstelle (-1,1 kbp) erreicht. Der zweite Promotoraktivitätssprung erfolgte, wie auch in den 293-Zellen, nach Deletion der Sequenzen zwischen der PvuI- und der XbaI-Schnittstelle. Gründe für die beobachteten Luciferaseaktivitätssteigerungen bei Deletion von Promotorsequenzen können Bindungsstellen reprimierend wirkender Transkriptionsfaktoren in den entsprechenden Regionen sein. Da diese Effekte reproduzierbar auftraten und auch in den Publikationen anderer Arbeitgruppen gefunden werden (Campbell *et al.*, 1994; Dehbi und Pelletier, 1996; Dehbi *et al.*, 1996), stellt sich die Frage, inwieweit Repressoren der *WT1*-Transkription, die diese Abschnitte des *WT1*-Promotors binden, in den verschiedenen Zelllinien zu finden sind. Die durch Transfektion in WCCS1-Zellen ermittelten Daten sprechen für zwei relevante Bereiche des *WT1*-Promotors, die eine Repression vermitteln können. In Abbildung 4.2 sind die Ergebnisse der angesprochenen komparativen Promotoraktivitätsanalysen schematisch dargestellt.

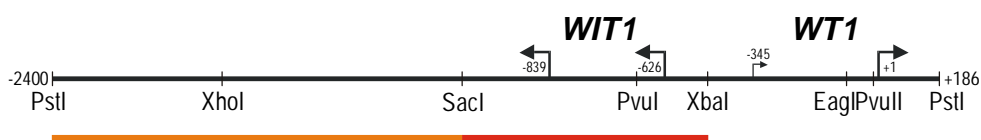


Abbildung 4.2: Schematische Darstellung des *WT1*-Promotors (Deletionsreihe) und Aktivitätsverteilung. Der *WT1*-Promotor ist als horizontale schwarze Linie dargestellt. Die Restriktionsschnittstellen, die zur Generierung der Deletionsreihe des *WT1*-Promotors verwendet wurden, sind eingezeichnet. Pfeile markieren die Transkriptionsstarts von *WT1* und dem in *antisense*-Orientierung transkribierten Gen *WT1* (Positionen aus Campbell *et al.*, 1994). Die Promotorsequenzen stromaufwärts der XbaI-Schnittstelle, die bei Transfektion in Nierenzelllinien offensichtlich inhibitorisch auf die Promotoraktivität wirken, sind rot dargestellt. Die unterschiedlich ausgeprägte reprimierende Aktivität dieser Sequenzen in den verschiedenen Zelllinien (293-Zellen bzw. WCCS1-Zellen) ist durch die Farbabstufung angedeutet. Einzelheiten s. Text.

Eine alternative Interpretation der geschilderten Kotransfektionsexperimente in den Zelllinien wird durch die Einbeziehung der *antisense*-Transkription, die am *WT1*-Promotor von verschiedenen Arbeitsgruppen untersucht und beschrieben wurde, ermöglicht (Huang *et al.*, 1990; Hofmann *et al.*, 1993; Campbell *et al.*, 1994; Eccles *et al.*, 1994; Hewitt *et al.*, 1996). So konnte gezeigt werden, dass Teile des *WT1*-Promotors bidirektional wirken und vermutlich die Transkription eines als *WIT-1* bezeichneten Gens (centromerwärts von *WT1* innerhalb von 1kb lokalisiert; Transkriptionsrichtung Tel → Cen, d.h. in *antisense*-Orientierung zum *WT1*-Gen; vgl. Abb. 4.2) regulieren. Eine gekoppelte Regulation von *WT1* auf transkriptioneller (bidirektional wirksamer Promotor) wie auch auf translationeller Basis (überlappende *antisense*-Transkripte im Bereich von *WT1* Exon 1) durch *WIT-1* wird diskutiert (Eccles *et al.*, 1994; Campbell *et al.*, 1994). Diese Effekte sind als Ursache für die schwächere Aktivität der langen *WT1*-Promotorkonstrukte denkbar. Die stufenweise Deletion des 5'-Bereichs könnte dabei sukzessive zum Wegfall von selektiv für die *WIT-1*-Transkriptionskontrolle verantwortlichen Transkriptionsfaktorbindungsstellen führen, was sich dann in einer verstärkten Transkription in *WT1*-Richtung (Cen → Tel; in den Versuchen in Kapitel 3.1.2 gemessen als Luciferaseaktivität) ausdrücken würde. Verschiedene Transkriptionsinitiationsstellen von *WIT-1* sind beschrieben, wobei eine davon genau in die relevante Region des *WT1*-Promotors zwischen die PvuI- und die XbaI-Schnittstelle kartiert wurden (vgl. Campbell *et al.*, 1994, darin Abb. 1 A; Abb. 4.2).

4.2 Differential display als Methode zur Untersuchung differenzieller Genaktivität

Mit der Beendigung des internationalen Humangenomprojekts (HGP) wird eine physikalische Karte des Humangenoms mit der genauen Lokalisation und Struktur seiner ca. 80.000 bis 100.000 Gene angefertigt werden können. Überlappend mit dieser Phase der „strukturellen Genomik“, die die komplette Sequenzierung der menschlichen DNA verfolgt, tritt mehr und mehr die funktionelle Analyse der codierten Gene („funktionelle Genomik“) bzw. ihrer Genprodukte („Proteomik“) in den Vordergrund des wissenschaftlichen (und kommerziellen) Interesses (zur Einordnung der Begriffe „funktionelle Genomik“ und „strukturelle Genomik“: Hieter und Boguski, 1997). Die Basis solch funktioneller Analysen ist sicherlich die Aufklärung der zeitlichen (z.B. der entwicklungspezifischen) und räumlichen (z.B. der gewebespezifischen) Expression der im Rahmen des HGP identifizierten Gene (Strachan *et al.*, 1997). Neben Erkenntnissen über die physiologische Funktion der codierten Genprodukte kann die komparative

Untersuchung von Genexpressionsmustern auch Aufschluss über die Ursachen pathologischer Prozesse bei genetisch bedingten Erkrankungen, wie z.B. Krebs, liefern. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde die menschliche Nierenentwicklung in ihrer normal und einer aberrant verlaufenden Form, dem Wilms-Tumor, hinsichtlich differenzieller Genexpressionsprozesse untersucht. Die dazu verwendete Methodik des *differential display* wird im folgenden kurz vorgestellt, mit anderen Methoden zur differenziellen Expressionsanalyse verglichen und ihre Vor- und Nachteile diskutiert.

Die von Liang und Pardee (1992) entwickelte Methode, die ausführlich in Kapitel 2.9 beschrieben ist, basiert auf dem Vergleich repräsentativer cDNA-Fragmentgemische verschiedener RNA-Populationen auf denaturierenden Polyacrylamidgelen. Die cDNA-Fragmentgemische werden dabei durch aufeinanderfolgende Schritte von reverser Transkription (RT) und PCR generiert, wobei die Verwendung radioaktiv markierter Desoxynukleotide den Vergleich der entstehenden Bandenmuster im Anschluß an die Polyacrylamidgelelektrophorese und Autoradiografie ermöglicht. Durch die Verwendung verankerter Oligo-dT-Oligonukleotide in der RT-Reaktion und zusätzlich willkürlich gewählter Dekamer-Oligonukleotide als *primer* wird die Gesamtheit der untersuchten RNAs in Subpopulationen unterteilt, was zu einer überschaubaren Anzahl von cDNA-Banden auf den Autoradiografien führt. Der Isolation, Reamplifikation und Subklonierung der als differenziell exprimiert eingestuften cDNA-Fragmente folgt im Anschluss ihre strukturelle wie funktionelle Charakterisierung (z.B. durch Sequenzierung, Vergleich mit Einträgen der öffentlichen Sequenzdatenbanken, etc.). Die Methode führte bereits häufig erfolgreich zur Klonierung von Genen, die an unterschiedlichsten biologischen Prozessen beteiligt sind. Als Beispiele für die erfolgreiche Anwendung der Technik seien hier, neben den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Genen (u.a. *TM7SF1*; Spangenberg *et al.*, 1998), die Gene *PTI-1* (ein mit Prostatakarzinom assoziiertes Onkogen; Shen *et al.*, 1997), *Smad6* und *Smad7* (zwei Mitglieder der MAD-Familie, die in Endothelzellen exprimiert sind; Topper *et al.*, 1997), sowie *HK2* (ein Kinesin-ähnliches Protein; Debernardi *et al.*, 1997) genannt.

Andere Methoden, die der Identifikation differenziell exprimierter Gene dienen, sind die EST-Sequenzierung, die Klonierung nach subtraktiver Hybridisierung von mRNA-Populationen, die SAGE (*serial analysis of gene expression*)-Technik und die cDNA-Microarray-Hybridisierung (eine ausführliche Beschreibung der Methoden inklusive der Gegenüberstellung von Vor- und Nachteilen findet sich in Carulli *et al.*, 1998).

Das Konzept der EST-Sequenzierung wurde erstmals 1991 beschrieben (Adams *et al.*, 1991). Es basiert auf der Generierung gewebespezifischer cDNA-Bibliotheken und der einzelsträngigen Sequenzierung einer möglichst großen Anzahl von cDNA-Klonen. Dies

liefert eine durchschnittlich 300 Nukleotide umfassende Sequenzinformation für jeden analysierten Klon, die jeweils ein entsprechendes Transkript der für die Herstellung der cDNA-Bibliothek verwendeten RNA-Population als EST (*expressed sequence tag*) repräsentiert. Anhand der Frequenz, mit der solche ESTs in den verschiedenen cDNA-Bibliotheken vorkommen, kann so eine Aussage über die regulierte Expression in den untersuchten Geweben getroffen werden.

Die Methode der Subtraktionshybridisierung bedient sich der selektiven Anreicherung von Transkripten, die nur in einer von zwei zu untersuchenden RNA-Populationen vorhanden sind. Dabei löst die Einführung von PCR-Techniken zur spezifischen Amplifikation solcher Transkripte im Rahmen der *representational difference analysis*-Technik oder der *suppression subtractive hybridization*-Methode das der klassischen subtraktiven Hybridisierung innewohnende Problem der benötigten großen RNA-Mengen.

Die von Velculescu und Mitarbeitern (1995) entwickelte SAGE-Technik basiert auf der Generierung von Bibliotheken kurzer Sequenzabschnitte aus dem 3'-Bereich von mRNAs (sogenannte *tags*). Durch Konkatemisierung und Klonierung in Plasmiden können mit relativ geringem Sequenzieraufwand eine große Zahl dieser *tags* analysiert werden. Da ein *tag* ein Transkript der untersuchten RNA-Population repräsentiert, entspricht die relative Häufigkeit eines *tags* innerhalb einer SAGE-Bibliothek der Expressionsstärke des ihm zugrundeliegenden Transkriptes. Durch Vergleich der *tag*-Zusammensetzung unterschiedlicher SAGE-Bibliotheken können Aussagen über das Vorliegen differenziell exprimierter Transkripte gemacht werden.

Bei der cDNA-*Microarray*-Hybridisierung werden eine große Anzahl bekannter cDNAs (oder Oligonukleotide) auf einem Trägermaterial (z.B. Glas) immobilisiert und im Anschluss mit komplexen cDNA-Sonden verschiedener RNA-Populationen hybridisiert. Die quantitative Auswertung der Hybridisierungssignale ermöglicht die Identifikation differenziell in den untersuchten RNAs auftretender Transkripte, sofern sie in der Gruppe der immobilisierten cDNAs enthalten sind.

Wie aus den Beschreibungen deutlich wird unterscheiden sich alle Methoden zur Isolation differenziell exprimierter Sequenzen in einem Punkt grundlegend von der Technik des *differential display*: Sie alle bieten innerhalb eines Experimentes lediglich die Möglichkeit, bis zu zwei RNA-Populationen miteinander zu vergleichen, während im Rahmen eines *differential display*-Projektes mehrere RNA-Populationen gleichzeitig miteinander verglichen werden können (EST-Projekte liefern gar nur einen Überblick über den Expressionsstatus einer RNA-Population und erst der Vergleich der Ergebnisse verschiedener EST-Projekte miteinander ermöglicht die Identifikation differenziell exprimierter Transkripte). Dieser grundlegende Unterschied war entscheidend für die

Auswahl dieser Methode zur vergleichenden Expressionsanalyse im Rahmen der vorliegenden Arbeit. Die Möglichkeit, mehrere verschiedene RNA-Populationen und damit mehrere Normalnieren- und Nephroblastomgewebe parallel zu vergleichen, ist besonders entscheidend für den Erfolg der vorgestellten Strategie. Bei der direkten Isolation von RNA aus Gewebeproben ist prinzipiell von einer Heterogenität des Gewebes hinsichtlich seiner histologischen Zusammensetzung auszugehen, die sich auf die Repräsentanz verschiedener Transkripte in den verschiedenen RNAs auswirken wird. Methoden, die lediglich zwei Gewebe miteinander vergleichen, können also nicht zwischen der differentiellen Genexpression bedingt durch die regionale Herkunft der Gewebeprobe und der differentiellen Genexpression bedingt durch entwicklungsspezifische oder relevante pathologische Prozesse diskriminieren. Eine solche Selektivität kann natürlich auch nicht zu 100% mit der *differential display*-Methode gewährleistet werden. Allerdings lässt sie, durch den direkten Vergleich mehrerer Proben, ein gewisses Maß an „Normalisierung“ zu, insbesondere wenn bevorzugt solche cDNA-Fragmente isoliert und weiter bearbeitet werden, die spezifische Expressionsmuster zeigen (vgl. Kap. 3.2.2). Neben diesem entscheidenden Vorteil für die Beantwortung der der Arbeit zugrundeliegenden Fragestellungen zeichnet sich die Methode weiterhin dadurch aus, dass sowohl experimenteller Aufwand als auch Anforderungen an die Laborausstattung gegenüber der Mehrzahl der erwähnten Methoden (insbesondere der cDNA-*Microarray*-Hybridisierung und der SAGE-Technik) relativ gering ist. Ferner kann aufgrund der hohen Sensitivität der Methode jeweils von geringen RNA-Mengen ausgegangen werden, was vor dem Hintergrund von begrenzt zur Verfügung stehendem Tumor- und fetalem Nierengewebe einen essenziellen Vorteil gegenüber den übrigen Methoden darstellt.

Die hohe Sensitivität der Methode geht einher mit einem großen Nachteil, der Generierung falsch positiver Signale (d.h. das differenzielle Auftreten von Banden in der Autoradiografie, die aber nicht differenziell exprimierten Transkripten entsprechen). Zur Minimierung dieser falsch positiven Signale wurden verschiedene „Vorsichtsmaßnahmen“ vorgeschlagen, die weitgehend bei der Etablierung der Methode im Labor berücksichtigt wurden (Liang *et al.*, 1993, 1994; Liang und Pardee, 1992, 1995). So wurde die RNA prinzipiell mittels DNase I-Verdau von genomischer DNA-Kontamination befreit und das Vorliegen DNA-freier RNA durch eine PCR mit auf genomischer DNA amplifizierenden *primern* bestätigt (Liang *et al.*, 1993; Liang und Pardee, 1995). Zusätzlich wurde für jedes der untersuchten Gewebe pro *Primerkombination* eine Negativkontrolle (d.h. PCR auf einer nicht revers transkribierten RNA-Probe; vgl. Kap. 2.9.1) angefertigt. Obwohl Banden in den Negativkontrollen nicht zwangsläufig auf eine DNA-Kontamination zurückzuführen sind (Mou *et al.*, 1994) wurden Banden der Positivkontrollen, die in identischer Höhe mit

Banden in den Negativkontrollen waren, generell nicht berücksichtigt. Eine weitere Steigerung der Spezifität zur Vermeidung der Isolation falsch positiver cDNA-Fragmente wurde erreicht, indem pro zu untersuchender RNA-Population zwei reverse Transkriptionsreaktionen durchgeführt wurden, die im Anschluss der radioaktiven PCR unterzogen wurden (vgl. Kap. 2.9.1; Liang *et al.*, 1993). In der Regel wurde eine gleichmäßige Intensität der Banden in den Duplikatansätzen beobachtet. Banden mit gleicher Laufeigenschaft im Gel aber stark unterschiedlicher Intensität wurden für weitere Analysen nicht berücksichtigt. Da gezeigt werden konnte, dass die Spezifität der DNA-Amplifikation im PCR-Schritt des *differential display* mit abnehmender Menge eingesetzter RNA und eingesetzten dNTPs steigt (Liang und Pardee, 1992), wurde im Rahmen eines Optimierungsversuchs zu Beginn der Arbeit die minimal mögliche Menge von RNA und dNTPs, die noch zu einer sinnvollen Anzahl von cDNA-Banden führt, ermittelt (Daten nicht abgebildet). Mit 500ng Gesamtzell-RNA im RT-Ansatz und einer Nukleotidkonzentration von 2 μ M in der radioaktiven PCR wurden in den eigentlichen Experimenten Mengen eingesetzt, die im unteren Bereich der von den Autoren vorgeschlagenen Werte (2 μ g bis 20ng Gesamtzell-RNA, 2 μ M dNTP-Konzentration) liegen und damit eine möglichst hohe Spezifität der Methodik gewährleisten. Neben diesen technischen Kriterien wurde der Vorteil der *differential display*-Methode, mehrere Gewebe (bzw. deren RNA-Populationen) zu vergleichen (s.o.), für die Auswahl von cDNA-Fragmenten ausgenutzt, indem vornehmlich die Isolation von Fragmenten mit spezifischen Expressionsmustern in Korrelation zum untersuchten Gewebetyp (d.h. die Isolation von Banden mit verstärkter oder ausschließlicher Expression in mehreren Tumorgeweben oder mehreren Normalnierengeweben; vgl. Kap. 3.2.2) betrieben wurde. Eine solche Vorgehensweise ermöglicht schon im Autoradiogramm die Detektion solcher cDNA-Fragmente, deren differenzielle Amplifikation durch leicht unterschiedliche Reaktionsbedingungen in den einzelnen Ansätzen hervorgerufen wird.

Trotz der genannten Methoden zur Vermeidung falsch positiver Signale innerhalb der initialen *differential display*-Experimente ist mit dem Auftreten solcher Signale zu rechnen. Daraus ergibt sich zwangsläufig, dass eine Verifikation der als differenziell exprimiert isolierten cDNA-Fragmente (bzw. der zugrundeliegenden Gene) erfolgen muß. Die konventionelle Methode dafür ist nach wie vor die *Northern blot*-Hybridisierung, für deren Durchführung jedoch eine relativ große RNA-Menge (10-20 μ g Gesamtzell-RNA; vgl. Kap. 2.7.4) benötigt wird. Ferner ist eine mehrfache Hybridisierung solcher *blots* mit radioaktiv markierten cDNA-Sonden trotz ständiger Verbesserung der Qualität der im *blot* eingesetzten Membranen (Sambrook *et al.*, 1989; Kenneth *et al.*, 1990) limitiert, so dass nach mehrfacher Verwendung einer Membran keine Hybridisierungssignale mehr zu

erwarten sind. Die Bestätigung der differentiellen Genexpression mittels *Northern*-Hybridisierung erfolgte für die cDNA-Fragmente *IAA1* (das im Rahmen der vorliegenden Arbeit zur Isolation und Charakterisierung des Gens *TM7SF1* führte; vgl. Spangenberg *et al.*, 1998; Kap. 3.2.4), *FE7A1* (das als Teil des *TCF2*-Gens identifiziert und im Rahmen der vorliegenden Dissertation weiter charakterisiert wurde; vgl. Zabel *et al.*, 1998; Kap. 3.2.5) und *146TU10A1* (das als cDNA-Fragment des *GLI3*-Gens identifiziert und weiter charakterisiert wurde; Kap. 3.2.7).

Vor dem Hintergrund der großen Menge isolierter cDNA-Fragmente und der Tatsache, dass nur begrenzte Mengen an Tumormaterial und fetalem Nierengewebe (und damit auch die entsprechenden RNAs) für die Analysen zur Verfügung standen, konnte die Mehrzahl der Fragmente nicht mit dieser Methode verifiziert werden. Aus diesem Grund wurden als Alternativen die Methode der *reverse Northern*-Hybridisierung (vgl. Kap. 2.7.5) und die Methode der semiquantitativen RT-PCR (vgl. Kap. 2.5.2) angewendet, die bereits erfolgreich zur Bestätigung differentiell exprimierter Transkripte verwendet wurden (Zhang *et al.*, 1996, 1997; Martin *et al.*, 1998; Nordqvist und Tohonon, 1997).

Für die *reverse Northern*-Hybridisierung konnte ein experimentelles Protokoll entwickelt werden, dass die gleichzeitige Untersuchung vieler cDNA-Fragmente mit relativ wenig RNA (30 µg je untersuchtem Gewebe) erlaubt. Insgesamt wurden 73 klonierte cDNA-Fragmente, die im Zuge der vergleichenden Genexpressionsuntersuchungen von adultem und fetalem Nierengewebe, sowie später zusätzlich mit RNA aus einer Primärzelllinie ohne funktionelles WT1-Protein (WT128; Löbber *et al.*, 1998) isolierten worden waren, mit dieser Technik untersucht (Projektteil A in Abb. 3.12 in Kap. 3.2.2). Dabei konnte die differentielle Expression von 4 cDNA-Fragmenten (*IAA1*, *FE3C3*, *FE4G1*, *Z5C4*; vgl. Kap. 3.2.3) bestätigt werden. Dies entspricht einem Anteil von 5,5% an der Gesamtzahl der innerhalb dieses Projektteils klonierten cDNA-Fragmente.

Mit Hilfe der Technik der semiquantitativen RT-PCR (sqRT-PCR) wurden die im Rahmen der vergleichenden Genexpressionsuntersuchungen von adultem, fetalem und tumorösem Nierengewebe isolierten cDNA-Fragmente analysiert (Projektteil B in Abb. 3.12 in Kap. 3.2.2). Dies betraf 19 cDNA-Fragmente, die aus der Gruppe von insgesamt 34 klonierten und sequenzierten cDNA-Fragmenten aufgrund ihrer Homologie zu bekannten Genen bzw. zu exprimierten Sequenzen oder aber aufgrund ihres Expressionsmusters für die weiteren Analysen ausgewählt wurden. Von diesen konnten mittels sqRT-PCR-Experimente 13 cDNA-Fragmente als differentiell exprimiert bestätigt werden (vgl. Kap. 3.2.3). Dies entspricht einem Anteil von ca. 38% an der Gruppe der innerhalb dieses Projektteiles der *differential display*-Untersuchungen klonierten cDNA-Fragmente.

Beim Vergleich der Anteile der mit den zwei verschiedenen Methoden verifizierten cDNA-Fragmente an der jeweiligen Gesamtmenge der bearbeiteten Fragmente fällt der mit

38% deutlich höhere Wert bei der sqRT-PCR gegenüber der *reverse Northern*-Technik (5,5%) auf. Er ist u.a. dadurch zu begründen, dass die sqRT-PCR aufgrund der Amplifikation, eine deutlich sensitivere Methode darstellt. Innerhalb der *reverse Northern*-Hybridisierung konnten sicherlich schwach exprimierte Transkripte nicht untersucht werden, was auch durch die beobachtete hohe Zahl von cDNA-Fragmenten mit niedriger Signalintensität in beiden Hybridisierungsansätzen deutlich wurde (Daten nicht abgebildet). Ferner ist zu berücksichtigen, dass die mit sqRT-PCR bestätigten cDNA-Fragmente innerhalb vergleichender Genexpressionsuntersuchungen an acht Geweben (drei adulte Nierengewebe, ein fetales Nierengewebe und vier Tumorgewebe; vgl. Kap. 3.2.2) isoliert wurden. Teile der oben diskutierten Punkte für die Erkennung falsch positiver Signale durch Vergleich mehrerer Reaktionen konnten in diesen Experimenten angewendet werden, während dies in den adultes und fetales Nierengewebe vergleichenden Experimenten nicht möglich war. Diese Erkenntnis macht deutlich, dass der grundlegende Vorteil der *differential display*-Technik gegenüber den übrigen Methoden zur vergleichenden Genexpressionsanalyse, nämlich die parallele Analyse vieler Gewebe innerhalb eines Experiments (s.o.), unbedingt ausgenutzt werden sollte.

Die Entscheidung, welche der oben beschriebenen Methoden zur Identifikation differenziell exprimierter Gene angewendet wird, ist somit stark von der Art der untersuchten Fragestellung abhängig: Soll, wie im vorliegenden Fall, der Genexpressionsstatus mehrerer (heterogener) Gewebe verglichen werden, so ist der Einsatz der *differential display*-Methode sicherlich indiziert. Ein Vergleich der Genexpression z.B. von nur zwei RNA-Populationen (isoliert aus zwei Zelllinien oder zwei Geweben) ist, v.a. vor dem Hintergrund des auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit beobachteten relativ großen Anteils falsch positiver cDNA-Fragmente (90 von 107 oder 84%), mit anderen Methoden vermutlich effizienter auszuführen. In der Zukunft wird sich die cDNA-*Microarray*-Hybridisierung als Hochdurchsatzmethode für die Erstellung von Expressionsprofilen auch für vergleichende Fragestellungen durchsetzen (Übersichtsartikel: Greenfield, 2000). Dies auch insbesondere deswegen, weil zur Zeit vorhandene Nachteile, wie z.B. ihre Sensitivität oder die maximale Klondichte pro „cDNA-Chip“ mehr und mehr in den Hintergrund treten.

4.3 Mittels *differential display* identifizierte Gene und cDNAs

Mit Hilfe des in der vorliegenden Dissertation verfolgten Ansatzes zur Identifikation differenziell während der Nierenentwicklung und/oder der Wilmstumorgene exprimierter

cDNA-Sequenzen konnten insgesamt 17 cDNA-Fragmente isoliert und als differenziell exprimiert bestätigt werden (vgl. Kap. 3.2.3 und 4.2). Die doppelsträngige Sequenzierung und anschließende Datenbankanalyse lieferte Ergebnisse über das Vorhandensein identischer Sequenzen in einer der öffentlich zugänglichen Datenbanken (vgl. hierzu Tab. 3.1 in Kap. 3.2.3).

Neben cDNA-Fragmenten, die Teile bereits bekannter Gene repräsentieren, wurden auch cDNA-Fragmente isoliert, für die zwar homologe Sequenzen in der nicht-redundanten Gendatenbank oder der EST-Datenbank existieren, die funktionell aber nicht näher charakterisiert sind. Ein Teil dieser cDNA-Fragmente konnte durch die Überlappung mit EST-Klonen zu verschiedenen EST-Gruppen zugeordnet werden (sog. *unigene cluster*) (vgl. Tab. 3.1 in Kap. 3.2.3). Ferner wurden cDNA-Fragmente (*FE7A6*, *FE10A3*, *105N6A1*, *146TU6A2*, *151TU6C2*) isoliert, zu deren Sequenz keinerlei homologe Einträge in einer der Datenbanken zu finden waren (vgl. Tab. 3.1 in Kap. 3.2.3). Bei diesen cDNA-Fragmenten handelt es sich vermutlich um Teile neuer, bisher noch nicht im Rahmen der großen EST-Projekte identifizierter Transkripte.

Bis auf eine cDNA konnten alle in Tab. 3.1 aufgeführten Fragmente einem humanen Chromosom zugeordnet werden. Anhand signifikanter Homologien zu Einträgen in der htgs- (htgs:= *high throughput genomic sequence*; diese Datenbank enthält vorab veröffentlichte Einträge unvollständig sequenzierter humangenomischer Sequenzen), der nicht redundanten - oder der *unigene* Datenbank konnte die experimentell ermittelte Lokalisation einiger Fragmente verfeinert und spezifiziert werden. Mit einer Lokalisation auf Chromosom 1 (*FE7A5*, *FE7A6*, *105N10C2*, *146TU6A2*), Chromosom 4 (*FE7A3*; mit Hilfe des STS WI-15717 lokalisiert in 4q26 [GB4-Karte] bzw. 4q31.1-31.2 [G3-Karte]) bzw. Chromosom 12 (*151TU6C2*; mit Hilfe des STS 12-RM96 lokalisiert in 12q13-15) konnte diesen Fragmenten die Lage auf einem in Wilmstumor signifikant von Aberrationen betroffenen Chromosom zugeordnet werden (vgl. Kap. 1.2.1).

Für zwei der in Tabelle 3.1 aufgeführten cDNA-Fragmente (*FE7A3* und *FE7A5*), die keine signifikanten Homologien zu funktionell charakterisierten Genen besitzen, konnte die bekannte Sequenzinformation anhand ihrer Homologie zu Sequenzen in der Datenbank so weit verlängert werden, dass Homologievergleiche und Strukturanalysen auf Proteine durchgeführt werden konnten. Eine kurze Darstellung dieser Ergebnisse (die über die zusammenfassende Darstellung in Tabelle 3.1 hinausgehen) findet sich im Rahmen der Diskussion im folgenden Kapitel (4.3.1).

Da die cDNA-Fragmente *IAA1* (*TM7SF1*), *FE7A1* (*TCF2*), *151WT6A1* (*CDT151*) und *146TU10A1* (*GLI3*) im Rahmen der experimentellen Arbeiten genauer charakterisiert und im Hinblick auf ihre Rolle in der Nierenentwicklung und Wilmstumorgeneese näher

untersucht wurden, findet sich eine gesonderte Diskussion der erhaltenen Ergebnisse in den Kapiteln 4.3.2-5.

4.3.1 Homologievergleiche der Fragmente *FE7A3* und *FE7A5*

Für die Fragmente *FE7A3* und *FE7A5* konnten durch die Homologievergleiche Überlappungen mit EST- bzw. cDNA-Klonen identifiziert werden, die ihre Zuordnung zu *unigene* EST-Gruppen ermöglichte (vgl. Tab. 3.1). Die daraus resultierenden Erkenntnisse über eine mögliche Funktion der den Fragmenten zugrundeliegenden Gene bzw. der entsprechenden Proteine werden im folgenden kurz aufgezeigt und diskutiert.

Aufgrund der Datenbanksuchen konnte das cDNA-Fragment *FE7A3* eindeutig als Teil eines 4554 Nukleotide umfassenden Datenbankeintrages in der nicht redundanten Sequenzdatenbank identifiziert werden (Zugangsnummer AB037821: *Homo sapiens mRNA des KIAA1400 Protein, partielle cDNA*). Dabei befindet sich das im *differential display* isolierte cDNA-Fragment im putativen 5'-UTR der Datenbank-cDNA (Position 132 bis 389; Daten nicht abgebildet). Laut Annotation wurde die KIAA1400-cDNA im Rahmen einer Charakterisierung von im Gehirn exprimierten cDNA-Klonen isoliert und charakterisiert (Nagase *et al.*, 2000). Die Sequenzanalyse des Datenbankeintrages zeigt das Vorliegen eines langen ORF mit stromaufwärts gelegenen *in frame*-Stopcodon (Daten nicht abgebildet). Seine Translation führt zu einem putativen Protein mit 1040 Aminosäuren. Die *in silico*-Strukturanalyse mit verschiedenen Programmen zur Identifikation bekannter Proteinmotive, Transmembrandomänen, posttranslationaler Modifikationsstellen ergab, dass es sich bei KIAA1400 vermutlich um ein Mitglied der Cadherin-Proteinfamilie handelt. Dafür spricht das Vorliegen von sechs Cadherin-Sequenzwiederholungen (eine Konsensussequenz für Cadherin-Sequenzwiederholungen ist in der PROSITE-Datenbank unter der Zugriffsnummer PS00232 abgelegt) in der aminoterminalen Hälfte des putativen Proteins, die charakteristisch für Mitglieder dieser Proteinfamilie sind (identifiziert mit dem SMART-Programm [Schultz *et al.*, 1998; Schultz *et al.*, 2000]). Zusätzlich befindet sich gemäß dieser Strukturvorhersagen carboxyterminal der Cadherin-*repeats* eine Transmembrandomäne (Aminosäuren 716-736), der ein (vermutlich) zytoplasmatischer Anteil des Proteins von ca. 300 Aminosäuren folgt. Abbildung 4.3 zeigt schematisch die vorausgesagte Struktur des aus dem identifizierten ORF abgeleiteten Proteins.

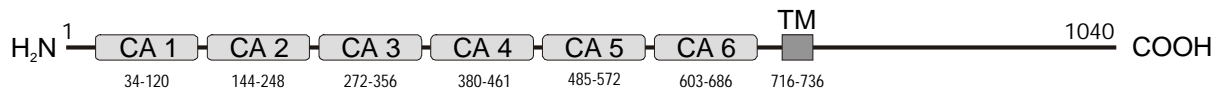


Abbildung 4.3: Schematische Darstellung des aus *FE7A3* abgeleiteten putativen Proteins. Die 1040 Aminosäuren des ORF sind als horizontale schwarze Linie dargestellt. Extrazellulär gelegene Cadherin-Sequenzwiederholungen (CA 1–6) sind als hellgraue Rechtecke dargestellt (ihre Aminosäurepositionen finden sich jeweils unterhalb der Domäne). Die vorhergesagte Transmembrandomäne (TM an Position 716 bis 736) ist als dunkelgraues Rechteck gezeigt. Ein Signalpeptid (Aminosäuren 1 bis 15) ist nicht gesondert markiert.

Die Identifikation eines zur Cadherinfamilie zugehörigen Gens in der vorliegenden Arbeit ist ein interessanter Befund. Mitglieder dieser Proteinfamilie sind verantwortlich für die selektive Kalzium-abhängige Zell-Zell-Adhäsion (Übersichtsartikel: Takeichi 1990). Die Signaltransduktion über Cadherine spielt eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der zellulären Proliferation und Differenzierung. Insbesondere bei der Tumorprogression, so z.B. bei der Invasion und Metastasierung in umliegende Gewebe, die sequenzielle Veränderungen der adhäsiven Eigenschaften von Tumorzellen voraussetzt, verändert sich das Expressionsmuster von Cadherinen und anderen Komponenten der Zelladhäsion (Übersichtsartikel: Glukhova *et al.*, 1995). So korreliert z.B. die fehlende oder sehr schwache Expression von E-Cadherin (epitheliales Cadherin) in Tumorzelllinien mit ihrer Fähigkeit zum invasiven Wachstum und zur Metastasierung (Takeichi 1993; Birchmeier und Behrens, 1994). Zusätzlich konnte dem E-Cadherin (und auch anderen Zelladhäsionsmolekülen) eine wichtige Funktion bei der Epithelialisierung des metanephrischen Mesenchyms während der Nierenentwicklung zugewiesen werden (Ekblom *et al.*, 1986; Klein *et al.*, 1988). Die Tatsache, dass E-Cadherin von WT1 direkt reguliert wird (Hosono *et al.*, 2000) demonstriert die vermutlich mitentscheidende Rolle dieses Zelladhäsionsproteins bei der normalen Nierenentwicklung und der Wilmstumorgene. In Wilmstumoren, wie auch in Karzinomen von Gebärmutterhals, Prostata, Brust, Leberzellen und Dickdarm konnte für E-Cadherin ein Verlust der Heterozygotie (LOH) nachgewiesen werden (Maw *et al.*, 1992; Tsuda *et al.*, 1990; Sato *et al.*, 1990). Für einige dieser Tumortypen wurden Punktmutationen im proteincodierenden Bereich von E-Cadherin beschrieben (Becker *et al.*, 1994; Oda *et al.*, 1994; Risinger *et al.*, 1994; Pierceall *et al.*, 1995; Jankowski *et al.*, 1997), so dass das E-Cadherin als Tumorsuppressorgen klassifiziert wird.

E-Cadherin gehört zu den klassischen Cadherinen, die durch fünf extrazelluläre Cadherin-Sequenzwiederholungen und einen hochkonservierten zytoplasmatischen Carboxylterminus charakterisiert sind. Ihre zytoplasmatische Domäne interagiert mit dem Protoonkogen β -Catenin, das die Cadherinmoleküle über α -Catenin mit dem Zytoskelett verbindet (Aberle *et al.*, 1996; vgl. Abb. 4.4). Neben den klassischen Cadherinen werden

Protocadherine und sog. *cadherin-related neuronal receptor*-Proteine (CNR) zur Cadherin-Proteinfamilie gezählt (Kohmura *et al.*, 1998). Diese Proteine besitzen sechs bis sieben extrazelluläre Cadherin-Sequenzwiederholungen und zeigen nicht den konservierten zytoplasmatischen Carboxylterminus klassischer Cadherine. Für die CNRs ist eine spezifische Wechselwirkung mit der zytoplasmatischen Proteinkinase FYN beschrieben (Kohmura *et al.*, 1998; vgl. Abb. 4.4). Interaktionspartner der zytoplasmatischen Domäne der Protocadherine sind bisher noch nicht bekannt. Unterschiede zwischen den Gruppen der Cadherinfamilienmitgliedern finden sich auch in der genomischen Organisation der verschiedenen Gene. So werden die einzelnen extrazellulären Cadherindomänen klassischer Cadherine in verschiedenen Exons codiert, während Protocadheringene ein Exon besitzen, das die gesamte codierende Region aller Cadherindomänen beinhaltet (Strehl *et al.*, 1998; Wu und Maniatis, 1999). Abbildung 4.4 zeigt die verschiedenen Strukturmerkmale von Mitgliedern der Cadherin-Proteinfamilie, sowie (falls bekannt) deren Interaktionspartner.

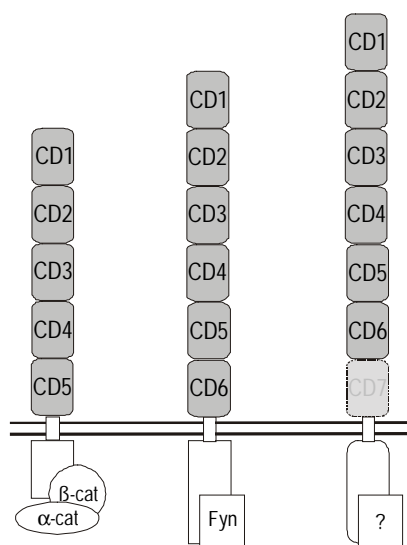


Abb. 4.4: Mitglieder der Cadherin-Proteinfamilie. Klassische Cadherine (ganz links), z.B. E-Cadherin, interagieren über die zytoplasmatischen Proteine α - und β -catenin mit dem Zytoskelett. Für CNRs (Mitte) wurde beschrieben, dass sie mit ihrer zytoplasmatischen Proteinanteilen mit der Proteinkinase Fyn (ein Mitglied der Src-Proteinkinasefamilie) interagieren. Hingegen sind bislang keine zytoplasmatischen Interaktionspartner für Mitglieder der Protocadherin-Subfamilie (rechts) beschrieben. Man beachte die unterschiedliche Zahl extrazellulärer Cadherin-Domänen (CDs) von Mitgliedern der jeweiligen Subfamilie. Die zwischen den Subfamilien ebenfalls variierenden zytoplasmatischen Proteinanteile sind durch verschiedene Formen angedeutet.

Die Anwesenheit von sechs Cadherin-Sequenzwiederholungen in der aminoterminalen Hälfte des putativen Proteins (vgl. Abb. 4.3) und das Fehlen signifikanter Homologien der zytoplasmatischen Domäne zu den klassischen Cadherinen (Daten nicht gezeigt) macht deutlich, dass das *FE7A3*-Fragment wahrscheinlich Teil eines Protocadheringens ist. Eine solche Einordnung wird durch das Vorliegen einer durchgängigen Sequenzidentität im für den extrazellulären Bereich des Proteins codierenden cDNA-Abschnitt von KIAA1400 unterstützt (Daten nicht abgebildet). Kürzlich konnte eine große Zahl humaner CNRs als Gengruppe auf Chromosom 5 (Bande 5q31) kartiert werden (Wu und Maniatis, 1999). Im Rahmen dieser Arbeiten wurde deutlich, dass die codierten Proteine unterschiedliche

aminoternale, extrazelluläre Cadherindomänen und konstante zytoplasmatische Carboxyltermini besitzen. Eine solche Organisation verwandter Gene mit unterschiedlichen adhäsiven Eigenschaften (vermittelt durch die verschiedenen Cadherin-Sequenzwiederholungen) bei ähnlicher Signaltransduktion ins Zytoplasma (vermittelt durch die identischen zytoplasmatischen Proteinanteile) legt ihre koordinierte Expression im Zuge der Entwicklung nah. Inwieweit das dem cDNA-Fragment *FE7A3* zugrundeliegende Gen ebenfalls Bestandteil einer solch großen Gruppe von Genen auf Chromosom 4 ist, kann erst nach vollständiger Sequenzierung von PAC-Klonen aus dieser genomischen Region im Zuge des Humangenomprojekts beurteilt werden.

Die verringerte Expression in Tumorgewebe (vgl. Abbildung 3.14 in Kapitel 3.2.3), die Lokalisation auf dem langen Arm von Chromosom 4 (s.o) in einer Region, die in verschiedenen Wilmstumoren mit familiärem Hintergrund als deletiert beschrieben wurde (Altura *et al.*, 1996), sowie die signifikante Homologie zu Mitgliedern der Cadherin-Proteinfamilie macht *FE7A3* bzw. das korrespondierende Genprodukt zu einem exzellenten Kandidaten für die Wilmstumorgenese. Ein weiterer interessanter Aspekt, der die Relevanz von *FE7A3* für die Wilmstumorgenese verdeutlicht, ist die im Rahmen der vorliegenden Dissertation gemachte Beobachtung, dass *FE7A3* vermutlich von WT1 induziert wird (Daten nicht abgebildet). Die daraus ableitbare transkriptionelle Regulation von *FE7A3* durch WT1 wird gestützt von der Beobachtung, dass keine *FE7A3*-Transkripte in der Wilmstumorzelllinie WT128 (Löbber *et al.*, 1998) detektiert werden können, die endogen kein funktionelles WT1 exprimiert (vgl. Abbildung 3.14 in Kap. 3.2.3).

Die mit der Nukleotidsequenz des cDNA-Fragments *FE7A5* durchgeführten Homologiesuchen führten zur Identifikation einer Gruppe von ESTs, die als *unigene cluster Hs. 155575* in der *unigene*-Datenbank abgelegt sind (vgl. Tab. 3.1 in Kap. 3.2.3). Mittels Homologievergleichen mit Einträgen der EST-Datenbank konnte gezeigt werden, dass das *FE7A5*-Fragment über einen Bereich von 77 Nukleotiden identisch mit der Sequenz verschiedener ESTs innerhalb dieser Gruppe ist (Daten nicht abgebildet). Wie die Abbildung 4.5 erkennen lässt, zeigen die Mitglieder dieses *unigene-clusters* signifikante Homologien (auf Proteinebene) zu verschiedenen Zinkfinger-Genprodukten unterschiedlicher Spezies.

Hs.155575	Homo sapiens
ESTs, Weakly similar to zinc finger protein 3 [H.sapiens]	
SELECTED MODEL ORGANISM PROTEIN SIMILARITIES	
H. sapiens:	PID:g4894364 - zinc finger protein 3 51 % / 63 aa
M. musculus:	SP:Q07230 - ZINC FINGER PROTEIN ZFP-29 50 % / 63 aa
R. norvegicus	SP:Q02975 – RENAL TRANSCRIPTION FACTOR KID-1 41 % / 96 aa
D. melanogaster:	PID:g4104683 - zinc finger motif protein 35 % / 63 aa

Abbildung 4.5: Ausschnitt aus der Annotation zum *unigene*-Datenbankeintrag Hs. 155575.

Besonders hervorzuheben ist hier die Homologie zum Zinkfingerprotein der Ratte, KID-1. Dabei handelt es sich um ein Protein, dessen mRNA vorherrschend in Nierengewebe exprimiert wird (Witzgall *et al.*, 1993). Für dieses Gen konnte gezeigt werden, dass seine Expression im Zuge der Nierenentwicklung stimuliert wird. Das aus dem ORF abgeleitete Protein beinhaltet 13 Cys₂-His₂-Zinkfinger im Carboxyterminalen Bereich und eine KRAB A- und eine KRAB B-Domäne (*Krueppel-associated box*) im aminoterminalen Bereich (Witzgall *et al.*, 1994). Die nierenentwicklungsspezifische Expression und initiale funktionelle Charakterisierungen ergaben für das KID-1-Protein eine mögliche Rolle bei der Nierenzellendifferenzierung und/oder bei der Regulation der Proliferation während der Nierenentwicklung (Witzgall *et al.*, 1993). Inwieweit es sich beim *FE7A5* cDNA-Fragment um den Teil eines ebenfalls nierenentwicklungsspezifisch exprimierten Gens handelt, muss noch geklärt werden. Es ist jedoch klar, dass *FE7A5* nicht Teil des zu KID-1 homologen Gens beim Menschen darstellt, da dieses Gen (*TCF17*) bereits 1997 beschrieben wurde (Omori *et al.*, 1997). Mit seiner Lokalisation in 5q35.3 ist *TCF17* in einer chromosomalen Bande lokalisiert, die mit Nierenzellkarzinomen in Verbindung gebracht wurde (Omori *et al.*, 1997).

Die verstärkte Expression von *FE7A5* in fetalen Geweben (und Tumorgewebe; vgl. Kap. 3.2.3) zusammen mit seiner Lokalisation auf Chromosom 1 im Humangenom legt die weiterführende Charakterisierung des zugrundeliegenden Gens nah. Vor dem Hintergrund, dass die Vermehrung von Material des langen Arms von Chromosom 1 eine der häufigsten chromosomalen Aberrationen in Wilmstumoren ist (Mertens *et al.*, 1997), wird ein die zelluläre Proliferation stimulierendes Protoonkogen dort vermutet. Inwiefern es sich bei der *FE7A5*-cDNA um einen Teil dieses postulierten Protoonkogens handeln könnte, kann nicht abschließend beantwortet werden. Die Homologie zu Proteinen, die über ihre Zinkfingerdomäne DNA binden und evtl. als Transkriptionsfaktor (im Falle von KID-1 sogar als nierenentwicklungsspezifischer Transkriptionsfaktor) wirken können, rechtfertigt unbedingt weiterführende Charakterisierungen von *FE7A5*.

4.3.2 *TM7SF1*

Innerhalb der vorliegenden Dissertation wurden große Teile des humanen Gens *TM7SF1* charakterisiert, das im *differential display* aufgrund seiner verstärkten Expression in adultem Nierengewebe isoliert worden war (vgl. Kap. 3.2.4 und Spangenberg *et al.*, 1998). Neben der Identifikation und Charakterisierung alternativer Spleißformen von *TM7SF1*, die bei Translation zu den Proteinen TM7SF1-L (L für *long*), TM7SF1-I (I für *intermediate*) und TM7SF1-S (S für *short*) führen (vgl. Abb. 3.16 in Kap. 3.2.4.1), wurde auch das murine Homologe, *Tm7sfl*, in der vorliegenden Arbeit kloniert (vgl. Kap. 3.2.4.5) und mit dem humanen Gen verglichen (vgl. Kap. 3.2.4.6 und Diskussion weiter unten in diesem Kapitel).

Strukturanalysen des aus dem längsten identifizierten ORF der humanen cDNA abgeleiteten Proteins zeigen die Präsenz sieben helikaler Transmembrandomänen (HTMDs). Diese wurden aufgrund verschiedener Strukturvorhersageprogramme identifiziert, die unterschiedliche Algorithmen/Kriterien zur Identifikation helikaler Transmembrandomänen (HTMDs) in Aminosäuresequenzen anwenden. Neben dem Programm DAS (Cserzo *et al.*, 1994), das die in Abbildung 3.20 (Kap. 3.2.4.3) gezeigten Ergebnisse zur Lokalisation der Transmembrandomänen liefert, wurden die Programme MOMENT, TOPPRED2 (von Heijne, 1992), PHDhtm, PSA (Stultz *et al.*, 1993; White *et al.*, 1994) und PSORT (Nakai und Kanehisa, 1992; Klein *et al.* 1985) zur Strukturanalyse von *TM7SF1* verwendet. All diese Programme lokalisieren die HTMDs in den Bereich von *TM7SF1* zwischen Aminosäureposition 40 und 313 mit marginalen Unterschieden hinsichtlich ihrer Länge und ihrer Position. Zusammen mit der Tatsache, dass solche Strukturvorhersageprogramme statistisch rund 90-95% der HTMDs korrekt voraussagen (von Heijne, 1992), zeigen die konsistenten Vorhersagen, dass *TM7SF1* mit allergrößter Wahrscheinlichkeit sieben solcher HTMDs innerhalb der proteincodierenden Region aufweist. Abbildung 4.6 zeigt das aus den Vorhersagen abgeleitete Strukturmodell für *TM7SF1*.

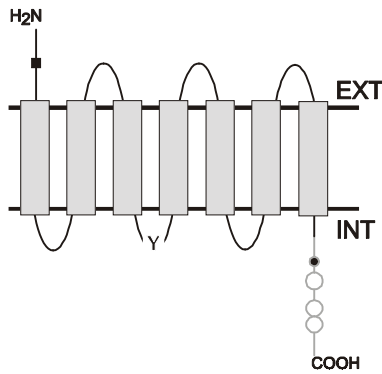


Abbildung 4.6: Schematische Darstellung der TM7SF1-Struktur (Modell). TM7SF1 als Protein der Zellmembran mit sieben helikalen Transmembrandomänen (graue Rechtecke). Der Aminoterminus (H_2N) des Proteins wird als extrazellulär gelegen (EXT), der Carboxyterminus ($COOH$) als intrazellulär gelegen (INT) vorhergesagt. Schwarze Vierecke symbolisieren potenzielle N-gekoppelte Glykosylierungsstellen (Asn26). Putative Phosphorylierungsstellen für Tyrosinkinasen (Y; Tyr154), und Serin/Threoninkinasen (Proteinkinase C, Ser334, schwarzer Kreis; Casein Kinase 2, Ser348/Thr385/Ser389, offene Kreise) sind hervorgehoben. Der in der I-Version von TM7SF1 fehlende zyttoplasmatische Aminoterminus des Proteins ist grau dargestellt.

Das Vorliegen sieben helikaler Transmembrandomänen ist ein charakteristisches Strukturmerkmal G Protein-gekoppelter Rezeptoren (GPCRs; Übersichtsartikel: Strader *et al.*, 1994), so dass TM7SF1 möglicherweise zu dieser Proteinfamilie gezählt werden kann. Nach extrazellulärer Ligandenbindung übertragen GPCRs Signale vom Äußeren der Zelle ins Zytoplasma. Dabei kommt es zu ligandenabhängigen Interaktionen mit trimeren Guaninnukleotid-bindenden Proteinen (G Proteinen). Nach Bindung des spezifischen Liganden und einer daraus resultierenden Konformationsänderung der GPCRs führen Wechselwirkungen mit G Proteinen auf der zytoplasmatischen Seite der Plasmamembran zum Austausch gebundenen Guanosindiphosphats (GDP) gegen das entsprechende Triphosphat (GTP) und zur Dissoziation des trimeren G Proteins in die monomere α -Untereinheit (sie bindet das GTP) und ein Dimer aus den $\beta\gamma$ -Untereinheiten. Die dissoziierten G Protein-Untereinheiten sind es schließlich, die durch ihre Wechselwirkungen mit membranständigen Effektorproteinen (zu ihnen gehören Ionenkanäle für K^+ und Ca^{++} , Adenylatzyklase, Guanylatzyklase, Phospholipase C und A2) die zelluläre Konzentration von *second messenger*-Molekülen verändern und damit die Zellantwort auf das gegebene Signal vermitteln (vgl. Abb. 4.7; Übersichtsartikel über die Signaltransduktion via GPCRs und heterotrimeren G Proteine: Strader *et al.*, 1994; Neer, 1995; Bourne, 1997).

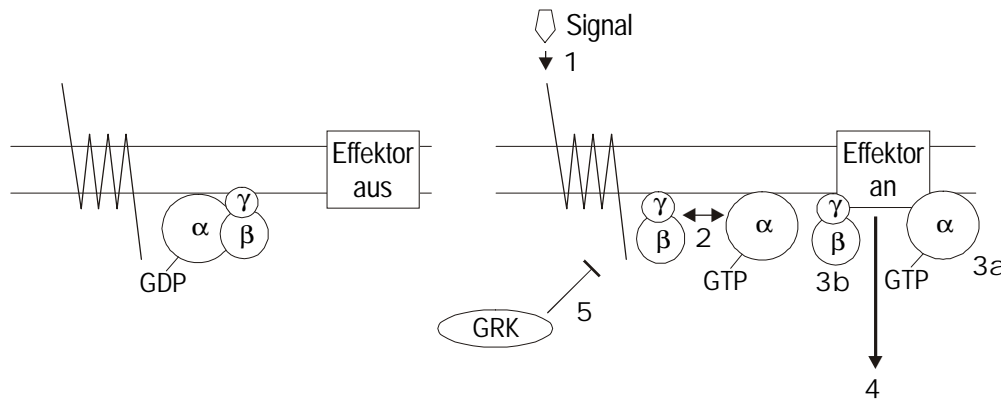


Abbildung 4.7: Funktionsprinzip G Protein-gekoppelter Rezeptoren. Ein GPCR ist schematisch als zickzack-Linie mit sieben Membrandurchgängen durch die Plasmamembran (doppelte horizontale Linie) dargestellt. Bei Abwesenheit eines extrazellulären Signals (linke Hälfte der Abbildung) liegt das G-Protein als Heterotrimer, bestehend aus α -, β - und γ -Untereinheit, vor. Dabei bindet die α -Untereinheit GDP. Der rechte Teil der Abbildung zeigt schematisch die Vorgänge bei der Transduktion externer Signale ins Zytoplasma. Die Bindung des Liganden an den GPCR (1) führt durch Konformationsänderung intrazellulärer Anteile des Rezeptors dazu, dass das GDP der α -Untereinheit gegen GTP ausgetauscht wird. Es kommt zur Dissoziation des G Proteins, wobei die α -Untereinheit (mit gebundenem GTP) und das $\beta\gamma$ -Heterodimer funktionelle Einheiten bilden (2). Sowohl α - (3a), als auch $\beta\gamma$ -Untereinheit (3b) werden dadurch in die Lage versetzt, mit membranständigen Effektorproteinen (z.B. Ionenkanäle, Adenylatzyklase, Guanylatzyklase, Phospholipase C) zu interagieren. Abhängig von der Art der interagierenden G Protein-Untereinheit kommt es zur Aktivierung oder Inaktivierung des Effektorproteins, was zur Veränderung der intrazellulären Konzentration sog. 2^{nd} messenger-Moleküle (z.B. Ca^{2+} -Ionen, cAMP, cGMP, Inositoltriphosphat, Diacylglycerol) führt (4). Sie ihrerseits bewirken die Steuerung zellulärer Prozesse entweder direkt oder über die Beeinflussung der Aktivität von 2^{nd} messenger-Kinasen (z.B. Proteinkinase C, Proteinkinase A). Die Abschaltung dieser Kaskade erfolgt entweder durch Wegfall des exogenen Signals und/oder durch die Aktivität von speziellen G Protein-gekoppelten Rezeptorkinasen (GRKs; s.u.), die durch die Phosphorylierung des Rezeptorproteins die Wechselwirkung zwischen Rezeptor und G Protein unterbinden (5). In beiden Fällen kommt es durch die GTPase-Aktivität der α -Untereinheit zur Hydrolyse von GTP und nachfolgend zur Bildung des inaktiven Heterotrimers aus α - (mit gebundenem GTP), β - und γ -Untereinheit (Zustand links).

Verschiedene weitere Strukturmerkmale sprechen für eine Funktion von TM7SF1 als GPCR. So befindet sich im extrazellulär gelegenen Aminoterminus des Proteins eine Aminosäureabfolge, die der Konsensussequenz für die N-gekoppelte Glykosylierung entspricht (N²⁶DS; vgl. Abb. 4.6). Eine solche posttranslationale Modifikation durch Asparagin-gekoppelte Glykosylierung ist in allen bisher identifizierten GPCRs nachgewiesen worden. Zusätzlich finden sich Konsensussequenzen für die Phosphorylierung von Serin- und Threoninresten im intrazellulären Carboxylterminus von TM7SF1-L. Für andere Mitglieder der GPCR-Proteinfamilie konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung durch Ser/Thr-Proteinkinasen, wie z.B. Proteinkinase A und C und durch spezifische GPCR-Kinasen (GRKs), funktionell von Bedeutung für die Modulation der Signalübertragung durch GPCRs ist (Übersichtsartikel: Lefkowitz, 1993). Die durch GRKs phosphorylierten Serin- und Threoninreste liegen dabei (wie auch die in TM7SF1-L identifizierten putativen Phosphorylierungsstellen; vgl. Abb. 4.6) häufig im carboxyterminalen, zytoplasmatischen Bereich der jeweiligen GPCRs und sind vermehrt

von sauren Aminosäuren umgeben (Haga *et al.*, 1994). Die Folge der Phosphorylierung von GPCRs durch die entsprechenden Proteinkinasen ist die Attenuation oder Inhibition der Signalübertragung. Gegenwärtig wird davon ausgegangen, dass die Phosphorylierung zytoplasmatischer Rezeptorbereiche die Bindung weiterer Proteine an den Rezeptor zur Folge hat, was dann vermutlich in einer sterischen Behinderung der Interaktion von GPCR und G Protein führt (Lefkowitz, 1993). Für den β adrenergen Rezeptor (β AR, ein GPCR) wurde nach Phosphorylierung durch die β AR-Kinase1 (β ARK1, eine GRK) die Bindung eines β -Arrestin Moleküls nachgewiesen, das für die Attenuation der rezeptorvermittelten Signaltransduktion verantwortlich ist (Lohse *et al.*, 1990, 1992). Da es sich bei den verantwortlichen Proteinkinasen z.T. selbst um *second messenger*-regulierte Kinasen handelt, stellt diese Art der Regulation einen negativen Rückkopplungsmechanismus dar. Sie verhindert eine überschießende zelluläre Reaktion auf einen exogenen Stimulus und ist für den generell bei GPCR-abhängigen Signaltransduktionssystemen auftretenden Effekt der Adaption (auch als Toleranz bezeichnet) verantwortlich (Lefkowitz, 1993).

Für *TM7SF1* konnte in der vorliegenden Dissertation gezeigt werden, dass alternativ gespleißte Transkripte vorliegen, deren Translation vermutlich zu verkürzten Proteinen führt. Dabei ist die I-Form des putativen Proteins strukturell wie funktionell besonders interessant. Durch den alternativen Spleiß im 3'-Bereich des ORF fehlt *TM7SF1-I* der komplette zytoplasmatische Carboxyterminus von *TM7SF1-L* (vgl. Abb. 3.20 in Kap. 3.2.4.3 und Abb. 4.6) mitsamt seinen vermutlich regulatorisch wichtigen Phosphorylierungsstellen (s.o.). Alternatives Spleißen ist bei Mitgliedern der Proteinfamilie der GPCRs ebenfalls beschrieben. So zeigen die Rezeptoren für MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein 1*), Prostaglandin E und Substanz P (auch als Neurokinin-1 Rezeptor bezeichnet), analog zu den geschilderten Ergebnissen für *TM7SF1-L* und *-I*, Proteinisoformen mit alternativ gespleißten zytoplasmatischen C-Termini (Fong *et al.*, 1991; Namba *et al.*, 1993; Charo *et al.*, 1994). Für den Prostaglandin E-Rezeptor konnte weiterhin gezeigt werden, dass die aus den alternativen Spleißformen hervorgehenden Rezeptorproteine unterschiedliche zelluläre *second messenger*-Systeme aktivieren (Namba *et al.*, 1993). Eine differenzielle zelluläre Antwort auf Ligandenbindung wurde für die alternativen Spleißformen des Neurokinin-1 Rezeptors in elektrophysiologischen Experimenten an *Xenopus laevis*-Oozyten beobachtet (Fong *et al.*, 1991). Inwieweit die aus alternativem Spleißen resultierenden Proteinformen von *TM7SF1* ebenfalls eine unterschiedliche Kopplungsspezifität zu zellulären Proteinen besitzen, oder ob die Entfernung großer Bereiche des zytoplasmatischen Carboxyterminus in der I-Form das Protein unabhängig von der negativen Regulation durch GRKs und andere Proteinkinasen macht, muss in funktionellen Analysen des Genproduktes untersucht werden. Insbesondere im Hinblick auf die Rolle von *TM7SF1* in der Wilmstumorgengese ist

die im Zuge der vorliegenden Arbeit gemachte Beobachtung interessant, dass fetales Nierengewebe und die Mehrheit der Wilmstumorgewebe eine schwächere Expression der L-Form im Verhältnis zur *TM7SF1-I*-Form aufweisen (Daten nicht gezeigt). Bei unterschiedlicher Kopplungsspezifität der verschiedenen putativen Rezeptorproteine bzw. im Falle einer veränderten Regulation von Effektorproteinen durch die L- und I-Form könnte dieses Verhältnis der Proteine verantwortlich für Differenzierungsvorgänge während der Nierenentwicklung und/oder der Wilmstumorgenesese sein. Ein Projekt (durchgeführt von Dipl. Biol. Stephan Fees im Rahmen seiner Promotion am Fachbereich Biologie der JoGu-Universität Mainz), das die Identifikation von Proteinen, die mit dem Carboxyterminus von *TM7SF1-L* interagieren, zum Ziel hat, sollte erste Anhaltspunkte für die Beantwortung dieser Fragestellung liefern.

Obwohl die aufgeführten strukturellen Charakteristika für Mitglieder der GPCR-Proteinfamilie von *TM7SF1* erfüllt werden, ist eine eindeutige Aussage über die Zugehörigkeit zu dieser interessanten Familie von Signalmolekülen anhand der vorliegenden Daten noch nicht möglich. Neben der strukturellen Voraussetzung (sieben helikale Transmembrandomänen als Charakteristikum) muss für ein Protein, soll es als GPCR klassifiziert werden, der funktionelle Nachweis einer Stimulation des GTP/GDP-Austauschs an G α -Untereinheiten von G Proteinen in Abhängigkeit einer Ligandenbindung erbracht werden (vgl. hierzu auch die „Einführung in die G Proteingekoppelten Rezeptorfamilien“ unter <http://receptor.mgh.harvard.edu/FAMINTRO.html>). Ein Vergleich der *TM7SF1*-Aminosäuresequenz mit Einträgen in der GPCR-Datenbank (unter <http://www.gcrdb.uthscsa.edu>; Kolakowski, 1994) ergab lediglich schwache Homologien zu verschiedenen als GPCR klassifizierten Proteinen (beste Homologie: 20,7% Aminosäureidentität mit dem Secretinrezeptor der Ratte), so dass eine Einschätzung, über welches G Protein *TM7SF1* eine Signaltransduktionskaskade initiieren könnte, schwierig ist. Schwache Sequenzhomologien zwischen Mitgliedern der GPCR-Familie sind jedoch charakteristisch für diese Rezeptorproteine und insofern kein Ausschlusskriterium für *TM7SF1* (vgl. Strader *et al.*, 1994).

In der Vergangenheit wurde die Signaltransduktion über GPCRs mehr oder minder isoliert von der Signaltransduktion über die prominenten Proteinkinasekaskaden (z.B. den MAP-Kinase Signalweg) oder die Signaltransduktion via Steroidhormonrezeptoren gesehen. Die immer genauere Aufklärung der einzelnen Routen, die ein extrazelluläres Signal auf seinem Weg zum Zellkern als zentralem Verarbeitungsort nimmt, zeigt, dass viele Signaltransduktionskaskaden miteinander wechselwirken und sich gegenseitig beeinflussen. So ist auch die Aktivierung des Ras/MAP(*mitogen-activated protein*)-Kinase Signalwegs durch GPCRs beschrieben (Crespo *et al.*, 1994; Übersichtsartikel: Gutkind,

1998; Dikic und Blaukat, 1999). Diese Signaltransduktionskaskade ist wohl der prominenteste und am besten untersuchte Signalweg für die Verarbeitung mitogener Signale (Herskowitz, 1995). Sie vermittelt die zelluläre Proliferation als Reaktion auf die extrazelluläre Wachstumsfaktorsituation. Die Tatsache, dass GPCRs die mitogene Signalübertragung stimulieren und Prozesse wie DNA-Synthese und Proliferation modulieren können, macht Mitglieder der GPCR-Proteinfamilie zu interessanten Kandidaten für die zelluläre Transformation (Allen *et al.*, 1991; Übersichtsartikel: van Biesen *et al.*, 1996; Dhanasekaran *et al.*, 1995). Im Falle der Kaposi Sarkom-Erkrankung konnte gezeigt werden, dass ein GPCR des Kaposi Sarkom-assoziierten Herpesvirus als virales Onkogen wirkt und ursächlich für die Tumorgenese verantwortlich ist (Bais *et al.*, 1998). Inwieweit TM7SF1 als GPCR auf die Proliferation bzw. die Differenzierung der Zellen des metanephrischen Mesenchyms im Zuge der Nierenentwicklung wirkt, bleibt offen. Seine regulierte Expression während der Metanephrogenese legen eine genauere Untersuchung der Rolle, die das Genprodukt während der wechselseitigen Induktionsprozesse zwischen Ureterknospe und Blastem spielt, nah. Dafür spricht auch seine Lokalisation in 1q42-43, einer chromosomalen Region, die in verschiedenen Wilmstumoren von Aberrationen betroffen ist (vgl. Kap. 1.2.1). Interessante Erkenntnisse, insbesondere auch hinsichtlich der durch TM7SF1 regulierten zellulären Prozesse, können mit den in der vorliegenden Arbeit generierten zellulären Systemen mit TM7SF1-L Überexpression gewonnen werden (vgl. Kap. 3.2.4.7). Die komparative Hybridisierung von cDNA aus TM7SF1-L stabil exprimierenden Zellen und entsprechenden Kontrollzellen auf cDNA-Microarrays könnte Aufschluss über die Zielgene einer potenziellen TM7SF1-Signaltransduktionskaskade geben. Ein Vergleich solcher Untersuchungsergebnisse mit den Ergebnissen der Protein-Protein-Interaktionsstudien im oben geschilderten *Two Hybrid-Assay* wird die Einordnung von TM7SF1 in bestehende oder evtl. in neue Signaltransduktionskaskaden ermöglichen und eine potenzielle Funktion in der mitogenen Signaltransduktion aufdecken. Die Generierung TM7SF1-spezifischer Antikörper (vgl. Kap. 3.2.4.8-9) ermöglicht ferner auch die Untersuchung der gewebe- und zelltypspezifischen Expression des Proteins in immunhistochemischen Experimenten.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde auch das homologe Gen der Maus, *Tm7sf1*, identifiziert und charakterisiert (Spangenberg *et al.*, 1999; vgl. Kap. 3.2.4.5). Die Nukleotid- und die aus dem identifizierten ORF abgeleitete Aminosäuresequenz wurde ermittelt und mit den vorliegenden humanen Sequenzen verglichen (vgl. Kap. 3.2.4.6). Die hohe Konservierung der cDNA-Sequenz des ORF (89,8%; vgl. Abb. 3.26 in Kap. 3.2.4.6), sowie die Aminosäureidentität der abgeleiteten Proteine von 94,5% (21 Aminosäureaustausche über eine Länge von 385 Aminosäuren; vgl. Abb. 3.27 in

Kap. 3.2.4.6) lassen eindeutig den Schluss zu, dass es sich bei der identifizierten Maus-cDNA tatsächlich um das murine Homolog handelt. Diese Beobachtung wird durch die chromosomale Lokalisation des murinen Gens (23 cR3000 distal des Chromosom 13-spezifischen Markers D13Mit173; LOD *score*: 15,6; vgl. Abb. 3.25 in Kap. 3.2.4.5) unterstützt, da sich *TM7SF1* auf Chromosom 1 innerhalb einer Gruppe syntäner Gene befindet, deren Homologe als Syntäniegruppe auf dem proximalen Chromosom 13 der Maus gefunden werden. Die Tatsache, dass der Grad der Konservierung auf Nukleotidebene zwischen Maus und Mensch im Bereich des ORF mit 89,8% sehr hoch ist, und in den Regionen von 3'- und 5'-UTR stark abfällt (5'-UTR: 50,5%; 3'-UTR: 75,6%; vgl. Abb. 3.26 in Kap. 3.2.4.6), spricht eindeutig für die Translation des identifizierten ORF in der oben beschriebenen Form. Die identische Lage der Transmembrandomänen und die Konservierung der in Abbildung 3.27 (Kap. 3.2.4.6) angedeuteten Konsensusstellen für N-gekoppelte Glykosylierungen und Phosphorylierungen durch verschiedene Ser/Thr-Kinasen und Tyrosinkinasen, bestätigen den ORF und unterstreichen die Bedeutung der identifizierten Proteinmodifikationen für die diskutierte Funktion der Proteine.

Die mit Hilfe der *Northern*-Experimente gewonnenen Expressionsdaten für *Tm7sf1* stimmen hinsichtlich des gewebespezifischen Auftretens von *Tm7sf1*-Transkripten gut mit den Ergebnissen für das humane Gen überein. In beiden Spezies konnte die Expression in Niere und Gehirn nachgewiesen werden (vgl. Abb. 3.19 in Kap. 3.2.4.2 [*TM7SF1*] und Abb. 3.24 in Kap. 3.2.4.5 [*Tm7sf1*]). Allerdings muss hier einschränkend angemerkt werden, dass in muriner RNA kein dem menschlichen Organismus ähnliches alternatives Spleißen beobachtet werden konnte. Stattdessen traten mehrere Banden im *Northern blot* mit muriner RNA auf (vgl. Abb. 3.23 in Kap. 3.2.4.5). Die Detektion mehrerer Transkripte unterschiedlicher Größe in Maus-RNA könnten aus Kreuzhybridisierungen der Sonde mit Transkripten hoher Sequenzhomologie zu *Tm7sf1* resultieren. Dafür spricht auch der Verlust einer Bande bei Verwendung einer 3'-UTR-spezifischen Sonde. Alternativ kann es sich dabei aber auch um ein Indiz für die Verwendung verschiedener 3'-UTRs bzw. alternativer Polyadenylierungsstellen bei ansonsten gleichen cDNAs von *Tm7sf1* handeln. Inwiefern die Genprodukte als putative GPCRs im Rahmen der Entwicklung exprimierender Gewebe/Organe (z.B. Niere, Gehirn) für die zelluläre Kommunikation und Differenzierung verantwortlich sind, kann anhand der vorliegenden Daten nicht beantwortet werden. RNA *in situ*-Hybridisierungsexperimente zur Detektion von *Tm7sf1* in Gewebeschnitten von Niere und Gehirn sollten Aussagen über die gewebe- und zelltypspezifische Expression des Gens ermöglichen. Mit zwei verschiedenen *Tm7sf1*-spezifischen Sonden wurden solche Experimente bereits begonnen, waren jedoch bisher ohne Befund.

Angeregt durch den Interspeziesvergleich wurde die Identität des zur Translationsinitiation verwendeten Startcodons beim Menschen genauer untersucht. Da innerhalb der Maus-cDNA lediglich das dem zweiten menschlichen ATG entsprechende Start-Codon konserviert ist, stellt sich die Frage, inwieweit die Translation der menschlichen mRNA tatsächlich an Position nt 52 beginnt (vgl. Abb. 3.16 in Kap. 3.2.4.1). Ein Vergleich der Nukleotidsequenz im Bereich des ersten und zweiten ATG von *TM7SF1* mit der Konsensussequenz für Translationsinitiationsstellen macht deutlich, dass eine effektive Translationsinitiation vermutlich nur am zweiten, in der Maus konservierten ATG stattfindet (vgl. Kozak, 1996 und Abb. 3.27 in Kap. 3.2.4.6). Eine eindeutige Aussage bezüglich des korrekten Translationsinitiationsortes kann im Falle des humanen Gens nicht getroffen werden. In vitro-Translationsexperimente (z.B. unter Verwendung des innerhalb der vorliegenden Dissertation vorgestellten Expressionskonstrukts CMV-TM7SF1L) können hier Aufschluss über das tatsächlich verwendete Start-Codon geben.

Zusammenfassend bleibt festzustellen, dass mit *TM7SF1* ein für die Nierenentwicklung und Wilmstumorgnese interessantes Gen im Zuge der vorliegenden Arbeit identifiziert wurde. Die beschriebenen Charakterisierungen lassen den Schluss zu, dass es sich bei dem von ihm codierten Protein vermutlich um einen G Protein-gekoppelten Rezeptor handelt. Die regulierte Expression von *TM7SF1* während der Metanephrogenese (und in verschiedenen spezifischen Bereichen des Zentralnervensystems) und die Identifikation funktionell möglicherweise relevanter alternativer Proteinisoformen rechtfertigen seine weitere Charakterisierung, insbesondere in Hinblick auf die Regulation zellulärer Prozesse während der Nierenentwicklung. Durch die Generierung zellulärer Systeme mit stabiler Überexpression und die Synthese spezifisch gegen TM7SF1 gerichteter Antikörper wurden wichtige Voraussetzungen für die notwendigen Untersuchungen geschaffen. Die Charakterisierung des homologen Gens der Maus eröffnet die Möglichkeit, *Tm7sf1* in einem Modellorganismus funktionell genauer zu studieren.

4.3.3 *TCF2* und familiärer Wilmstumor

Im Zuge der Untersuchungen zur differentiellen Genexpression während der Nierenentwicklung und Wilmstumorgnese konnte ein cDNA-Fragment (*FE7A1*) isoliert werden, das Teile des 3'-UTR des Gens *TCF2* (*transcription factor 2, hepatic*) repräsentiert (vgl. Kap. 3.2.5 und Diplomarbeit von Jutta Trübenbach, 1998). Die Präsenz von *TCF2*-Transkripten in RNA aus normalem Nierengewebe (adulte sowie fetale Niere), die in den initial analysierten Tumorgeweben nicht nachgewiesen werden konnte, ließ eine weitere Charakterisierung dieses entwicklungspezifisch exprimierten

Transkriptionsfaktors sinnvoll erscheinen. Die Ausdehnung der *TCF2*-Expressionsanalysen auf eine große Zahl histologisch charakterisierter Tumorgewebe ergab die signifikante Herunterregulation *TCF2*-spezifischer Transkripte in mehr als 90% der untersuchten Tumorgewebe (43 von 47; vgl. Abb. 3.33 in Kap. 3.2.5.1).

Durch Kopplungsanalysen konnten sowohl das bereits identifizierte Wilmstumorgen *WT1* als auch andere Genorte, in denen weitere Kandidatengene für die Wilmstumorgenese lokalisiert sind (11p15.5 und 16q), als ursächlich für die familiäre Form des Nephroblastoms ausgeschlossen werden (Huff *et al.*, 1988, 1992; Grundy *et al.*, 1988; Schwartz *et al.*, 1991). Stattdessen wurden zwei familiäre Wilmstumorloci, FWT1 in 17q12-q21 (Rahman *et al.*, 1996) und FWT2 in 19q13.3-q13.4 (Huff *et al.*, 1997; McDonald *et al.*, 1998) im Rahmen von Kopplungsanalysen in großen Familien mit multiplen WT-Fällen ohne weitere phänotypische Auffälligkeiten der Patienten identifiziert. Zusätzlich konnte durch CGH-Analysen (CGH:= *comparative genomic hybridisation*) in Patienten mit familiär auftretendem Nephroblastom gezeigt werden, dass Deletionen der chromosomalen Regionen 3q12-21, 4q21-qter, 9p21-pter und 20p vermehrt auftreten (Altura *et al.*, 1996).

Die zur Identifikation des FWT1-Lokus durchgeführten Kopplungsanalysen in zwei großen Familien (MON 480 und K1104 in Rahman *et al.*, 1998) ergaben einen 14 cM umfassenden, zwischen den Markern D17S927 und D17S1820 gelegenen Bereich als Lokalisation für das Kandidatengen des familiären Wilmstumors FWT1. In verschiedenen Patienten der Familie MON 480 wurden Experimente zur Identifikation eines Verlustes der Heterozygotie (LOH) in der FWT1-Region durchgeführt (Rahman *et al.*, 1997). Darin konnte gezeigt werden, dass in 3 von 4 Patienten kein tumorspezifischer LOH stattgefunden hat und dass der im Tumorgewebe von Patient 4 beobachtete LOH auf Chromosom 17 zum Verlust des in MON 480 mit der Erkrankung gekoppelten Haplotyps führte (Rahman *et al.*, 1997). Die Tatsache, dass in der Mehrzahl der Tumorgewebe kein LOH in der Kandidatenregion festgestellt werden kann wirft die Frage auf, inwiefern es sich bei FWT1 um ein Tumorsuppressorgen handelt. Normalerweise müssen solche Gene, aufgrund des rezessiven Wirkmechanismus der Mutation, durch zwei genetische Ereignisse (Mutation, chromosomale Aberration) funktionell inaktiviert werden. In familiären Fällen passiert dies durch Vererbung eines mutierten Allels und die Inaktivierung des verbliebenen Wildtypallels durch eine somatische Mutation (vgl. Kap. 1.1 und Knudson, 1971). Diese somatische Inaktivierung kann in der Regel durch einen LOH polymorpher Marker im Bereich des betroffenen Gens detektiert werden (Knudson, 1993). Für familiäre Fälle von Retinoblastomen, Mammakarzinomen, Neurofibrosarkomen und anderer Malignome konnte dieses Prinzip nachgewiesen werden (Cavenee *et al.*, 1985; Smith *et al.*, 1992; Collins *et al.*, 1995; Legius *et al.*, 1993). Eine mögliche Erklärung für die

erhaltene Heterozygotie in den FWT1-assoziierten Tumorgeweben ist, dass das FWT1 Wildtypallel in diesen Fällen durch sehr kleine, regional begrenzte genetische Aberrationen (z.B. Punktmutationen) inaktiviert wird, was dann nicht durch LOH-Untersuchungen benachbarter polymorpher Marker detektiert werden könnte. Der Erhalt der Heterozygotie kann aber auch durch die Annahme erklärt werden, dass FWT1 in der Tat kein klassisches Tumorsuppressorgen sondern ein Protoonkogen darstellt und dass das Vorliegen einer aktivierenden Mutation eines Allels von FWT1 ausreicht, durch Funktionsgewinn des resultierenden FWT1-Proteins betroffene Individuen für die Entwicklung eines Wilmstumors zu prädisponieren. Ein analoges Verhalten zeigt das Protoonkogen *RET*, das für eine Rezeptortyrosinkinase codiert. Mutationen im *RET*-Gen konnten in der Keimbahn verschiedener Patienten mit multipler endokriner Neoplasie (*multiple endocrine neoplasia*, MEN) 2A und 2B sowie in Patienten mit der familiären Form von Schilddrüsenkrebs (*familial medullary thyroid cancer*, FMTC) nachgewiesen werden (Carlson *et al.*, 1994; Donis Keller *et al.*, 1993; Eng *et al.*, 1995; Hofstra *et al.*, 1994). LOH in der chromosomalen Region 10q11.2, in der *RET* lokalisiert ist, wurde in den entsprechenden Tumorgeweben jedoch nicht nachgewiesen.

Der Verlust des tumorgekoppelten Allels von FWT1 im Tumorgewebe eines Wilmstumorpatienten (#12 in Rahman *et al.*, 1997) deutet an, dass die familiäre Form des Nephroblastoms in der Familie durch eine FWT1-Mutation initiiert wird und dass diese Mutation später nicht mehr für die Aufrechterhaltung des neoplastischen Phänotyps und die Progression der Tumorzellen benötigt wird (der von den Autoren Rahman *et al.*, 1997 geprägte Begriff „*hit-and-run*“ *oncogenesis* beschreibt dieses Phänomen treffend). Spekuliert man über die funktionellen Voraussetzungen, die ein solches Gen erfüllen müsste, so kommt entweder ein Gen in Frage, dessen Produkt für die genomische Stabilität von Zellen verantwortlich zeichnet, oder aber das codierte Protein ist mit der Proliferationskontrolle von Zellen in Verbindung zu bringen (vgl. hierzu auch die Diskussion in Rahman *et al.*, 1997).

TCF2 (in der Literatur auch bezeichnet als LFB3, HNF2, vHNF1 und HNF1 β) ist ein Mitglied der HNF1 Transkriptionsfaktorfamilie. Das Gen wurde aufgrund seiner großen Homologie zu dem bereits zuvor identifizierten und charakterisierten *HNF1*-Gen (*hepatocyte nuclear factor 1*) isoliert (Abbott *et al.*, 1990). Wie HNF1 besitzt TCF2 in seiner aminoterminalen Hälfte eine DNA-Bindungsdomäne, während der C-Terminus des Proteins für die Transaktivierung verantwortliche Aminosäuren beinhaltet (Cereghini, 1996). Die DNA-Bindungsdomäne kann in einen für die Dimerisierung relevanten Bereich (A-Domäne), eine sog. B-Domäne, die für die Sequenzspezifität der DNA-Bindung verantwortlich ist und in eine Homöodomäne unterteilt werden (vgl. Abb. 4.8).

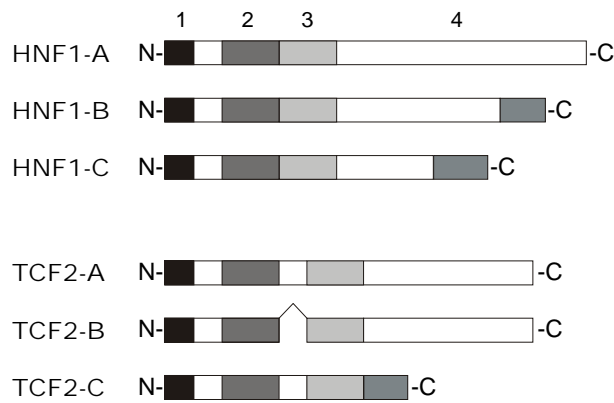


Abbildung 4.8: Schematische Darstellung der Isoformen von HNF1 und TCF2 (nach Bach und Yaniv, 1993). Die verschiedenen Proteinisoformen entstehen durch alternatives Spleißen der prä-mRNA. Die verschiedenen Proteinisoformen unterscheiden sich hauptsächlich in ihrer C-terminalen Transaktivierungsdomäne.
1: Dimerisierungsdomäne; 2: B-Domäne/DNA-Bindung; 3: Homöodomäne; 4: Transaktivierungsdomäne.

Im Bereich der DNA-Bindungsdomäne findet sich die stärkste Konservierung zwischen HNF1 und TCF2 (zwischen 75% und 98% auf Proteinebene). Aufgrund der starken Konservierung der DNA-Bindungsdomäne erkennen und binden HNF1 und TCF2 die gleichen Nukleotide in Promotoren von Zielgenen (Konsensussequenz: GGTTAATNATTAAC[A/C]; eine Hälfte des Palindroms ist dabei immer stark konserviert, die andere Hälfte kann degeneriert sein; Tronche und Yaniv, 1992). Die Bindung an DNA erfolgt als Dimer, wobei TCF2 und HNF1 Homo- und Heterodimere bilden können (Mendel *et al.*, 1991a). Reguliert wird ihre Dimerisierung durch das Protein DCoH (*dimerization cofactor of HNF1*), das selbst als Dimer vorliegt (Mendel *et al.*, 1991b). Bekannte Zielgene von HNF1 und TCF2 sind u.a. die entwicklungspezifisch regulierten Gene *α 1-Antitrypsin*, *α -Fetoprotein* und *IGFBP1* (*insulin-like growth factor binding protein 1*) (Cereghini, 1996). Sowohl von HNF1 als auch von TCF2 sind drei Isoformen bekannt (HNF1-A, -B, -C; TCF2-A, -B, C; vgl. Abb. 4.8), die durch alternatives Spleißen einer gemeinsamen prä-mRNA entstehen (Ringelisen *et al.*, 1993; Bach und Yaniv, 1993). Die codierten Proteine unterscheiden sich dabei in ihrer C-terminalen Transaktivierungsdomäne (außer: der alternative Spleiß in TCF2-A führt zu einem Einbau von 26 AS zwischen der B-Domäne und der Homöodomäne im Bereich der DNA-Bindungsregion von TCF2-B). Wie gezeigt werden konnte hat dies funktionelle Konsequenzen, da die verschiedenen Isoformen unterschiedliche Transaktivierungseigenschaften besitzen (Bach und Yaniv, 1993; Ringelisen *et al.*, 1993). Zusammen mit der Fähigkeit zur Homo- und Heterodimerisierung ermöglicht diese Vielfalt von HNF1- und TCF2-Isoformen eine hohe Komplexität in Bezug auf die Regulation ihrer Zielgene im Zuge der Organogenese (vgl. hierzu auch Cereghini *et al.*, 1996).

Die Expression von *HNF1* und *TCF2* ist entwicklungspezifisch reguliert. Im adulten Organismus finden sich Transkripte beider Gene u.a. in Niere, Leber, Dünndarm und

Pankreas, wobei der Hauptort der *TCF2*-Expression das Nierengewebe ist (De Simone *et al.*, 1991). Für die Organogenese konnte in Mäusen gezeigt werden, dass die Expression von *TCF2* prinzipiell der *HNF1*-Expression vorausgeht (Lazzaro *et al.*, 1992). Aus diesen Erkenntnissen wurde die Hypothese abgeleitet, dass *TCF2* für die Einleitung zellulärer Differenzierungsvorgänge während der Organogenese (u.a. der Metanephrogenese) verantwortlich ist, während *HNF1* zur Aufrechterhaltung des differenzierten zellulären Phänotyps benötigt wird (Cereghini *et al.*, 1992). Die Beobachtung, dass *TCF2*-Transkripte in der Maus direkt nach der Initiation des Mesenchym-Epithel-Übergangs in den Zellen des metanephrischen Mesenchyms auftreten, legt eine funktionelle Bedeutung von *TCF2* insbesondere bei der Metanephrogenese nah (De Simone *et al.*, 1991; Lazzaro *et al.*, 1992).

Beide Gene, *HNF1* und *TCF2*, sind im Humangenom kartiert. Mit einer Lokalisation in der chromosomalen Region 17cen-q21 überlappt der für *TCF2* ermittelte Genort mit dem Intervall des von Rahman und Mitarbeitern (1996) beschriebenen FWT1-Lokus in 17q12-q21 (s.o.). Seine offensichtlich große Bedeutung für die Differenzierung der Zellen des metanephrischen Mesenchyms während der Metanephrogenese zusammen mit den in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnissen über die tumorspezifische Herunterregulation der Transkription machen *TCF2* zu einem aussichtsreichen Kandidatengen für die familiäre, FWT1-gekoppelte Wilmstumorgene. Die Tatsache, dass die *TCF2*-Expression (direkt oder indirekt) durch WT1 reguliert ist (vgl. Abb. 3.35 in Kap. 3.2.5.2.), verknüpft das Gen darüber hinaus mit dem einzigen bisher klonierten Wilmstumoren und unterstreicht seine Rolle als Kandidatengen für die familiäre Form des Wilmstumors.

Aufgrund dieser Anhaltspunkte wurde eine Mutationsanalyse im codierenden Bereich des *TCF2*-Gens durchgeführt. Analysiert wurde genomische DNA aus Blut von vier Angehörigen (eine betroffene Person, ein obligater Träger der FWT1-Mutation, zwei nicht betroffene Personen) der in Rahman *et al.* (1996) beschriebenen Familie MON 480 mit Kopplung zum FWT1-Lokus (vgl. Kap. 3.2.5.5). Die durchgeführte PCR-Amplifikation der proteincodierenden Exons und ihre anschließende direkte Sequenzierung zeigten jedoch keine Mutation in einer der DNAs. Es besteht jedoch die Möglichkeit, dass in den Patienten der beschriebenen Familie Mutationen im Bereich des Promotors von *TCF2* zu finden sind. Da innerhalb der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, dass die Expression von *TCF2* (direkt oder indirekt) von WT1 reguliert (und zwar reprimiert) wird, könnte eine Mutation innerhalb einer (putativen) WT1-Bindungsstelle (oder innerhalb der Bindungsstelle eines von WT1 regulierten Transkriptionsfaktors, der für die transkriptionelle Regulation von *TCF2* entscheidend ist) zur dysregulierten Expression von *TCF2* während der Metanephrogenese führen. Aufgrund der strikt regulierten Transkription von *TCF2* während der normalen Nierenentwicklung und durch seine

funktionelle Relevanz für die Differenzierung epithelialer Strukturen der Niere wäre eine solche Dysregulation der *TCF2*-Expression denkbar als Ursache für die Wilmstumorenese.

Mutationen im codierenden Bereich von *TCF2* wurden in der Literatur bereits beschrieben. So konnte gezeigt werden, dass Patienten mit einer als MODY 5 (*maturity onset diabetes of the young*, Typ 5) bezeichneten Krankheit eine heterozygote *nonsense*-Mutation in Codon 177 (CGA [Arg] → TGA [Stp]) von *TCF2* aufweisen (Horikawa *et al.*, 1997). Bei dieser Form des Diabetes handelt es sich um eine autosomal-dominant vererbte, monogenische Erkrankung, die durch die fehlerhafte Insulinsekretion hervorgerufen wird. Neben der Prädisposition für MODY 5 wurde bei den von der R177X-Mutation betroffenen Patienten auch eine renale Dysfunktion (Nephropathie) beobachtet. Darüberhinaus konnte in einer norwegischen Familie mit einer milden Form von Diabetes, fortschreitenden, Diabetes-unabhängigen Nierenfunktionsstörungen und schweren Geschlechtsfehlbildungen eine heterozygot vorliegende, 75 bp umfassende Deletion in Exon 2 von *TCF2* (del nt 409-483) nachgewiesen werden (Lindner *et al.*, 1999). Dabei wurde gezeigt, dass das resultierende aberrante Protein, wie auch das durch die R177X-Mutation entstehende Protein in den MODY 5-Patienten, Bindungsstellen in Promotor-DNA nicht mehr kontaktieren kann und in transienten Transfektionsanalysen keine Reporteraktivität nachzuweisen ist. Die phänotypischen Unterschiede zwischen den MODY 5-Patienten und der norwegischen Familie könnten durch unterschiedliche Auswirkungen der Mutationen auf das *TCF2*-Protein erklärt werden. Während die R177X-Mutation zu einem stark verkürzten Protein ohne Transaktivierungsdomäne führt, erhält die 75 bp-Deletion die C-terminale Transaktivierungsdomäne des Proteins. Die Fähigkeit zur Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren bzw. dem basalen Transkriptionsapparat bliebe dieser veränderten *TCF2*-Isoform also erhalten, was die phänotypische Variation, insbesondere die Geschlechtsfehlbildungen erklären könnte.

In Bezug auf eine Beteiligung von *TCF2* an der Wilmstumorenese (insbesondere in familiären Fällen) bedeutet die Tatsache, dass Mutationen im Gen zu MODY 5 und anderen Stoffwechselerkrankungen führt, nicht, dass *TCF2* damit als Kandidat für FWT1 ausscheidet. Die unterschiedlich stark ausfallenden phänotypischen Ausprägungen der beschriebenen Mutationen sprechen dafür, dass die Art der funktionellen Inaktivierung von *TCF2* zu verschiedenen Krankheitsbildern führen kann. Auch für andere Gene bzw. Genprodukte, wie z.B. den Rezeptor für den Fibroblastenwachstumsfaktorrezeptor 3 (FGFR3) konnte gezeigt werden, dass Mutationen zu Wachstumsstörungen, aber auch zur malignen Entartung von Zellen führen können (Cappellen *et al.*, 1999). Das Auftreten genitaler Fehlbildungen in Mitgliedern der von Lindner *et al.* (1999) beschriebenen norwegischen Familie vor dem Hintergrund einer Assoziation von Wilmstumoren mit

urogenitalen Fehlbildungen der betroffenen Patienten (vgl. Kap. 1.2.1 und 1.3.1) unterstreicht die Rolle von *TCF2* als Kandidatengen für den familiären Wilmstumor zusätzlich.

Für *TCF2* als FWT1-Gen müsste gefordert werden, dass die aberrante Expression des Wildtypproteins (es wurden keine Mutationen im ORF detektiert; s.o.) innerhalb eines bestimmten Zeitfensters während der Nierenentwicklung, ausgelöst durch eine regulatorische Mutation, dazu führt, dass der Mesenchym-Epithel-Übergang des Nierenblastems oder andere wichtige Differenzierungsvorgänge während der Nierenentwicklung nicht (korrekt) stattfindet. Diese Population falsch bzw. nicht differenzierter Zellen des metanephrischen Mesenchyms könnte dann der Ausgangspunkt für die Progression zu Tumorzellen darstellen.

Einen Hinweis auf die Beteiligung von *TCF2* bei dem Prozess der malignen Transformation von Zellen gibt eine 1997 erschienene Publikation von Martel und Mitarbeitern. Die Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass die Überexpression von SV40 T-Antigen in MDCK-Zellen (*Madin Darby canine kidney*; Zellen mit epithelialer Morphologie) zur Dedifferenzierung der Zellen (transfizierte Zellen weisen eine fibroblastenähnliche Morphologie auf) und zu einer Induktion der Invasivität der Zellen führt. Dabei wurde beobachtet, dass mit der Dedifferenzierung eine starke Herunterregulation von *TCF2*-Transkripten einhergeht. Inwieweit die Repression der *TCF2*-Expression mitverantwortlich für den Prozess der Dedifferenzierung ist, oder ob es sich bei der Beobachtung lediglich um eine Koinzidenz der Ereignisse handelt, bleibt offen.

Um die Rolle von *TCF2* in der Wilmstumorgenese weiter zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Arbeit Wilmstumorzelllinien etabliert, die *TCF2* stabil überexprimieren (vgl. Kap. 3.2.5.4). Die Identifikation von Zielgenen von *TCF2*, die mit Hilfe dieser Zelllinien ermöglicht wird (z.B. durch einen *differential display*-Ansatz oder durch *Microarray*-Hybridisierungen), sollte eine Aufklärung der Funktion von *TCF2* in der normalen (und aberranten) Nierenentwicklung ermöglichen. Ferner wurden große Teile der Promotorregion von *TCF2* im Rahmen der vorliegenden Arbeit kloniert (Daten nicht gezeigt) und stehen im Kontext von Reportergenvektoren für die Identifikation der Promotorbereiche, die die transkriptionelle Regulation durch WT1 vermitteln, zur Verfügung.

4.3.4 *CDT151*

In der vorliegenden Dissertation wurde die cDNA-Sequenz des neuen Gens *CDT151* erweitert und die strukturellen Merkmale des abgeleiteten putativen Proteins analysiert und

charakterisiert. Isoliert wurde *CDT151* aufgrund seiner verstärkten Expression in Wilmstumorgewebe im Rahmen der Betreuung der Diplomarbeit von Jutta Trübenbach. Dabei konnten erste Sequenzerweiterungen durch Analyse einer cDNA-Bank (Erweiterung auf 3012 bp), eine chromosomale Lokalisierung mittels FISH (1p31-p32) und die Bestimmung der Transkriptgröße (ca. 6,5 kbp) sowie der gewebespezifischen Expression durchgeführt werden (Trübenbach, 1998; Zabel *et al.*, 1998). Mit Hilfe von Datenbankanalysen und RT-PCR-Experimenten wurde die bekannte cDNA-Sequenz von *CDT151* wie in Kapitel 3.2.6 beschrieben auf 6639 bp erweitert und das Vorliegen durchgehender Transkripte mit der identifizierten Nukleotidsequenz verifiziert. Durch die Erweiterung der bekannten Sequenzinformation in 5'-Richtung konnte ein offener Leserahmen von 1161 Nukleotiden Länge identifiziert werden, der das Potenzial hat, für ein Protein mit 387 Aminosäuren zu codieren (vgl. Abb. 3.41 in Kap. 3.2.6.1). Die Verlängerung der cDNA-Sequenz von *CDT151* um ca. 3,5 kbp nach den initialen Charakterisierungen und „klassischen“ Analysen von cDNA-Banken mittels Hybridisierung macht deutlich, wie hilfreich Homologievergleiche bei der Charakterisierung von Transkripten sein können. Durch die großen EST-Projekte, die der Identifikation exprimierter Sequenzen durch Sequenzierung von Klonen verschiedener cDNA-Banken dienen (Adams *et al.*, 1991), kann mit relativ geringem Aufwand ausgehend von kurzen cDNA-Fragmenten häufig nahezu die vollständige Sequenz eines Transkriptes ermittelt werden.

Mit Hilfe der Homologievergleiche zu Datenbankeinträgen konnte nicht nur die bekannte Sequenzinformation von *CDT151* erweitert werden, sondern anhand der identifizierten Gene/Genprodukte mit signifikanter Homologie können Schlüsse über die Funktion von *CDT151* gezogen werden. Die Tatsache, dass sich signifikante Homologien auf Proteinebene zu Proteinen u.a. aus *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* und *Rattus norvegicus* (vgl. Abb. 3.42 und 3.43 in Kap. 3.2.6.2) zeigen, spricht dafür, dass es sich bei *CDT151* um ein evolutiv konserviertes Gen, vermutlich mit wichtiger Funktion für den Organismus handelt. Die hohe Homologie zum Gen/Genprodukt *Ki-1/57* legen die Vermutung nahe, dass das *CDT151*-Protein funktionell ähnlich diesem partiell charakterisierten Protein ist. *Ki-1/57* wurde durch die Kreuzreaktivität des monoklonalen, gegen das CD30-Antigen gerichteten Antikörpers *Ki-1*, identifiziert (Hansen *et al.*, 1989). Bei CD30 handelt es sich um ein membranständiges Glykoprotein der Zelloberfläche, das auf aktivierten B- und T-Zellen (auch auf Hodgkin- und Sternberg-Reed-Zellen von Patienten mit Hodgkin-Lymphom) exprimiert wird (Schwab *et al.*, 1982; Froese *et al.*, 1987). Mit Hilfe biochemischer und molekularbiologischer Methoden konnte das *Ki-1/57*-Antigen strukturell und funktionell charakterisiert werden. Dabei zeigte sich, dass es sich um ein intrazelluläres Protein handelt, das spezifisch in aktivierten Leukozyten exprimiert

wird (Hansen *et al.*, 1990) und das im nichtphosphorylierten Zustand im Zellkern dieser Zellen zu finden ist. Darüberhinaus konnte Ki-1/57 Proteinkinaseaktivität zugeschrieben werden (Kobarg *et al.*, 1997). Mittels Strukturanalysen von Ki-1/57 konnten zwei putative ATP-Bindungsmotive identifiziert werden, die eine mögliche Rolle als Proteinkinase unterstreichen (Kobarg *et al.*, 1997; Wierenga und Hol, 1983). Wie Ki-1/57 besitzt das aus dem ORF von *CDT151* abgeleitete Protein solche putativen ATP-Bindungsmotive, die in drei Gruppen von je drei Einzelmotiven über das Protein verteilt sind (vgl. Abb. 4.9 und Kap. 3.2.6.3). Ferner finden sich in *CDT151*, analog den in Ki-1/57 identifizierten Resten, verschiedene Konsensusstellen für die Phosphorylierung durch Proteinkinase C und Caseinkinase 2 an Serin- bzw. Threoninresten (Daten nicht abgebildet). Dass es sich bei *CDT151* ebenfalls um ein (transient) nukleäres Protein handeln könnte, wird durch die Identifikation eines Kernlokalisationssignals innerhalb der Aminosäuresequenz unterstrichen (vgl. Abb. 4.9 und Kap. 3.2.6.3). Außerdem spricht für eine mögliche Funktion als Transkriptionsfaktor im Zellkern die Aminosäureidentität zwischen dem absoluten Aminoterminus von *CDT151* und der B-Kette des Transkriptionsfaktors ARF6 der Maus (über einen Bereich von 30 Aminosäuren; vgl. Abb. 4.9 und Kap. 3.2.6.3).

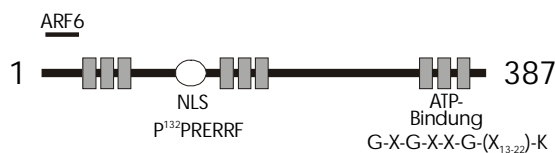


Abbildung 4.9: Schematische Darstellung der aus den Homologie- und Strukturvorhersagen abgeleiteten Proteinmotive von *CDT151*. Die ATP-Bindungsmotive sind als graue Rechtecke, das Kernlokalisationssignal als weißer Kreis dargestellt. Der Bereich der Aminosäureidentität von *CDT151* mit dem Transkriptionsfaktor ARF6 der Maus ist über dem als horizontale Linie dargestellten *CDT151*-ORF markiert.

Ein interessanter Aspekt, insbesondere in Bezug auf eine mögliche Beteiligung von *CDT151* in der Nierenentwicklung und Wilmstumorgengese, ist die Assoziation der Ki-1/57-Expression mit der zellulären Proliferation. Die Identifikation eines cDNA-Klons der Ratte (Zugangsnummer U21718; Klon *C426* in Sykes und Weiser, 1992), der über weite Bereiche signifikante Homologien auf Nukleotidebene zeigt (zwischen 90% und 94%; vgl. Abb. 3.43 in Kap. 3.2.6.2), spricht dafür, dass auch *CDT151* mit der Proliferation assoziiert sein könnte. Die cDNA *C426*, die aufgrund der hohen Sequenzübereinstimmungen vermutlich das zu *CDT151* homologe, zumindest aber ein mit *CDT151* sehr eng verwandtes Gen der Ratte darstellt, wurde wegen ihrer differenziellen Expression im Darmepithel der Ratte isoliert (Sykes und Weiser, 1992). Im Rahmen dieser Studie wurde sie als verstärkt in den Zellen der Krypten des Dünndarms exprimiert beschrieben. Da die Krypten der *lamina epithelialis* der Dünndarmmucosa die Stammzellen beherbergen, die

durch Proliferation das Zellmaterial des Dünndarmepithels produzieren (die Tochterzellen der Stammzellen differenzieren entlang ihrer Wanderung von der Krypte zur Spitze der Dünndarmzotten zu Enterozyten), ist von einer funktionellen Bedeutung von *C426* (und damit möglicherweise auch von *CDT151*) für die Proliferation und/oder die Differenzierung von Zellen auszugehen.

Neben der beschriebenen Verbindung von *CDT151* zur zellulären Proliferation und Differenzierung über die Sequenzhomologien ist das Gen auch durch seine chromosomale Lokalisation interessant für die Tumorgenese. Die im Zuge der vorliegenden Arbeit ermittelte Lokalisation in 1p21-p22.3 (zwischen den Markern D1S203 und D1S2865) liegt innerhalb eines Intervalls, das in verschiedenen Neoplasien spezifisch durch Verlust chromosomalen Materials betroffen ist (Schwab *et al.*, 1996; Mertens *et al.*, 1997; Douglass *et al.*, 1985). Untersuchungen über chromosomale Veränderungen in Wilmstumoren haben gezeigt, dass distinkte Bereiche auf dem kurzen Arm von Chromosom 1 häufig deletiert sind. So beschreiben Steenman und Mitarbeiter (1997) den spezifischen Verlust chromosomalen Materials aus 1p als ein vermutlich frühes Ereignis im Rahmen der Wilmstumorgenese und auch in Sheng *et al.* (1990) wird der Verlust chromosomalen Materials von 1p als eine der häufigsten Veränderungen im Karyotyp der von ihnen untersuchten Tumoren beschrieben. In einer von Mannens *et al.* (1996) durchgeführten Wilmstumorstudie wurden mit Hilfe von LOH- und CGH-Untersuchungen zwei Regionen auf Chromosom 1 identifiziert, die mit der Wilmstumorgenese in Verbindung gebracht werden (dabei handelt es sich um die Regionen 1p35-p36 und 1cen-p32). interessanterweise überlappt die zweite Region zu großen Teilen mit der in Douglass *et al.* (1985) identifizierten, häufig in soliden Tumoren des Kindesalters von Chromosomenbrüchen betroffenen Region 1cen-1p22, was ihre Relevanz für das Nephroblastom unterstreicht.

Inwieweit *CDT151* von den entsprechenden Veränderungen in Wilmstumoren betroffen ist und ob das Gen eines der auf dem kurzen Arm von Chromosom 1 postulierten tumorrelevanten Gene darstellt, bleibt offen. Seine Assoziation mit der zellulären Proliferation und/oder der Differenzierung von Zellen (evtl. als Transkriptionsfaktor) machen *CDT151* zu einem interessanten Kandidaten für weitergehende Untersuchungen bezüglich seiner Rolle innerhalb der Tumorgenese.

4.3.5 *GLI3* (und ausgewählte Mitglieder der SHH-Signaltransduktionskaskade)

Im Rahmen der vergleichenden Genexpressionsuntersuchungen in adultem und fetalem Nierengewebe sowie in Wilmstumorgewebe wurde ein Teil des 3'-UTR des *GLI3*-Gens identifiziert. Die Quantifizierung der Expressionsstärke in verschiedenen Nierengewebe

ergab eine starke Überexpression von *GLI3* in zwei von drei untersuchten konnatalen Mesoblastischen Nephromgeweben gegenüber adultem Nierengewebe (ca. 2,5- bzw. 4,5-fach erhöht; vgl. Abb. 3.48 in Kap. 3.2.7.1). Beim konnatalen mesoblastischen Nephrom (KMN) handelt es sich um einen benignen Nierentumor des frühen Kindesalters, der mit dem Wilmstumor verwandt ist und früher u.a. aufgrund von KMN-Fällen mit 11p-Involvierung (Roberts *et al.*, 1993) zur Gruppe der Wilmstumoren gerechnet wurde. Anhand zytogenetischer und molekularbiologischer Befunde werden KMNs heute eher mit konnatalen Fibrosarkomen (KFS) verglichen. Identische Translokationen t(12;15) in beiden Neoplasien, die zur Expression eines Fusionsproteins bestehend aus der Dimerisierungsdomäne des ETS-Transkriptionsfaktors ETV6 und der Proteintyrosinkinasedomäne des *TRKC*-Genproduktes führen, unterstreichen eine solche Klassifizierung der KMNs (Sawyer *et al.*, 1996; Rubin *et al.*, 1998). Die *GLI3*-Expression in den untersuchten Wilmstumorgeweben war in zwei der drei untersuchten Proben ebenfalls gegenüber dem adulten Nierengewebe erhöht, mit einem Faktor von ca. 2-fach jedoch nicht in dem Maße, wie in den KMNs (vgl. Abb. 3.48 in Kap. 3.2.7.1).

Eine Korrelation konnte sowohl zwischen der Expression von *GLI3* und *IGF2*, als auch zwischen dem Verhältnis der *SMOH*-/*PTCH*-Expression und der *IGF2*-Expression beobachtet werden (vgl. Abb. 3.48 in Kap. 3.2.7.1 [*GLI3*] und Abb. 3.50 in Kap. 3.2.7.2 [*PTCH*, *SMOH*, *IGF2*]). Diese Ergebnisse unterstützen eine Einordnung von *IGF2* in die SHH-Signaltransduktionskaskade (s.u. und Zhan und Helman, 1998; Hahn *et al.*, 1998). Zum besseren Verständnis und zur Erläuterung der bereits aufgeklärten Funktionsbeziehungen wird auf die GLI-Proteine und ihre Rolle innerhalb der SHH-Signaltransduktionskaskade im folgenden näher eingegangen.

Zusammen mit den Genen *GLI1* und *GLI2* bildet *GLI3* die Familie der *GLI*-Krüppel-Genfamilie, deren Mitglieder aufgrund ihrer fünf C₂-H₂-Zinkfinger im Protein als Transkriptionsfaktoren angesehen werden. Innerhalb dieser DNA-Bindungsdomäne weisen die Proteine untereinander auch die höchste Aminosäuresequenzübereinstimmung auf (Ruppert *et al.*, 1988). Bekannte homologe Proteine in Invertebraten sind das Segmentpolaritätsgen *Cubitus interruptus* (*Ci*) in *D. melanogaster* und das geschlechtsdeterminierende Gen *tra-1* in *C. elegans* (Orenic *et al.*, 1990; Zarkower und Hodgkin, 1992). *GLI3* wurde aufgrund seiner hohen Homologie zum *GLI1*-Gen identifiziert (Ruppert *et al.*, 1990). Die erste Beschreibung von *GLI1* erfolgte 1987 als amplifiziertes und stark überexprimiertes Gen in Glioblastomgewebe (Kinzler *et al.*, 1987). Vergleichbare Befunde in anderen Tumoren, wie z.B. in Rhabdomyosarkomen und Liposarkomen (Roberts *et al.*, 1989), sowie in epidermalen Tumoren (Dahmane *et al.*, 1997) unterstreichen die Rolle von *GLI1* als Protoonkogen. Eine Rolle von *GLI2* und *GLI3*

in der Tumorgenese wurde bisher noch nicht beschrieben, allerdings gibt es Hinweise, dass auch diese beiden Mitglieder der GLI-Krüppel-Transkriptionsfaktorfamilie onkogenes Potenzial besitzen (Ruiz i Altaba, 1999).

Mit Hilfe von *in situ*-Hybridisierungen wurde für die Maus gezeigt, dass alle Mitglieder der *Gli*-Familie bereits während der Gastrulation im Ektoderm und Mesoderm exprimiert werden. Ihre Expressionsstärke nimmt während der Mausentwicklung sukzessiv ab, so dass Transkripte hauptsächlich in ektodermal bzw. mesodermal abgeleiteten Geweben während des Prozesses der Organogenese gefunden werden. Dabei kann eine klare Korrelation zwischen dem Proliferationsstatus der Zellen und dem Expressionsstatus der *Gli*-Gene (d.h. proliferierende Zellen sind Gli-positiv) beobachtet werden. In adulten Geweben, nach Beendigung der Organogenese, finden sich kaum noch Transkripte (Hui *et al.*, 1994).

Funktionell werden die GLI-Proteine in die *sonic hedgehog* (SHH) Signaltransduktionskaskade eingeordnet, in der sie als Transkriptionsfaktoren die zelluläre Verarbeitung des exogenen Signals (SHH) durch die transkriptionelle Kontrolle von Zielgenen bewirken (Marigo *et al.*, 1996; Zhan und Helman, 1998; Yoon *et al.*, 1998; Übersichtsartikel: Johnson und Scott, 1997; Aza-Blanc und Kornberg, 1999). Erkenntnisse über die Zusammensetzung dieser Signaltransduktionskaskade und die Interaktionen der in ihr mitwirkenden Proteine stammen vornehmlich aus den Untersuchungen der *hedgehog* (Hh) Signaltransduktionskaskade in *D. melanogaster* (vgl. Abb. 4.10). Sie ist an vielen verschiedenen Prozessen bei der Entwicklung der Fruchtfliege, so z.B. bei der Ausbildung der Segmentierung, der Entwicklung von Flügeln, Beinen, Augen und Regionen des Gehirns, beteiligt (Ingham, 1998; McMahon, 2000).

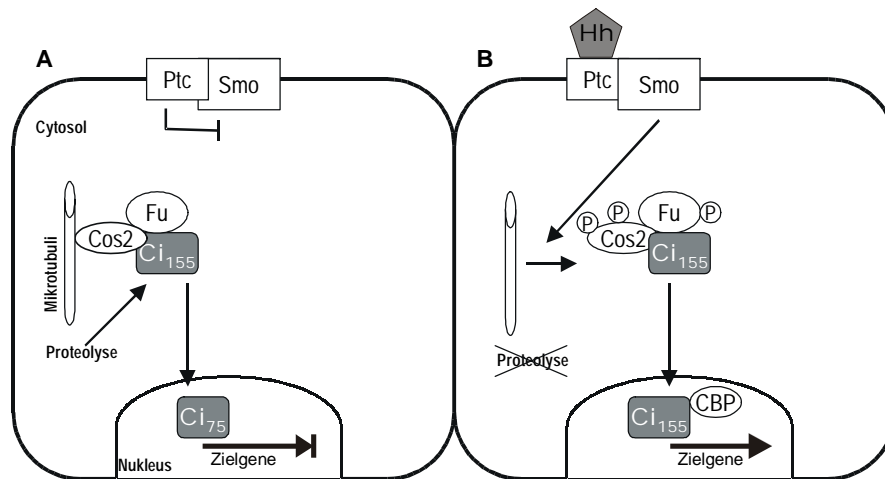


Abbildung 4.10: Schematische Darstellung der HH-Signaltransduktionskaskade (verändert nach Kalderon, 1997; Ingham, 1998). **(A)** In Abwesenheit des Hedgehog-Signals (Hh) reprimiert der Hh-Rezeptor Patched (Ptc) das für die intrazelluläre Signalweiterleitung verantwortliche Smoothed-Protein (Smo; vermutlich ein G Protein-gekoppelter Rezeptor). Dadurch bleibt der Cubitus interruptus (Ci)-Fused (Fu)-Costal2 (Cos2)-Komplex mit den Mikrotubuli assoziiert. Die Folge ist die proteolytische Spaltung der 155 kDa-Form von Ci. Das verkürzte Protein (Ci₇₅) transloziert in den Zellkern und wirkt dort als transkriptioneller Repressor der Hh-Zielgene (z.B. *decapentaplegic*, *wingless*, *patched*). **(B)** Die Bindung von Hh an seinen Rezeptor (Ptc) hebt die inhibitorische Wirkung von Ptc auf Smo auf. Aktiviertes Smo kann daraufhin zur intrazellulären Signalweiterleitung (vermutlich über ein G Protein) beitragen, was zur Ablösung des Ci-Fu-Cos2-Komplexes vom Zytoskelett (dies geht mit der Phosphorylierung von Fu und Cos2 einher) führt. Der daraus resultierende Wegfall der proteolytischen Spaltung von Ci₁₅₅ führt dazu, dass die 155 kDa-Form von Ci im Zellkern zusammen mit dem Coaktivatorprotein CBP (*cAMP-responsive element (CRE)-binding protein*) die transkriptionelle Aktivierung der Hh-Zielgene bewirkt.

Die SHH-Signaltransduktionskaskade spielt in Zielgeweben bei der Weiterleitung von Signalen embryonaler Organisationszentren eine wesentliche Rolle. So ist sie z.B. ein zentraler Teil der Prozesse, die zur Regulation der anterioren-posterioren Achsensymmetrie bei der Bildung von Gliedmaßen in Vertebraten beitragen. Ferner reguliert sie die Morphogenese verschiedener Organe, darunter Auge und Lunge. Das Signal, SHH, wirkt dabei als Morphogen und bewirkt, z.T. über das Vorliegen von Konzentrationsgradienten, die unterschiedliche Differenzierung von Zielzellen (Übersichtsartikel: McMahon, 2000).

Mutationen im *GLI3*-Gen sind in Patienten mit Greig-Cephalopolysyndaktyliesyndrom (GCPS), Pallister-Hall-Syndrom (PHS) und postaxialer Polysyndakylie Typ A (PAP-A) beschrieben (Vortkamp *et al.*, 1991; Kang *et al.*, 1997; Radhakrishna *et al.*, 1997). Nach einem von Biesecker (1997) aufgestellten Modell führen die mit den Syndromen assoziierten *GLI3*-Mutationen zur Bildung mehr oder weniger verkürzter Proteinisoformen. Gemäß diesem Modell bestimmen die verbliebenen funktionellen Domänen der mutanten Proteinisoformen deren Fähigkeit, mit DNA und/oder anderen Proteinen (z.B. analog Ci mit dem Zytoskelett, vgl. Abb. 4.10) in Wechselwirkung zu treten. Daraus resultiert eine Dysregulation der Zielgene von *GLI3*, die, je nach Ausmaß,

zu den unterschiedlich schweren phänotypischen Auswirkungen der drei genannten Krankheitsbilder führt.

Neben der Rolle bei der Steuerung von Entwicklungs- und Differenzierungsprozessen tritt die SHH-Signaltransduktionskaskade zunehmend in den Vordergrund des Interesses der Krebsforschung (Dean, 1998). Der Befund, dass verschiedene an der Signalweiterleitung beteiligte Proteine tumorsupprimierend bzw. onkogen wirken können, machen sie zu Kandidaten für Neoplasien. So konnte gezeigt werden, dass das humane Homolog des *Drosophila patched* Gens, *PTCH*, ein Tumorsuppressorgen ist, finden sich doch Keimbahnmutationen im *PTCH*-Gen in Gorlin-Syndrom-Patienten, die u.a. von Basalzellkarzinomen der Haut, Medulloblastomen und Fibrosarkomen des Ovars betroffen sind (OMIM 109400; Hahn *et al.*, 1996; Johnson *et al.*, 1996; Chidambaram *et al.*, 1996 alle in Dean 1998). Daneben finden sich auch in sporadischen Basalzellkarzinomen Mutationen im *PTCH*-Gen (Gailani *et al.*, 1996). Die Rolle von *PTCH* als Tumorsuppressorgen wird durch ein Mausmodell für das Gorlin-Syndrom unterstrichen: Die Mäuse, die heterozygot für eine Mutation in *Ptch* sind, entwickeln neben den oben genannten Neoplasien auch Rhabdomyosarkome, in denen das Wildtypallel ebenfalls mutiert vorliegt. In diesen Tumoren findet man weitere Mitglieder der Shh-Signaltransduktionskaskade, *Gli1* und *Igf2*, verstärkt exprimiert (Hahn *et al.*, 1998). *SMOH*, ein weiteres Mitglied der SHH-Signaltransduktionskaskade und der eigentliche SHH-Rezeptor (vgl. Abb. 4.10), wird dagegen als Protoonkogen beschrieben. So finden sich in einer Gruppe sporadischer Basalzellkarzinome Mutationen im *SMOH*-Gen, die funktionell vermutlich zu einer konstitutiven Aktivierung des SHH-Signalweges im Tumorgewebe führt (Xie *et al.*, 1998). Die Untersuchung des onkogenen Potenzials der mutanten Form von *SMOH* ergaben, dass es sich bei *SMOH* tatsächlich um ein Protoonkogen handelt, das in der mutierten Form zusammen mit dem Adenovirus E1A-Protein in der Lage ist, Zellen zu transformieren (Xie *et al.*, 1998).

Die beschriebenen funktionellen Zusammenhänge machen deutlich, dass einige Komponenten der SHH-Signaltransduktionskaskade wichtige Einflüsse auf die zelluläre Proliferationskontrolle ausüben. Der Befund, dass *GLI3* als ein zentraler Vermittler SHH-Signals in verschiedenen KMNs und WTs überexprimiert ist (vgl. Abb. 3.48 in Kap. 3.2.7.1; Zabel *et al.*, 1998; G. Klemm, persönliche Mitteilung), macht es zu einem aussichtsreichen Kandidatengen für die Wilmstumorgene. Mit seiner Lokalisation in 7p13 befindet sich das Gen in einer chromosomalen Region, die zuvor in einem Wilmstumorfalle mit einer Translokation t(7;7)(p13;q13) als einziger zytogenetischer Aberration identifiziert wurde (Sawyer *et al.*, 1993). Das Gen *PTCH* wurde in die chromosomale Bande 9q22.3 kartiert. Auch diese Region ist in verschiedenen

Wilmstumoren von spezifischen Aberrationen betroffen (Mitelman *et al.*, 1997), womit sich ein weiteres Gen der SHH-Signaltransduktionskaskade in einer Kandidatenregion für das Nephroblastom findet.

4.4 Ausblick

Der Wilmstumor ermöglicht die Anwendung verschiedenster Strategien, die zur Aufklärung seiner komplexen Genese evtl. aber auch weiterer Tumorgeneseprozesse führen können. Da es sich beim Nephroblastom um einen embryonalen Tumor handelt, dessen Ursachen in einer fehlerhaft ablaufenden Entwicklung der menschlichen Niere zu suchen sind, ist hier die besondere Situation gegeben, dass die normale Nierenentwicklung als Referenzsystem für die molekulare Untersuchung seiner Pathogenesemechanismen herangezogen werden kann. Die Identifikation von Kandidatengenen für das Malignom kann somit, neben der Klonierung der von chromosomalen Aberrationen betroffenen Genloci (genomischer Ansatz), durch Expressionsansätze (u. a. mit entwicklungsbiologischem Hintergrund; vgl. vorliegende Dissertation) ergänzt werden. Darüber hinaus ist es möglich, durch die Einordnung identifizierter Kandidatengene in bereits bekannte Signaltransduktionskaskaden, die Anzahl der Kandidatengene um die entsprechend involvierten Proteine zu erweitern („*pathway*-Ansatz“). Durch deren Assoziation mit physiologischen Prozessen, im Idealfall aber auch mit anderen Tumorerkrankungen, können so möglicherweise zusätzlich Erkenntnisse über die molekularen und zellulären Mechanismen der Pathogenese gewonnen werden. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit (ansatzweise) durch das identifizierte *GLI3*-Gen und dessen Einbettung in den SHH-Signalweg erreicht werden. Anhand der weiteren Charakterisierung des einzigen bisher klonierten Kandidatengens für das Nephroblastom, *WT1*, so z.B. die Identifikation *WT1*-regulierender Proteine (Transkriptionsfaktoren bzw. Interaktionspartner) und *WT1*-regulierter Gene (Zielgene) *in vitro* und in Tiermodellen, kann die Gruppe der Kandidatengene für den WT weiter ergänzt werden („*WT1*-Ansatz“). Zu diesem Zweck eignen sich besonders die im Rahmen der vorliegenden Arbeit generierte Deletionsreihe des *WT1*-Promotors in Reportergenplasmiden sowie die vorgestellte Zelllinie mit induzierbarer *WT1*-Expression. Ferner arbeitet die Gruppe an einer konditionalen *Wt1*-k.o.-Maus. Zusammen mit Kandidaten, die sich aus funktionellen Tests der initial isolierten Kandidatengene ergeben („funktionelle Ansätze“; Beispiele wären Proteininteraktionspartner von TM7SF1 oder Zielgene von TM7SF1 bzw. TCF2), sollte sich so das Bild von den molekularen Zusammenhängen der Metanephrogenese wie auch der Wilmstumorgenese vervollständigen lassen. Eine Möglichkeit, die identifizierten

Kandidatengene miteinander in Beziehung zu setzen bzw. deren Bedeutung für die WT-Pathogenese zu testen ist sicherlich die parallele Analyse ihrer Expression und/oder der genomischen Situation in WT-Gewebe nach Aufbringen auf DNA-*Microarrays*. Sollte ein solches Vorgehen an definiertem Tumormaterial zu signifikanten Korrelationen von Expressions- oder genomischem Profil mit bestimmten Tumorsubtypen führen, so ist die Anwendung dieser „DNA-Chips“ in der Diagnostik, z.B. für die Optimierung therapeutischer Ansätze, denkbar.

5 ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Dissertation wurden verschiedene Kandidatengene für den Wilmstumor (WT), eine Tumorerkrankung der Niere, identifiziert und charakterisiert. Dieses frühkindliche Malignom resultiert aus einer inkorrekt ablaufenden Metanephrogenese.

Aus diesem Grund wurde in einem Expressionsansatz die Isolation differenziell während der Nierenentwicklung und/oder der Wilmstumorgenese exprimierter Transkripte verfolgt. Zu diesem Zweck wurden die Genexpressionsmuster verschiedener humaner Wilmstumor- und Normalnierengewebe (adulte sowie fetale Niere) mit Hilfe der Technik des *differential display* verglichen und die als differenziell exprimiert identifizierten Gene kloniert und charakterisiert. Bei *TM7SF1* handelt es sich um ein neues Gen, dessen Transkription im Zuge der Metanephrogenese angeschaltet wird. Das von ihm codierte putative Protein kann aufgrund von Strukturvorhersagen vermutlich zur Familie G Protein-gekoppelter Rezeptoren gezählt werden. Die daraus ableitbare Funktion als Signalmolekül der Nierenentwicklung, sowie seine Lokalisation in einem WT-Lokus (1q42-q43) machen *TM7SF1* zu einem aussichtsreichen Kandidatengen für den WT. Darüber hinaus konnten im Zuge der vorliegenden Dissertation die Voraussetzungen für funktionelle Tests, die eine weitere Charakterisierung von *TM7SF1* erlauben, geschaffen werden (Identifikation und Klonierung des murinen Homologen, stabil überexprimierende WT-Zelllinien, Antikörper gegen den Aminoterminus des putativen Proteins). Mit *TCF2* wurde ein Gen identifiziert, dessen Produkt in Prozessen der Metanephrogenese eine Rolle spielt. Die signifikante Herunterregulation der *TCF2*-Expression in der großen Mehrzahl der untersuchten WTs, die innerhalb der vorliegenden Arbeit gezeigte Regulation durch das WT1-Genprodukt, sowie seine genomische Lokalisation in einem Intervall für die familiäre Form des WT (FWT1 in 17q12-q21) zeigen das Potenzial von *TCF2*, als Kandidatengen für den FWT zu gelten. Darüber hinaus wurde mit *GLI3* ein in verschiedenen WTs stark exprimiertes Gen identifiziert. Sein Produkt ist eine Komponente des entwicklungsbiologisch relevanten und in verschiedene Tumorerkrankungen involvierten *sonic hedgehog*-Signaltransduktionsweges. Insofern erfüllt *GLI3* die an ein WT-Kandidatengen zu stellenden Anforderungen – „Entwicklungsgen“ mit onkogenem Potenzial – sehr gut. Mit *FE7A3* und *CDT151* konnten zwei differenziell exprimierte cDNAs identifiziert werden, die Teile neuer Gene darstellen, und die in WT-Loci kartiert werden konnten. Aufgrund von Homologievergleichen im Bereich der identifizierten offenen Leserahmen konnte eine mögliche Bedeutung der Gene bzw. der putativen Genprodukte für die WT-Pathogenese

als Zelladhäsionsmolekül (FE7A3) bzw. als mit der Proliferation assoziiertem Transkriptionsfaktor (CDT151) herausgearbeitet werden.

Neben den komparativen Genexpressionsuntersuchungen wurde in einem zweiten Ansatz die transkriptionelle Regulation des einzigen bisher klonierten Wilmstumorgens (*WT1*) analysiert. Mit Hilfe vergleichender Reporteranalysen (Deletionsreihe des *WT1*-Promotors in Luciferase-Reportergenvektoren) in *WT1*-exprimierenden und nicht-exprimierenden Zelllinien konnten neue für die transkriptionelle Regulation von *WT1* relevante Bereiche identifiziert werden. Darüber hinaus wurde der für die Transkriptionsfaktoren SP1 und SP3 an anderen Promotoren beschriebene funktionelle Antagonismus für die *WT1*-Expression untersucht und in Gelretardationsanalysen mit dem *WT1*-Expressionsstatus von Zelllinien korreliert.

6 LITERATURVERZEICHNIS

Abbott, C., Piaggio, G., Ammendola, R., Solomon, E., Povey, S., Gounari, F., De Simone, V., Cortese, R. (1990). *Mapping of the gene TCF2 for the transcription factor LFB3 to human chromosome 17 by polymerase chain reaction*. Genomics 8: 165-167.

Aberle, H., Schwartz, H., Kemler, R. (1996). *Cadherin-catenin complex: protein interactions and their implications for cadherin function*. Journal of Cellular Biochemistry 61: 514-523.

Adachi, Y., Matsubara, S., Pedraza, C., Ozawa, M., Tsutsui, J., Takamatsu, H., Noguchi, H., Akiyama, T., Muramatsu, T. (1996). *Midkine as a novel target for the Wilms' tumor suppressor gene (WT1)*. Oncogene 13: 2197-2203.

Adams, M. D., Kelley, J. M., Gocayne, J. D., Dubnick, M., Polymeropoulos, M. H., Xiao, H., Merril, C. R., Wu, A., Olde, B., Moreno, R. F., Kerlavage, A. R., McCombie, W. R., Venter, J. C. (1991). *Complementary DNA sequencing: Expressed sequence tags and human genome project*. Science 252: 1651-1656.

Algar, E. M., Khromykh, T., Smith, S. I., Blackburn, D. M., Bryson, G. J., Smith, R. J. (1996). *A WT1 antisense oligonucleotide inhibits proliferation and induces apoptosis in myeloid leukemia cell lines*. Oncogene 12: 1005-1014.

Allen, L. F., Lefkowitz, R. J., Caron, M. G., Cotecchia, S. (1991). *G protein-coupled receptor genes as protooncogenes: constitutively activating mutation of the $\alpha 1\beta$ -adrenergic receptor enhances mitogenesis and tumorigenicity*. PNAS 88: 11354-11358.

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman, D. J. (1990). *Basic local alignment search tool*. Journal of Molecular Biology 215: 403-410.

Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D. M. (1997). *Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs*. Nucleic Acids Research 25: 3389-3402.

Altura, R. A., Valentine, M., Li, H., Boyett, J. M., Shearer, P., Grundy, P., Shapiro, D. N., Look, A. T. (1996). *Identification of novel regions of deletion in familial Wilms' tumor by comparative genomic hybridization*. Cancer Research 56: 3837-3841.

Apt, D., Watts, R. M., Suske, G., Bernard, H. U. (1996). *High Sp1/Sp3 ratios in epithelial cells during epithelial differentiation and cellular transformation correlate with the activation of the HPV-16 promoter*. Virology 224:281-291.

Austruy, E., Candon, S., Henry, I., Gyapay, G., Tournade, M. F., Mannens, M., Callen, D., Junien, C., Jeanpierre, C. (1995). *Characterization of regions of chromosomes 12 and 16 involved in nephroblastoma tumorigenesis*. Genes, Chromosomes and Cancer 14: 285-294.

Aza-Blanc, P., Kornberg, T. B. (1999). *Ci: a complex transducer of the hedgehog signal*. Trends in Genetics 15: 458-462.

Bach, I., Yaniv, M. (1993). *More potent transcriptional activators or a transdominant inhibitors of the HNF1 homeoprotein family are generated by alternative RNA processing*. EMBO Journal 12: 4229-4242.

Bais, C., Santomasso, B., Coso, O., Arvanitakis, L., Raaka, E. G., Gutkind, J. S., Asch, A. S., Cesarman E., Gershengorn, M. C., Mesri, E. A. (1998). *G protein-coupled receptor of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus is a viral oncogene and angiogenesis activator*. Nature 391: 86-89.

Barasch, J., Yang, J., Ware, C. B., Taga, T., Yoshida, K., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Parravicini, E., Malach, S., Aranoff, T., Oliver, J. A. (1999). *Mesenchymal to epithelial conversion in rat metanephros is induced by LIF*. Cell 99: 377-386.

- 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 Frasier-syndrome*. *Nature genetics* 17: 467-470.
- Bard, J. (1996). *A new role for the stromal cells in kidney development*. *BioEssays* 18: 705-707.
- 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.
- Bargmann, C. I., Hung, M.-C., Weinberg, R. A. (1986). *Multiple independent activations of the neu oncogene by a point mutation altering the transmembrane domain of p185*. *Cell* 45: 649-657.
- Becker, K. F., Atkinson, M. J., Reich, U., Becker, I., Nekarda, H., Siewert, J. R., Hofler, H. (1994). *E-cadherin gene mutations provide clues to diffuse type gastric carcinomas*. *Cancer Research* 54: 3845-3852.
- Beckwith, J. B., Kiviat, N. B., Bonadio, J. F. (1990). *Nephrogenic rests, nephroblastomatosis, 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.
- Bell, G. I., Fong, N. M., Stempien, M. M., Wormsted, M. A., Caput, D., Ku, L. L., Urdea, M. S., Rall, L. B., Sanchez Pescador, R. (1986). *Human epidermal growth factor precursor: cDNA sequence, expression in vitro and gene organization*. *Nucleic Acids Research* 14: 8427-8446.
- Benton, W. D., Davis, R. W. (1977). *Screening lambda gt recombinant clones by hybridization to single plaques in situ*. *Science* 196: 180-182.
- Bergmann, L., Miething, C., Maurer, U., Brieger, J., Karakas, T., Weidmann, E., Hölzer, 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.
- Betts, D. R., Kösters, R., Pluss, H. J., Niggli, F. K. (1997). *Routine karyotyping in Wilms' tumor*. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 96: 151-156.
- Betts, D. R., Ilg, E. C., Oezahin, H., von der Weid, N., Niggli, F. K. (1999). *Trisomy 1q generating translocations in Wilms' tumor*. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 112: 138-143.
- Biesecker, L. G. (1997). *Strike three for GLI3*. *Nature Genetics* 17: 259-260.
- Birchmeier, W., Behrens, J. (1994). *Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1198: 11-26.
- Blake, M. C., Jambou, R. C., Swick, A. G., Kahn, J. W., Azizkhan, J. C. (1990). *G-protein-coupled receptor of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus is a viral oncogene and angiogenesis activator*. *Molecular and Cellular Biology* 10: 6632-6641.
- Bourne, H. R. (1997). *How receptors talk to trimeric G proteins*. *Current Opinion in Cell Biology* 9: 134-142.
- Bove, K. B., McAdams, A. J. (1976). *The nephroblastomatosis complex and its relationship to Wilms tumor: A clinicopathologic treatise*. *Perspectives in Pediatric Pathology* 3: 185-223.
- Breslow, N. E., Olshan, A., Beckwith, J. 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.
- Brown, W. T., Puranik, S. R., Altman, D. H., Hardin, H. C. (1972). *Wilms' tumor in three successive generations*. Surgery 72: 756-761.
- Brüning, W., Winnett, E., Pelletier, J. (1995). *Wilms' tumor: a paradigm for insights into development and cancer*. Cancer Investigation 13: 431-443.
- Brüning, W., Pelletier, J. (1996). *A non-AUG translational initiation event generates novel WT1 isoforms*. Journal of Biological Chemistry 271: 8646-8654.
- 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., Yeager, H., Lewis, W. H., Jones, C., Housman, D. E. (1990). *Isolation and Characterization of a Zinc Finger Polypeptide Gene at the Chromosome 11 Wilms' Tumor Locus*. Cell 60: 509-520.
- Camp, V., Martin, P. (1996). *Programmed cell death and its clearance in the developing mammalian kidney*. Experimental Nephrology 4: 105-111.
- Campbell, C. E., Huang, A., Gurney, A. L., Kessler, P. M., Hewitt, J. A., Williams, B. R. G. (1994). *Antisense transcripts and protein binding motifs within the Wilms tumor (WT1) locus*. Oncogene 9: 583-595.
- Cappellen, D., De Oliveira, C., Ricol, D., Diez de Medina, S. G., Bourdin, J., Sastre-Garau, X., Chopin, D., Thiery, J. P., Radvanyi, F. (1999). *Frequent activating mutations of FGFR3 in human bladder and cervix carcinomas*. Nature genetics 23: 18-20.
- Caricasole, A., Duarte, A., Larsson, S., Hastie, N. D., Little, M., Holmes, G., Todorov, I., Ward, A. (1996). *RNA binding by the Wilms' tumor suppressor (WT1) zinc finger proteins*. PNAS 96: 2931-2936.
- Carlson, K. M., Dou, S., Chi, D., Scavarda, N., Toshima, K., Jackson, C. E., Wells, S. A. Jr., Goodfellow, P. J., Donis Keller, H. (1994). *Single missense mutation in the tyrosine kinase catalytic domain of the RET protooncogene is associated with multiple endocrine neoplasia type 2B*. PNAS 91: 1579-1583.
- Carulli, J. P., Artinger, M., Swain, P. M., Root, C. D., Chee, L., Tulig, C., Guerin, J., Osborne, M., Stein, G., Lian, J., Lomedico, P. T. (1998). *High Throughput Analysis of Differential Gene Expression*. Journal of Cellular Biochemistry Supplements 30/31: 286-296.
- Cavenee, W. K., Hansen, M. F., Nordenskjold, M., Kock, E., Maumenee, I., Squire, J. A (1985). *Genetic origin of mutations predisposing to retinoblastoma*. Science 228: 501-503.
- Cereghini, S., Ott, M. O., Power, S., Maury, M. (1992). *Expression patterns of vHNF1 and HNF1 homeoproteins in early postimplantation embryos suggest distinct and sequential developmental roles*. Development 116: 783-797.
- Cereghini, S. (1996). *Liver-enriched transcription factors and hepatocyte differentiation*. FASEB Journal 10: 267-282.
- 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: 991-1000.
- Charo, I. F., Myers, S. J., Herman, A., Franci, C., Connolly, A. J., Coughlin, S. (1994). *Molecular cloning and functional expression of two monocyte chemoattractant protein 1 receptors reveals alternative splicing of the carboxyl-terminal tails*. PNAS 91: 2752-2756.
- Chen, L. I., Nishinaka, T., Kwan, K., Kitabayashi, I., Yokoyama, K., Fu, Y.-H. F., Grunwald, S., Chiu, R. (1994). *The retinoblastoma gene product RB stimulates Sp1-mediated transcription by liberating Sp1 from a negative regulator*. Molecular and Cellular Biology 14: 4380-4389.

- Chidambaram, A., Goldstein, A. M., Gailani, M. R., Gerrard, B., Bale, S. J., Di Giovanna, J. J., Bale, A. E., Dean, M. (1996). *Mutations in the human homolog of the Drosophila patched gene in Caucasian and African American nevoid basal cell carcinoma syndrome patients*. *Cancer Research* 56: 4599-4601.
- Church, G. M., Gilbert, W. (1984). *Genomic sequencing*. *PNAS* 81: 1991-1995.
- Cohen, H. T., Bossone, S. A., Zhu, G., McDonald, G. A., Sukhatme, V. P. (1997). *SP1 is a Critical Regulator of the Wilms' tumor-1 Gene*. *Journal of Biological Chemistry* 272: 2901-2913.
- Coles, H. S. R., Burne, J. F., Raff, M. C. (1993). *Large-scale normal cell death in the developing rat kidney and its reduction by epidermal growth factor*. *Development* 118: 777-784.
- Collins, N., McManus, R., Wooster, R., Mangion, J., Seal, S., Lakhani, S. R., Ormiston, W., Daly, P., Ford, D., Easton, D. F., Stratton, M. R. (1995). *Consistent loss of the wild type allele in breast cancers from a family linked to the BRCA2 gene on chromosome 13q12-13*. *Oncogene* 10: 1673-1675.
- 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., Bonetta, L., Huang, A., Hoban, P., Chilton-MacNeill, S., Campbell, C. E., Wecksberg, R., Yeger, H., Reeve, A. E., Williams, B. R. G. (1992). *Loss of heterozygosity mapping in Wilms' tumor indicates the involvement of three distinct regions and a limited role for nondisjunction or mitotic recombination*. *Genes, Chromosomes and Cancer* 5: 326-334.
- Crespo, P., Xu, N., Simonds, W. F., Gutkind, J. S. (1994). *Ras-dependent activation of MAP kinase pathway mediated by G protein β subunits*. *Nature* 369: 418-420.
- Cserzo, M., Bernassau, J. M., Simon, I., Maigret, B. (1994). *New alignment strategy for transmembrane proteins*. *Journal of Molecular Biology* 243: 388-396.
- Dahmane, N., Lee, J., Robins, P., Heller, P., Ruiz i Altaba, A. (1997). *Activation of Gli1 and the sonic hedgehog signaling pathway in skin tumors*. *Nature* 389: 876-881.
- Datto, M. B., Yu, Y., Wang, X.-F. (1995). *Functional Analysis of the Transforming Growth Factor β Responsive Elements in the WAF1/Cip1/p21 Promoter*. *Journal of Biological Chemistry* 270: 28623-28628.
- Davies, J. A., Garrod, D. R. (1995). *Induction of early stages of kidney tubule differentiation by lithium ions*. *Developmental Biology* 167: 50-60.
- Davies, R., Moore, A., Schedl, A., Bratt, E., Miyahawa, K., Ladomery, M., Miles, C., Menke, A., van Heyningen, V., Hastie, N. D. (1999). *Multiple roles for the Wilms' tumor suppressor, WT1*. *Cancer Research (suppl)* 59: 1747s-1751s.
- Davis, R. C., Calvo, 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 and Development* 12: 3217-3225.
- Dean, M. (1998). *Cancer as a complex developmental disorder – nineteenth Cornelius P. Rhoads memorial award lecture*. *Cancer Research* 58: 5633-5636.
- Debernardi, S., Fontanella, E., De Gregorio, L., Pierotti, M. A., Delia, D. (1997). *Identification of a novel human kinesin-related gene (HK2) by the cDNA differential display technique*. *Genomics* 42: 67-73.
- Decker, J., Zabel, B. (2000). *Familiäre Tumorerkrankungen*. In: Wullich, B., Zang, K. (Hrsg.): *Genetik von Krankheiten des Urogenitalsystems*. Springer-Verlag, 275-302.
- Dehbi, M., Ghahremani, M., Lechner, M., Dressler, G., Pelletier, J. (1996). *The paired-box transcription factor, PAX2, positively modulates expression of the Wilms' tumor suppressor gene (WT1)*. *Oncogene* 13: 447-453.

- Dehbi, M., Pelletier, J. (1996). *PAX8-mediated activation of the wt1 tumor suppressor gene*. EMBO Journal 15: 4297-4306.
- Dehbi, M., Hiscott, J., Pelletier, J. (1998). *Activation of the wt1 Wilms' tumor suppressor gene by NF- κ B*. Oncogene 16: 2033-2039.
- DeLuca, P., Majello, B., Lania, L. (1996). *Sp3 represses transcription when tethered to promoter DNA or targeted to promoter proximal RNA*. Journal of Biological Chemistry 271: 8533-8536.
- Dennig, J., Hagen, G., Beato, M., Suske, G. (1995). *Members of the Sp transcription factor family control transcription from the uteroglobin promoter*. Journal of Biological Chemistry 270: 12737-12744.
- Dennig, J., Beato, M., Suske, G. (1996). *An inhibitor domain in Sp3 regulates its glutamine-rich activation domains*. EMBO Journal 15: 5659-5667.
- De Simone, V., De Magistris, L., Lazzaro, D., Gerstner, J., Monaci, P., Nicosia, A., Cortese, R. (1991). *LFB3, a heterodimer-forming homeoprotein of the LFB1 family, is expressed in specialized epithelia*. EMBO Journal 10: 1435-1443.
- Dey, B. R., Sukhatme, V. P., Roberts, A. B., Sporn, M. B., Rauscher, F. J. III, Kim, S. J. (1994). *Repression of the transforming growth factor-beta 1 gene by the Wilms' tumor suppressor WT1 gene product*. Molecular Endocrinology 8: 595-602.
- Dhanasekaran, N., Heasley, L. E., Johnson, G. L. (1995). *G protein-coupled receptor systems involved in cell growth and oncogenesis*. Endocrine Reviews 16: 239-270.
- Di Fiore, P. P., Pierce, J. J., Kraus, M. H., Segatto, O., King, C. R., Aaronson, S. A. (1987). *erbB-2 is a potent oncogene when overexpressed in NIH/3T3 cells*. Science 237: 178-182.
- Dikic, I., Blaukat, A. (1999). *Protein tyrosine-kinase-mediated pathways in G protein-coupled receptor signaling*. Cell Biochemistry and Biophysics 30: 369-387.
- Discenza, M. T., Dehbi, M., Pelletier, J. (1997). *Overlapping DNA recognition motifs between Sp1 and a novel trans-acting factor within the wt1 tumour suppressor gene promoter*. Nucleic Acids Research 25: 4314-4322.
- Donis Keller, H., Dou, S., Chi, D., Carlson, K. M., Toshima, K., Lairmore, T. C., Howe, J. R., Moley, J. F., Goodfellow, P., Wells, S. A. Jr. (1993). *Mutations in the RET proto-oncogene are associated with MEN 2A and FMTC*. Human Molecular Genetics 2: 851-856.
- Douglass, E. C., Green, A. A., Hayes, F. A., Etcubanas, E., Horowitz, M., Wilimas, J. A. (1985). *Chromosome 1 abnormalities: a common feature of pediatric solid tumors*. Journal of the National Cancer Institute 75: 51-54.
- Dudley, A. T., Godin, R. E., Robertson, E. J. (1999). *Interaction between FGF and BMP signaling pathways regulates development of metanephric mesenchyme*. Genes and Development 13: 1601-1613.
- Dynan, W. S., Tjian, R. (1983). *Isolation of transcription factors that discriminate between different promoters recognized by RNA polymerase II*. Cell 32: 669-680.
- Eccles, M. R., Grubb, G., Ogawa, O., Szeto, J., Reeve, A. E. (1994). *Cloning of novel Wilms tumor gene (WT1) cDNAs; evidence for antisense transcription of WT1*. Oncogene 9: 2059-2063.
- Eccles, M. R., Kankatsu, Y., Reeve, A. E., Fidler, A. E. (1995). *Comparative in Situ Hybridisation Analysis of PAX2, PAX8, and WT1 Gene Transcription in Human Fetal Kidney and Wilms' Tumors*. American Journal of Pathology 146: 40-45.
- Ekblom, P., Vestweber, D., Kemler, R. (1986). *Cell-matrix interactions and cell adhesion during development*. Annual Reviews in Cell Biology 2: 27-47.

- Eng, C., Mulligan, L. M., Smith, D. S., Healey, C. S., Frilling, A., Raue, F., Neumann, H. P. H., Pfragner, R., Behmel, A., Lorenzo, M. J., Stonehouse, T. J., Ponder, M. A., Ponder, B. A. J. (1995). *Mutation of the RET protooncogene in sporadic medullary thyroid carcinoma.* Genes, Chromosomes and Cancer 12: 209-212.
- Englert, C., Hou, X., Maheswaran, S., Bennett, P., Ngwu, C., Re, G. G., Garwin, A. J., Rosner, M. R., Haber, D. A. (1995). *WT1 suppresses synthesis of the epidermal growth factor receptor and induces apoptosis.* EMBO Journal 14: 4662-4675.
- Englert, C., Maheswaran, S., Garwin, A. J., Kreidberg, J., Haber, D. A. (1997). *Induction of p21 by the Wilms' tumor suppressor gene WT1.* Cancer Research 57: 1429-1434.
- Fearon, E. R., Vogelstein, B. (1990). *A genetic model for colorectal tumorigenesis.* Cell 61: 757-767.
- Feinberg, A. P., Vogelstein, B. (1983). *A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity.* Annals of Biochemistry 132: 6-13.
- Feinberg, A. P. (1996). *Multiple genetic Abnormalities of 11p15 in Wilms' tumor.* Medical and Pediatric Oncology 27: 484-486.
- Fong, T. M., Anderson, S. A., Yu, H., Huang, R. R., Strader, C. (1991). *Differential activation of intracellular effector by two isoforms of human neurokinin-1 receptor.* Molecular Pharmacology 41: 24-30.
- 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).* Journal of Biological Chemistry 269: 8892-8900.
- Fried, M. G., Crothers, D. M. (1981). *Equilibria and kinetics of lac repressor-operator interactions by polyacrylamide gel electrophoresis.* Nucleic Acids Research 9: 6505-6525.
- Froese, P., Lemke, H., Gerdes, J., Havsteen, B., Schwarting, R., Hansen, H., Lemke, H. (1987). *Biochemical characterization and biosynthesis of the Ki-1 antigen in Hodgkin-derived and virus-transformed human B and T lymphoid cell lines.* Journal of Immunology 139: 2081-2087.
- Gailani, M. R., Stahle-Backdahl, M., Leffel, D. J., Glynn, M., Zaphiropoulos, P. G., Pressman, C., Unden, A. B., Dean, M., Brash, D. E., Bale, A. E., Toftgard, R. (1996). *The role of the human homologue of Drosophila patched in sporadic basal cell carcinoma syndrome.* Nature Genetics 13: 78-81.
- 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.
- Getman, M. E., Houseal, T. W., Miller, G. A., Grundy, P. E., Cowell, J. K., Landes, G. M. (1998). *Comparative genomic hybridization and its application to Wilms' tumorigenesis.* Cytogenetics and Cell Genetics 82: 284-290.
- Glukhova, M., Deugnier, M. A., Thiery, J. P. (1995). *Tumour progression: the role of cadherins and integrins.* Molecular Medicine Today: 84-89.
- Goodyer, P., Dehbi, M., Torban, E., Bruening, W., Pelletier, J. (1995). *Repression of the retinoic acid receptor- α gene by the Wilms' tumor suppressor gene product WT1.* Oncogene 10: 1125-1129.
- Greenfield, A. (2000). *Applications of DNA microarrays to the transcriptional analysis of mammalian genomes.* Mammalian Genome 11: 609-613.
- Grundy, P., Koufos, A., Morgan, K., Li, F. P., Meadows, A. T., Cavenee, W. K. (1988). *Familial predisposition to Wilms' tumor does not map to the short arm of chromosome 11.* Nature 336: 374-376.
- 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.
- Grundy, P., Coppes, M. (1996). *An overview of the clinical and molecular genetics of Wilms' tumor.* Medical and Pediatric Oncology 27: 394-397.

- Grunstein, M., Wallis, J. (1979). *Colony hybridization*. Methods in Enzymology 68: 379-389.
- Gutkind, J. S. (1998). *The pathways connecting G protein-coupled receptors to the nucleus through divergent mitogen-activated protein kinase cascades*. Journal of Biological Chemistry 273: 1839-1842.
- Haber, D. A., Sohn, R. L., Buckler, A., Pelletier, J., Call, K. M., Housman, D. E. (1991). *Alternative splicing and genomic structure of the Wilms' tumor gene*. PNAS 88: 9618-9622.
- Haga, T., Haga, K., Kameyama, K. (1994). *G protein-coupled receptor kinases*. Journal of Neurochemistry 63: 400-412.
- Hagen, G., Müller, S., Beato, M., Suske, G. (1992). *Cloning by recognition site screening of two novel GT box binding proteins: a family of Sp1 related genes*. Nucleic Acids Research 20: 5519-5525.
- Hagen, G., Müller, S., Beato, M., Suske, G. (1994). *Sp1-mediated transcriptional activation is repressed by Sp3*. EMBO Journal 13: 3843-3851.
- Hahn, H., Wicking, C., Zaphiropoulos, P. G. et al. (1998). *Rhabdomyosarcomas and radiation hypersensitivity in a mouse model of Gorlin's syndrome*. Nature Medicine 4: 619-622.
- Hanahan, D. (1985). *Techniques for transformation in Escherichia coli*. DNA cloning I: 109-135.
- Hanahan, D., Weinberg, R. A. (2000). *The hallmarks of cancer*. Cell 100: 57-70.
- Hansen, H., Lemke, H., Bredfeldt, G., Könnecke, I., Havsteen, B. (1989). *The Hodgkin-associated Ki-1 antigen exists in an intracellular and a membrane-bound form*. Biological Chemistry Hoppe Seyler 370: 409-416.
- Hansen, H., Bredfeldt, G., Havsteen, B., Lemke, H. (1990). *Protein kinase activity of the intracellular but not the membrane-associated form of the Ki-1 antigen (CD30)*. Research in Immunology 141: 13-31.
- Harms, D., Schmidt, D. (1997). *Tumoren des Kindesalters*. In: Pathologie. Remmler, W. (Hrsg.), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York: 501-550.
- Harrington, M. A., Konicek, B., Song, A., Xia, X.-L., Fredericks, W. J., Rauscher, F. J. III (1993). *Inhibition of the colony-stimulating factor-1 promoter activity by the product of the Wilms' tumor locus*. Journal of Biological Chemistry 268: 21271-21275.
- Hatada, I., Ohashi, H., Fukushima, Y., Kaneko, Y., Inoue, M., Komoto, Y., Okada, A., Ohishi, S., Nabetani, A., Morisaki, H., Nakayama, M., Niikawa, M., Mukai, T. (1996). *An imprinted gene p57 (KIP2) is mutated in Beckwith-Wiedemann syndrome*. Nature Genetics 14: 171-173.
- Hatada, I., Nabetani, A., Morisaki, H., Xin, Z., Ohishi, S., Tonoki, H., Niikawa, N., Inoue, M., Komoto, Y., Okada, A., Steichen, E., Ohashi, H., Fukushima, Y., Nakayama, M., Mukai, T. (1997). *New p57 (KIP2) mutations in Beckwith-Wiedemann syndrome*. Human Genetics 100: 681-683.
- Hatini, V., Huh, S. O., Herzlinger, D., Soares, V. C., Lai, E. (1996). *Essential role of stromal morphogenesis in kidney morphogenesis revealed by targeted disruption of winged helix transcription factor Bf-2*. Genes and Development 10: 1467-1478.
- Hayward, N. K., Little, M. H., Mortimer, R. H., Clouston, W. M., Smith, P. J. (1988). *Generation of homozygosity at the c-Ha-ras-1 locus of chromosome 11p in an adrenal adenoma from an adult with Wiedemann-Beckwith syndrome*. Cancer Genetics and Cytogenetics 30: 127-132.
- Henry, I., Jeanpierre, M., Couillin, P., Barichard, F., Serre, J. L., Journal, H., Lamouroux, A., Turleau, C., de Grouchy, J., Junien, C. (1989a). *Molecular definition of the 11p15.5 region involved in Beckwith-Wiedemann syndrome and probably in predisposition to adrenocortical carcinoma*. Human Genetics 81: 273-277.
- Henry, I., Grandjouan, S., Couillin, P., Barichard, F., Huerre-Jeanpierre, C., Glaser, T., Philip, T., Lenoir, G., Chaussain, J. L., Junien, C. (1989b). *Tumor-specific loss of 11p15.5 alleles in del 11p13 Wilms tumor and in familial adrenocortical carcinoma*. PNAS 86: 3247-3251
- Herskowitz, I. (1995). *MAP kinase pathways in yeast: for mating and more*. Cell 80: 187-197.

- Hewitt, S. M., Hamada, S., McDonnell, T. J., Rauscher F. J. III, Saunders, G. F. (1995). *Regulation of the proto-oncogenes Bcl-2 and c-myc by the Wilms' tumor suppressor gene WT1*. *Cancer Research* 55: 5386-5389.
- Hewitt, J. A., Kessler, P. M., Campbell, C. E., Williams, B. R. G. (1996). *Tissue-Specific Regulation of the WT1-Locus*. *Medical and Pediatric Oncology* 27: 456-461.
- Hieter, P., Boguski, M. (1997). *Functional Genomics: It's All How You Read It*. *Science* 278: 601-602.
- Hofmann, W., Royer, H.-D., Drechsler, M., Schneider, S., Royer-Pokora, B. (1993). *Characterization of the regulatory region of the human WT1 gene*. *Oncogene* 8: 3123-3132.
- Hofstra, R. M., Landsvater, R. M., Ceccherini, I., Stulp, R. P., Stelwagen, T., Luo, Y., Pasini, B., Hoppener, J. W., van Amstel, H. K., Romeo, G. et al. (1994). *A mutation in the RET proto-oncogene associated with multiple endocrine neoplasia type 2B and sporadic medullary thyroid carcinoma*. *Nature* 367: 375-376.
- Hohenfellner, K., Holl, M., Gutjahr, P., Zabel, B. (1988). *Cytogenetic findings in Wilms' tumor*. *Klinische Pädiatrie* 201: 293-298.
- Hoovers, J. M. N., Kalikin, L. M., Johnson, L. A., Alders, M., Redeker, B., Law, D. J., Blik, J., Steenman, M., Benedict, M., Wiegant, J., Lengauer, C., Taillon-Miller, P., Schlessinger, D., Edwards, M. C., Elledge, S. J., Ivens, A., Westerveld, A., Little, P., Mannens, M., Feinberg, A. P. (1995). *Multiple genetic loci within 11p15 defined by Beckwith-Wiedemann syndrome rearrangement breakpoints and subchromosomal transferable fragments*. *PNAS* 92: 12456-12460.
- Horikawa, Y., Iwasaki, N., Hara, M. et al. (1997). *Mutation in hepatocyte nuclear factor 1 β gene (TCF2) associated with MODY*. *Nature Genetics* 17: 384-385.
- Horowitz, J. M., Park, S.-H., Bogenmann, E., Cheng, J.-C., Yandell, D. W., Kaye, F. J., Minna, J. D., Dryja, T. P., Weinberg, R. A. (1990). *Frequent inactivation of the retinoblastoma antioncogene is restricted to a subset of human tumor cells*. *PNAS* 87: 2775-2779.
- Hosono, S., Gross, I., English, M. A., Hajra, K. M., Fearon, E. R., Licht, J. D. (2000). *E-cadherin Is a WT1 Target Gene*. *Journal of Biological Chemistry* 275: 10943-10953.
- Hsu, S. Y., Kubo, M., Chun, S. Y., Haluska, F. G., Housman, D. E., Hsueh, A. J. (1995). *Wilms' tumor protein WT1 as an ovarian transcription factor: decreases in expression during follicle development and repression of inhibin-alpha gene promoter*. *Molecular Endocrinology* 9: 1356-1366.
- Huang, A., Campbell, C. E., Bonetta, L., McAndrews-Hill, M. S., Chilton-MaNeill, 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.
- Huff, V., Compton, D. A., Chao, L. Y., Strong, L. C., Geiser, C. F., Saunders, G. F. (1988). *Lack of linkage of familial Wilms' tumor to chromosomal band 11p13*. *Nature* 336: 377-378.
- Huff, V., Reeve, A. E., Leppert, M., Strong, L. C., Douglass, E. C., Geiser, C. F., Li, F. P., Meadows, A., Callen, D. F., Lenoir, G., Saunders, G. F. (1992). *Nonlinkage of 16q markers to familial predisposition to Wilms' tumor*. *Cancer Research* 52: 6117-6120.
- Huff, V., Amos, C. I., Douglass, E. C., Fisher, R., Geiser, C. F., Krill, C. E., Li, F. P., Strong, L. C., McDonald, J. M. (1997). *Evidence for genetic heterogeneity in familial Wilms' tumor*. *Cancer Research* 57: 1859-1862.
- Huff, V. (1998). *Wilms tumor genetics*. *American Journal of Medical Genetics* 79: 260-267.
- Hui, C.-C., Slusarski, D., Platt, K. A., Holmgren, R., Joyner, A. L. (1994). *Expression of three mouse homologs of the Drosophila segment polarity gene cubitus interruptus, Gli, Gli-2, and Gli-3, in ectoderm- and mesoderm-derived tissues suggests multiple roles during postimplantation development*. *Developmental Biology* 162: 402-413.
- Ingham, P. W. (1998). *Transducing hedgehog: the story so far*. *EMBO Journal* 17: 3505-3511.

- Inoue, K., Sugiyama, H., Ogawa, H., Nakagawa, M., Yamagami, T., Miwa, H., Kita, K., Hiraoka, A., Masaoka, T., Nasu, K., Kyo, T., Dohy, H., Nakauchi, H., Ishidate, T., Akiyama, T., Kishimoto, T. (1994). *WT1 as a new prognostic factor and a new marker for the detection of minimal residual disease in acute leukemia*. Blood 84: 3071-3079.
- Ioannou, P. A., Amemiya, C. T., Garnes, J., Kroisel, P. M., Shizuya, H., Chen, C., Batzer, M. A., de Jong, P. (1994). *A new bacteriophage P1-derived vector for the propagation of large human DNA fragments*. Nature genetics 6: 84-89.
- Jankowski, J. A., Bedford, F. K., Kim, Y. S. (1997). *Changes in gene structure and regulation of E-cadherin during epithelial development, differentiation, and disease*. Progressions in Nucleic Acids Research and Molecular Biology 57: 187-215.
- Johnson, R. L., Rothman, A. L., Xie, J., Goodrich, L. V., Bare, J. W., Bonifas, J. M., Quinn, A. G., Myers, R. M., Cox, D. R., Epstein, E. H. Jr., Scott, M. P. (1996). *Human homolog of patched, a candidate gene for the basal cell nevus syndrome*. Science 272: 1668-1671.
- Johnson, R. L., Scott, M. P. (1997). *Control of cell growth and fate by patched genes*. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology LXII: 205-215.
- Kadonaga, J. T., Carber, K. R., Masiarz, F. R., Tjian, R. (1987). *Isolation of cDNA encoding transcription factor Sp1 and functional analysis of the DNA binding domain*. Cell 51: 1079-1090.
- Kalderon, D. (1997). *Hedgehog signalling: Ci complex cuts and clasps*. Current Biology 7: 759-762.
- Kang, S., Graham, J. M. Jr., Haskins Olney, A., Biesecker, L. G. (1997). *GLI3 frameshift mutations cause autosomal dominant Pallister-Hall syndrome*. Nature Genetics 15: 266-268.
- Karlseder, J., Rotheneder, H., Wintersberger, E. (1996). *Interaction of Sp1 with the Growth- and Cell Cycle-Regulated Transcription Factor E2F*. Molecular and Cellular Biology 16: 1659-1667.
- Kennedy, D., Ramsdale, T., Mattick, J., Little, M. (1996). *An RNA recognition motif of WT1 revealed by structural modelling*. Nature genetics 12: 329-332.
- Kenneth, M. R., Lamperti, E. D., Villa-Komaroff, L. (1990). *Optimizing the Northern Blot Procedure*. BioTechniques 8: 398-403.
- Kim, S.-J., Lee, H.-D., Robbins, P. D., Busam, K., Sporn, M. B., Roberts, A. B. (1991). *Regulation of transforming growth factor beta 1 gene expression by the product of the retinoblastoma-susceptibility gene*. PNAS 88: 3052-3056.
- Kim, S.-J., Onwuta, U. S., Lee, Y. I., Li, R., Botchan, M. R., Robbins, P. D. (1992). *The retinoblastoma gene product regulates Sp1-mediated transcription*. Molecular and Cellular Biology 12: 2455-2463.
- 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: 2289-2299.
- Kinane, T. B., Finder, J. D., Kawashima, A., Brown, D., Abbate, M., Fredericks, W. J., Sukhatme, V. P., Rauscher, F. J. III, Ercolani, L. (1996). *LLC-PK1 cell growth is repressed by WT1 inhibition of G-protein alpha i-2 protooncogene transcription*. Journal of Biological Chemistry 271: 30760-30764.
- Kingsley, C., Winoto, A. (1992). *Cloning of GT box-binding proteins: a novel Sp1 multigene family regulating T-cell receptor gene expression*. Molecular and Cellular Biology 12: 4251-4261.
- King-Underwood, L., Renshaw, J., Pritchard-Jones, K. (1996). *Mutations in the Wilms' tumor gene WT1 in leukaemias*. Blood 87: 2171-2179.
- Kinzler, K. W., Bigner, S. H., Bigner, D. D., Trent, J. M., Law, M. L., O'Brien, S. J., Wong, A. J., Vogelstein, B. (1987). *Identification of an amplified, highly expressed gene in a human glioma*. Science 236: 70-73.

- Kinzler, K. W., Vogelstein, B. (1996). *Lessons from hereditary colorectal cancer*. Cell 87: 159-170.
- Kispert, A., Vainio, S., Shen, L., Rowitch, D. H., McMahon, A. P. (1996). *Proteoglycans are required for maintenance of Wnt-11 expression in the ureter tips*. Development 122: 3627-3637.
- Klamt, B., Koziell, A., Poulat, F., Wieacker, P., Scambler, P., Berta, P., Gessler, M. (1998). *Fraiser syndrome is caused by defective alternative splicing of WT1 leading to an altered ratio of WT1 +/-KTS splice isoforms*. Human Molecular Genetics 7: 709-717.
- Klein, P., Kanehisa, M., DeLisi, C. (1985). *The detection and classification of membrane-spanning proteins*. Biochimica et Biophysica Acta 815: 468-476.
- Klein, G., Langegger, M., Goridis, C., Ekblom, P. (1988). *Neural cell adhesion molecules during embryonic induction and development of the kidney*. Development 102: 749-761.
- Klein, P. S., Melton, D. A. (1996). *A molecular mechanism for the effect of lithium on development*. PNAS 93: 8455-8459.
- Klever, M., Grond-Ginsbach, C., Scherthan, H., Schröder-Kurth, T. M. (1991). *Chromosomal in situ suppression hybridization after Giemsa banding*. Human Genetics 86: 484-486.
- Knudson, A. G. (1971). *Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma*. PNAS 68: 820-823.
- Knudson, A. G. (1993). *Antioncogenes and human cancer*. PNAS 90: 10914-10921.
- 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: 313-324.
- Kobarg, J., Schnittger, S., Fonatsch, C., Lemke, H., Bowen, M. A., Buck, F., Hansen, H. P. (1997). *Characterization, Mapping and partial cDNA sequence of the 57-kD intracellular Ki-1 antigen*. Experimental and Clinical Immunogenetics 14: 273-280.
- Kohmura, N., Senzaki, K., Hamada, S., Kai, N., Yasuda, R., Watanabe, M., Ishii, H., Yasuda, M., Mishina, M., Yagi, T. (1998). *Diversity revealed by a novel family of cadherins expressed in neurons at a synaptic complex*. Neuron 20: 1137-1151.
- Kolakowski, L. F. (1994). *GCRDb: A G protein-coupled receptor database, receptors and channels*. International Journal of Receptors, Channels and Transporters 2: 1-7.
- Kondo, K., Chilcote, R. R., Maurer, H. S., Rowley, J. D. (1988). *Chromosome abnormalities in tumor cells from patients with sporadic Wilms' tumor*. Cancer Research 44: 5376-5381.
- Koseki, C., Herzlinger, D., Al-Alwquati, Q. (1992). *Apoptosis in metanephric development*. Journal of Cell Biology 119: 1327-1333.
- 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. (1996). *Interpreting cDNA sequences: some insights from studies on translation*. Mammalian Genome 7: 563-574.
- Kreidberg, J. A., Sariola, H., Loring, J. M., Maeda, M., Pelletier, J., Housman, D. E., Jaenisch, R. (1993). *WT-1 is required for early kidney development*. Cell 74: 679-691.
- Ladanyi, M., Gerald, W. (1994). *Fusion of the EWS and WT1 genes in the desmoplastic small round cell tumor*. Cancer Research 54: 350-359.
- Laemmli, U. K. (1970). *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature 227: 680-682.

- Larsson, S. H., Charlier, J.-P., Miyagawa, K., Engelkamp, D., Rassoulzadegan, M., Ross, A., Cuzin, F. et al. (1995). *Subnuclear localization of WT1 in splicing or transcription factor domains is regulated by alternative splicing*. Cell 81: 391-401.
- Lazzaro, D., De Simone, V., De Magistris, L., Lehtonen, E., Cortese, R. (1992). *LFB1 and LFB3 homeoproteins are sequentially expressed during kidney development*. Development 114: 469-479.
- 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, M. P., DeBaun, M., Randhawa, G., Reichard, B. A., Elledge, S. J., Feinberg, A. P. (1997). *Low frequency of p57 (KIP2) mutation in Beckwith-Wiedemann syndrome*. American Journal of Human Genetics 61: 304-309.
- 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.
- Lefkowitz, R. J. (1993). *G protein-coupled receptor kinases*. Cell 74: 409-412.
- Legius, E., Marchuk, D. A., Collins, F. S., Glover, T. W. (1993). *Somatic deletion of the neurofibromatosis type 1 gene in a neurofibrosarcoma supports a tumour suppressor gene hypothesis*. Nature Genetics 3: 122-126.
- Lemieux, N., Dutrillaux, B., Viegas-Péquignot, E. (1992). *A simple method for simultaneous R- or G-banding and fluorescence in situ hybridization of small copy genes*. Cytogenetics and Cell Genetics 43: 311-312.
- Li, J.-M., Nichols, M. A., Chandrasekharan, S., Xiong, Y., Wang, X.-F. (1995). *Transforming Growth Factor β Activates the Promoter of Cyclin-dependent Kinase Inhibitor p15^{INK4B} through an Sp1 Consensus Site*. Journal of Biological Chemistry 270: 26750-26753.
- Li, M., Squire, J., Weksberg, R. (1998). *Molecular genetics of Wiedemann-Beckwith syndrome*. American Journal of Medical Genetics 79: 253-259.
- Liang, P., Pardee, A. B. (1992). *Differential Display of Eukaryotic Messenger RNA by Means of the Polymerase Chain Reaction*. Science 257: 967-971.
- Liang, P., Averboukh, L., Pardee, A. B. (1993). *Distribution and cloning of eukaryotic mRNAs by means of differential display: refinements and optimization*. Nucleic Acids Research 21: 3269-3275.
- Liang, P., Zhu, W., Zhang, X., Guo, Z., O'Connell, R. P., Averboukh, L., Wang, F., Pardee, A. B. (1994). *Differential display using one-base anchored oligo-dT primers*. Nucleic Acids Research 22: 5763-5764.
- Liang, P., Pardee, A. B. (1995). *Recent Advances in differential display*. Current Opinion in Immunology 7: 274-280.
- Lichter, P., Cremer, T., Borden, J., Manuelidis, L., Ward, D. C. (1988). *Delineation of individual human chromosomes in metaphase and interphase cells by in situ suppression hybridization using recombinant DNA libraries*. Human Genetics 80: 224-234.
- Lin, S.-Y., Black, A. R., Kostic, D., Pajovic, S., Hoover, C. N., Azizkhan, J. C. (1996). *Cell Cycle-Regulated Association of E2F1 and Sp1 Is Related to Their Functional Interaction*. Molecular and Cellular Biology 16: 1668-1675.
- Lindner, T. H., Njølstad, P. R., Horikawa, Y., Bostad, L., Bell, G. I., Søvik, O. (1999). *A novel syndrome of diabetes mellitus, renal dysfunction and genital malformation associated with a partial deletion of the pseudo-POU domain of hepatocyte nuclear factor 1 β* . Human Molecular Genetics 8: 2001-2008.

- Lipschutz, J. H. (1998). *Molecular development of the kidney: A review of the results of gene disruption studies*. American Journal of Kidney Diseases 31: 383-397.
- Little, M. H., Thomson, D. B., Hayward, N. K., Smith, P. J. (1988). *Loss of alleles on the short arm of chromosome 11 in a hepatoblastoma from a child with Beckwith-Wiedemann syndrome*. Human Genetics 79: 186-189.
- Little, M. H., Williamson, K. A., Mannens, M., Kelsey, A., Gosden, C., Hastie, N. D., van Heyningen, V. (1993). *Evidence that WT1 mutations in Denys-Drash syndrome patients may act in a dominant-negative fashion*. Human Molecular Genetics 2: 259-264.
- Little, M., Wells, C. (1997). *A Clinical Overview of WT1 Gene Mutations*. Human Mutation 9: 209-225.
- Little, M., Holmes, G., Walsh, P. (1999). *WT1: what the last decade told us?* BioEssays 21: 191-202.
- Liu, W., Qian, C., Francke, U. (1997). *Silent mutation induces exon skipping of fibrillin-1 gene in Marfan syndrome*. Nature genetics 16: 328-329.
- 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: 197-199.
- Löbber, R. W., Klemm, G., Grüttner, H.-P., Harms, D., Winterpacht, A., Zabel, B. U. (1998). *Novel WT1 Mutation, 11pLOH, and t(7;12)(p22;q22) Chromosomal Translocation Identified in a Wilms' Tumor Case*. Genes, Chromosomes and Cancer 21: 347-350.
- Lohse, M. J., Benovic, J. L., Codina, J., Caron, M. G., Lefkowitz, R. J. (1990). *Beta-arrestin: a protein that regulates beta-adrenergic receptor function*. Science 248: 1547-1550.
- Lohse, M. J., Andexinger, S., Pitcher, J., Trukawinski, S., Codina, J., Faure, J.-P., Caron, M. G., Lefkowitz, R. J. (1992). *Receptor-specific desensitization with purified proteins. Kinase dependence and receptor specificity of beta-arrestin and arrestin in the beta₂-adrenergic receptor and rhodopsin systems*. Journal of Biological Chemistry 267: 8558-8564.
- MacGregor, H. C., Mizuno, S. (1976). *In situ hybridization of „nick-translated“ 3H-ribosomal DNA to chromosomes from salamanders*. Chromosoma 54: 15-25.
- Mannens, M., Slater, R. M., Heyting, C., Blik, J., Hoovers, J., Bleeker-Wagemakers, E. M., Voute, P. A., Coad, N., Frants, R. R., Pearson, P. L. (1987). *Chromosome 11, Wilms' tumour and associated congenital diseases*. Cytogenetics and Cell Genetics 46: 655.
- Mannens, M., Hoovers, J. M. N., Redeker, E., Verjaal, M., Feinberg, A. P., Little, P., Boavida, M., Coad, N., Steenman, M., Blik, J., Slater, R. M., deBoer, E. G., John, R., Cowell, J. K., Junien, C., Henry, I., Tommerup, N., Niiikawa, N., Weksberg, R., Puschel, S. M., Leschot, N. J., Westerveld, A. (1994). *Parental imprinting of human chromosome region 11p15.4-pter involved in the Beckwith-Wiedemann syndrome and various human neoplasia*. European Journal of Human Genetics 2: 3-23.
- Mannens, M., Alders, M., Redeker, B., Blik, J., Steenman, M., Wiesmeyer, C., de Meulemeester, M., Ryan, A., Kalikin, L., Voute, T., DeKraker, J., Hoovers, J., Slater, R., Feinberg, A. P., Little, M., Westerveld, A. (1996). *Positional cloning of genes involved in the Beckwith-Wiedemann Syndrome, Hemihypertrophy, and associated childhood tumors*. Medical and Pediatric Oncology 27: 490-494.
- 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.
- Marigo, V., Johnson, R. L., Vortkamp, A., Tabin, C. J. (1996). *Sonic hedgehog differentially regulates expression of GLI and GLI3 during limb development*. Developmental Biology 180: 273-283.
- Martel, C., Harper, F., Cereghini, S., Noë, Mareel, M., Crémisi, C. (1997). *Inactivation of Retinoblastoma family proteins by SV40 T antigen results in creation of a hepatocyte growth factor/scatter factor autocrine loop associated with an epithelial-fibroblastoid conversion and invasiveness*. Cell Growth and Differentiation 8: 165-178.

- Martin, K. J., Kwan, C.-P., O'Hare, M. J., Pardee, A. B., Sager, R. (1998). *Identification and Verification of Differential Display cDNAs Using Gene-Specific Primers and Hybridization Arrays*. *BioTechniques* 24: 1018-1026.
- Martinerie, C., Chevalier, G., Rauscher, F. J. III, Perbal, B. (1996). *Regulation of nov by WT1: a potential role for nov in nephrogenesis*. *Oncogene* 12: 1479-1492.
- Maslen, C., Babcock, D., Raghunath, M., Steinmann, B. (1997). *A rare branch-point mutation is associated with missplicing of fibrillin-2 in a large family with congenital contractural arachnodactyly*. *American Journal of Human Genetics* 60: 1389-1398.
- Mason, P. J., Enver, T., Wilkinson, D., Williams, G. J. (1993). *Assay of gene transcription in vivo*. In: *Gene Transcription: A practical approach*. Oxford University Press.
- Maw, M. A., Grundy, P. E., Millow, L. J., Eccles, M. R., Dunn, R. S., Smith, P. J., Feinberg, A. P., Law, D. J., Paterson, M. C., Telzerow, P. E., Callen, D. F., Thompson, A. D., Richards, R. I., Reeve, A. E. (1992). *A third Wilms' tumor locus on chromosome 16q*. *Cancer Research* 52: 3094-3098.
- McCann, S., Sullivan, J., Guerra, J., Arcinas, M., Boxer, L. M. (1995). *Repression of the c-myc gene by WT1 protein in T and B cells*. *Journal of Biological Chemistry* 270: 23785-23799.
- 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.
- McMahon, A. P. (2000). *More surprises in the hedgehog signaling pathway*. *Cell* 100: 185-188.
- Mendel, D. B., Hansen, L. P., Graves, M. K., Conley, P. B., Crabtree, G. R. (1991a). *HNF-1 α and HNF-1 β (*vHNF-1*) share dimerization and homeo domains, but not activation domains, and form heterodimers in vitro*. *Genes and Development* 5: 1042-1056.
- Mendel, D. B., Khavari, P. A., Conley, P. B., Graves, M. K., Hansen, L. P., Admon, A., Crabtree, G. R. (1991b). *Characterization of a cofactor that regulates dimerization of a mammalian homeodomain protein*. *Science* 254: 1762-1767.
- Mertens, F., Johansson, B., Höglund, M., Mitelman, F. (1997). *Chromosomal Imbalance Maps of Malignant Solid Tumors: A Cytogenetic Survey of 3185 Neoplasms*. *Cancer Research* 57: 2765-2780.
- 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.
- Mitelman, F., Mertens, F., Johansson, B. (1997). *A breakpoint map of recurrent chromosomal rearrangements in human neoplasia*. *Nature Genetics* 15 (special issue): 417-474.
- Miwa, H., Tomlinson, G. E., Timmons, C. F., Huff, V., Cohn, S. L., Strong, L. C., Saunders, G. F. (1992). *RNA expression of the WT1 gene in Wilms' tumors in relation to histology*. *Journal of the National Cancer Institute* 84: 181-187.
- Miyagawa, K., Kent, J., Moore, A., Charlier, J. P., Little, M. H., Williamson, K. A., Kelsey, A., Brown, K. W., Hassam, S., Briner, J., Hayashi, Y., Hirai, H., Yazaki, Y., vanHeyningen, V., Hastie, N. D. (1998). *Loss of WT1 function leads to ectopic myogenesis in Wilms' tumour*. *Nature genetics* 18: 15-17.
- Miyamoto, N., Yoshida, M., Kuratani, S., Matsuo, I., Aizawa, S. (1997). *Defects of urogenital development in mice lacking Emx2*. *Development* 124: 1653-1664.
- Moffett, P., Bruening, W., Nakagama, H., Bardeesy, N., Housman, D. E., Pelletier, J. (1995). *Antagonism of WT1 activity by protein self-association*. *PNAS* 92: 11105-11109.
- Moshier, J. A., Skunca, M., Wu, W., Boppana, S. M., Rauscher, F. J. III, Dosesco, J. (1996). *Regulation of ornithine decarboxylase gene expression by the Wilms' tumor suppressor WT1*. *Nucleic Acids Research* 24: 1149-1157.

- Mou, L., Miller, H., Li, J., Wang, E., Chalifour, L. (1994). *Improvements to the differential display method for gene analysis*. Biochemical and Biophysical Research Communications 199: 564-569.
- Moulton, T., Chung, W.-Y., Yuan, L., Hensle, T., Waber, P., Nisen, P., Tycko, B. (1996). *Genomic imprinting and Wilms' tumor*. Medical and Pediatric Oncology 27: 476-483.
- Müller, U., Wang, D., Denda, S., Meneses, J. J., Pedersen, R. A., Reichard, L. F. (1997). *Integrin $\alpha 8 \beta 1$ is critically important for epithelial-mesenchymal interactions during kidney morphogenesis*. Cell 88: 603-613.
- Mukhopadhyay, D., Knebelmann, B., Cohen, H. T., Ananth, S., Sukhatme, V. P. (1997). *The von Hippel-Lindau Tumor Suppressor Gene Product Interacts with Sp1 To Repress Vascular Endothelial Growth Factor Promoter Activity*. Molecular and Cellular Biology 17: 5629-5639.
- Mundlos, S., Pelletier, J., Darveau, A., Bachmann, M., Winterpacht, A., Zabel, B. U. (1993). *Nuclear localization of the protein encoded by the Wilms' tumor gene WT1 in embryonic and adult tissues*. Development 9: 1329-1341.
- Nachtigal, M. W., Hirokawa, Y., Enyeartvanhouten, D. L., Flanagan, J. N., Hammer, G. D., Ingraham, H. A. (1998). *Wilms' tumor 1 and DAX-1 modulate the orphan nuclear receptor SF-1 in sex-specific gene expression*. Cell 93: 445-454.
- Nagase, T., Kikuno, R., Ishikawa, K., Hirosawa, M., Ohara, O. (2000). *Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. The complete sequences of 150 new cDNA clones from brain which code for large proteins in vivo*. DNA Research 7: 65-73.
- Nakai, K., Kanehisa, M. (1992). *A knowledge base for predicting protein localization sites in eukaryotic cells*. Genomics 14: 897-911.
- Nakano, K., Mizuno, T., Sowa, Y., Orita, T., Yoshino, T., Okuyama, Y., Fujita, T., Ohtani-Fujita, N., Matsukawa, Y., Tokino, T., Yamagishi, H., Oka, T., Nomura, H., Sakai, T. (1997). *Butyrate Activates the WAF1/CIP1 Gene Promoter through Sp1 Sites in a p53-negative Human Colon Cancer Cell Line*. Journal of Biological Chemistry 272: 22199-22206.
- Namba, T., Sugimoto, Y., Negishi, M., Irie, A., Ushikubi, F., Kakizuka, A., Ito, S., Ichikawa, A., Narumiya, S. (1993). *Alternative splicing of C-terminal tail of prostaglandin E receptor subtype EP3 determines G-protein specificity*. Nature 365: 166-170.
- Neer, E. J. (1995). *Heterotrimeric G proteins: Organizers of transmembrane signals*. Cell 80: 249-257.
- Nordqvist, K., Tohonon, V. (1997). *An mRNA differential display strategy for cloning genes expressed during mouse gonad development*. International Journal of Developmental Biology 41: 627-638.
- Nowell, P. (1976). *The clonal evolution of tumor cell populations*. Science 194: 23-38.
- Oda, T., Kanai, Y., Oyama, T., Yoshiura, K., Shimoyama, Y., Birchmeier, W., Sugimura, T., Hirohashi, S. (1994). *E-cadherin gene mutations in human gastric carcinoma cell lines*. PNAS 91: 1858-1862.
- Oh, S., Song, Y., Yim, J., Kim, T. K. (1999). *The Wilms' tumor 1 tumor suppressor gene represses transcription of the human telomerase reverse transcriptase gene*. Journal of Biological Chemistry 274: 37473-37478.
- Oji, Y., Ogawa, H., Tamaki, H., Oka, Y., Tsuboi, A., Kim, E. H., Soma, T., Tatekawa, T., Kawakami, M., Asada, M., Kishimoto, T., Sugiyama, H. (1999). *Expression of the Wilms' tumor gene WT1 in solid tumors and its involvement in tumor cell growth*. Japanese Journal of Cancer Research 90: 194-204.
- Omori, Y., Kyushiki, H., Takeda, S., Suzuki, M., Kawai, A., Fujiwara, T., Takahashi, E., Nakamura, Y. (1997). *Cloning, expression and mapping of a novel human zinc-finger gene TCF17 homologous to rodent Kid1*. Cytogenetics and Cell Genetics 78: 285-288.
- Orenic, T., Slusarski, D. C., Kroll, K. L., Holmgren, R. A. (1990). *Cloning and characterization of the segment polarity gene cubitus interruptus dominant of Drosophila*. Genes and Development 4: 1053-1067.

- Park, J.-B., Rhim, J. S., Park, S.-C., Kimm, S.-W., Kraus, M. H. (1989). *Amplification, overexpression, and rearrangement of the erbB-2 protooncogene in primary human stomach carcinomas*. *Cancer Research* 49: 6005-6009.
- Park, S., Bernard, A., Bove, K. E., Sens, D. A., Hazen-Martin, D. J., Garvin, A. J., Haber, D. A. (1993a). *Inactivation of WT1 in nephrogenic rests, genetic precursors to Wilms' tumour*. *Nature genetics* 5: 363-367.
- Park, S., Schalling, M., Bernard, A., Maheswaran, S., Shipley, G., Roberts, D., Fletcher, J., Shipman, R., Rheinwald, J., Demetri, G., Griffin, J., Minden, M., Housman, D. E., Haber, D. A. (1993b). *The Wilms' tumour gene WT1 is expressed in murine mesoderm-derived tissues and mutated in a human mesothelioma*. *Nature genetics* 4: 415-420.
- Pelletier, J., Schalling, M., Buckler, A. J., Rogers, A., Haber, D. A., Housman, D. (1991). *Expression of the Wilms' tumor gene WT1 in the murine urogenital system*. *Genes and Development* 5: 1345-1356.
- Pevny, L., Lin, C.-S., D'Agati, V., Simon, M. C., Orkin, S. H., Costantini, F. (1995). *Development of hematopoietic cells lacking transcription factor GATA-1*. *Development* 121: 163-172.
- Perkins, N. D., Edwards, N. L., Duckett, C. S., Agranoff, A. B., Schmid, R. M., Nabel, G. J. (1993). *A cooperative interaction between NF-kappa B and Sp1 is required for HIV-1 enhancer activation..* *EMBO Journal* 12: 3551-3558.
- Pierceall, W. E., Woodard, A. S., Morrow, J. S., Rimm, D., Fearon, E. R. (1995). *Frequent alterations in E-cadherin and alpha- and beta-catenin expression in human breast cancer cell lines*. *Oncogene* 11: 1319-1326.
- Pietenpol, J. A., Holt, J. T., Stein, R. W., Moses, H. L. (1990). *Transforming growth factor beta 1 suppression of c-myc gene transcription: role in inhibition of keratinocyte proliferation*. *PNAS* 87: 3758-3762.
- Piscione, T. D., Rosenblum, N. D. (1999). *The malformed kidney: disruption of glomerular and tubular development*. *Clinical Genetics* 56: 341-356.
- Powlesland, R. M., Charles, A. K., Malik, K. T., 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: 323-329.
- Pritchard-Jones, K., Renshaw, J., King-Underwood, L. (1994). *The Wilms' tumor (WT1) gene is mutated in a secondary leukaemia in a WAGR patient*. *Human Molecular Genetics* 3: 1633-1637.
- 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
- Radhakrishna, U., Wild, A., Grzeschik, K.-H. (1997). *Mutations in GLI3 in postaxial polydactyly type A*. *Nature Genetics* 17: 269-271.
- 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.
- Rahman, N., Arbour, L., Tonin, P., Baruchel, S., Pritchard-Jones, K., Narod, S. A., Stratton, M. R. (1997). *The familial Wilms' tumour susceptibility gene, FWT1, may not be a tumour suppressor gene*. *Oncogene* 14: 3099-3102.
- Rahman, N., Abidi, F., Ford, D., Arbour, L., Rapley, E. et al. (1998). *Confirmation of FWT1 as a Wilms' tumour susceptibility gene and phenotypic characteristics of Wilms' tumour attributable to FWT1*. *Human Genetics* 103: 547-556.
- 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: 10878-10884.

- Reddy, J. C., Licht, J. D. (1996). *The WT1 Wilms' tumor suppressor gene: How much do we really know?* Biochimica et Biophysica Acta 1287: 1-28.
- Reid, L. R., West, A., Gioeli, D. G., Phillips, K. K., Kelleher, K. F., Araujo, D., Stanbridge, E. J., Dowdy, S. F., Gerhard, D. S., Weissman, B. E. (1996). *Localization of a tumor suppressor gene in 11p15.5 using the G401 wilms' tumor assay.* Human Molecular Genetics 5: 239-247.
- Ringeisen, F., Rey-Campos, J., Yaniv, M. (1993). *The transactivation potential of variant hepatocyte nuclear factor 1 is modified by alternative splicing.* Journal of Biological chemistry 268: 25706-25711.
- Risinger, J. I., Berchuck, A., Kohler, M. F., Boyd, J. (1994). *Mutations of the E-cadherin gene in human gynecologic cancers.* Nature genetics 7: 98-102.
- Rivera, H., Ruiz, C., Garcia-Cruz, D., Rolon, A., Arroyo, J., Cantu, J. M. (1985). *Constitutional mosaic t(2;7)(q33;p22) and other rearrangements in a girl with Wilms' tumor.* Annals of Genetics 28: 52-54.
- Rivera, H. (1995). *Constitutional and acquired rearrangements of chromosome 7 in Wilms' tumor.* Cancer Genetics and Cytogenetics 81: 97-98.
- Robbins, P. D., Horowitz, J. M., Mulligan, R. C. (1990). *Negative regulation of human c-fos expression by the retinoblastoma gene product.* Nature 346: 668-671.
- Roberts, W. M., Douglass, E. C., Peiper, S. C., Houghton, P. J., Look, A. T. (1989). *Amplification of the gli gene in childhood sarcomas.* Cancer Research 49: 5407-5413.
- Roberts, P., Lockwood, L. R., Lewis, I. J., Bailey, C. C., Batcup, G., Williams, J. (1993). *Cytogenetic abnormalities in mesoblastic nephroma: a link to Wilms' tumor?* Medical and Pediatric Oncology 21: 416-420.
- Rubin, B. P., Chen, C.-J., Morgan, T. W., Xiao, S., Grier, H. E., Kozakewich, H. P., Perez-Atayde, A. R., Fletcher, J. A. (1998). *Congenital mesoblastic nephroma t(12;15) is associated with ETV6-NTRK3 gene fusion. Cytogenetic and molecular relationship to congenital (infantile) fibrosarcoma.* American Journal of Pathology 153: 1451-1458.
- Ruiz i Altaba, A. (1999). *Gli proteins encode context-dependent positive and negative functions: implications for development and disease.* Development 126: 3205-3216.
- Ruppert, J. M., Kinzler, K. W., Wong, A. J., Bigner, S. H., Kao, F. T., Law, M. L., Seunanz, H. N., O'Brien, S. J., Vogelstein, B. (1988). *The Gli-Krüppel family of human genes.* Molecular and Cellular Biology 8: 3104-3113.
- Ruppert, J. M., Vogelstein, B., Arheden, K., Kinzler, K. W. (1990). *GLI3 encodes a 190-kilodalton protein with multiple regions of GLI similarity.* Molecular and Cellular Biology 10: 5408-5415.
- Rupprecht, H. D., Drummond, I. A., Madden, S. L., Rauscher III, F. J., Sukhatme, V. P. (1994). *The Wilms' tumor suppressor gene WT1 is negatively autoregulated.* Journal of Biological Chemistry 269: 6198-6206.
- Ryan, G., Steele-Perkins, V., Morris, J. F., Rauscher, F. J. III, Dressler, G. R. (1995). *Repression of Pax-2 by WT1 during normal kidney development.* Development 121: 867-875.
- 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.
- Sanchez, M. P., Silos, S. I., Frisen, J., He, B., Lira, S. A., Barbacid, M. (1996). *Renal agenesis and the absence of enteric neurons in mice lacking GDNF.* Nature 382: 70-73.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. (1977). *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.* PNAS 74: 5463-5467.

- Sato, T., Tanigami, A., Yamakawa, K., Akiyama, F., Kasumi, F., Sakamoto, G., Nakamura, Y. (1990). *Allelotype of breast cancer: cumulative allele losses promote tumor progression in primary breast cancer*. *Cancer Research* 50: 7184-7189.
- Sawyer, J. R., Winkel, E., Redman, J. F., Roloson, G. J., (1993). *Translocation (7;7)(p13;q21) in a Wilms' tumor*. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 69: 57-59.
- Sawyer, J. R., Miller, J. P., Roloson, G. J. (1996). *A novel reciprocal translocation (14;15)(q11;q24) in a congenital mesoblastic nephroma*. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 88: 39-42.
- Schmid, D., Heinze, G., Linnerth, B., Tisljar, K., Kusek, R., Geissler, K., Sillaber, C., Laczika, K., Mitterbauer, M., Zochbauer, S., Mannhalter, C., Haas, O. A., Lechner, K., Jager, U., Gaiger, A. (1997). *Prognostic significance of WT1 gene expression as diagnosis in adult de novo acute myeloid leukemia*. *Leukemia* 11: 639-643.
- Schuchardt, A., D'Agati, V., Larsson-Blomberg, L., Costantini, F., Pachnis, V. (1994). *Defects in the kidney and enteric nervous system of mice lacking the tyrosine kinase receptor Ret*. *Nature* 367: 380-383.
- Schuchardt, A., D'Agati, V. D., Pachnis, V., Costantini, F. (1996). *Renal agenesis and hypodysplasia in ret-k-mutant mice result from defects in ureteric bud development*. *Development* 122: 1919-1929.
- Schultz, J., Milpetz, F., Bork, P., Ponting, C. P. (1998). *SMART, a simple modular architecture research tool: Identification of signaling domains*. *PNAS* 95: 5857-5864.
- Schultz, J., Copley, R. R., Doerks, T., Ponting, C. P., Bork, P. (2000). *SMART: A Web-based tool for the study of genetically mobile domains*. *Nucleic Acids Research* 28: 231-234.
- Schumacher, V., Schneider, S., Figge, A., Wildhardt, G., Harms, D., Schmidt, D., Weirich, A., Ludwig, R., Royer-Pokora, B. (1997). *Correlation of germ-line mutations and two-hit inactivation of the WT1 gene with Wilms' tumors of stromal predominant histology*. *PNAS* 94: 3972-3977.
- Schwab, M., Prami, C., Amler, L. C. (1996). *Genomic instability in 1p and human malignancies*. *Genes, Chromosomes and Cancer* 16: 211-229.
- Schwab, U., Stein, H., Gerdes, J., Lemke, H., Kirchner, H., Schaadt, M., Diehl, V. (1982). *Production of a monoclonal antibody specific for Hodgkin and Sternberg-Reed cells of Hodgkin's disease and a subset of normal lymphoid cells*. *Nature* 299: 65-67.
- Schwartz, C. E., Haber, D. A., Stanton, V. P., Strong, L. C., Skolnick, M. H., Housman, D. E. (1991). *Familial predisposition to Wilms' tumor does not segregate with the WT1 gene*. *Genomics* 10: 927-930.
- Sekiya, M., Adachi, M., Hinoda, Y., Imai, K., Yachi, A. (1994). *Downregulation of Wilms' tumor gene (WT1) during myelomonocytic differentiation in HL60 cells*. *Blood* 83: 1876-1882.
- Shanklin, D. R., Sotelo-Avila, C. (1969). *In situ tumors in fetuses, newborns, and young infants*. *Biology of the Neonate* 14: 286-316.
- Shen, R., Su, Z. Z., Olsson, C. A., Fisher, P. B. (1997). *Identification of the human prostatic carcinoma oncogene PTI-1 by rapid expression cloning and differential RNA display*. *PNAS* 92: 6778-6782.
- Sheng, W. W., Soukup, S., Bove, K., Gotwals, B., Lampkin, B. (1990). *Chromosome analysis of 31 Wilms' tumors*. *Cancer Research* 50: 2786-2793.
- Shen-Ong, G. L. C. (1990). *The myb oncogene*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1032: 39-52.
- Siegel, P. M., Muller, W. J. (1996). *Mutations affecting conserved cysteine residues within the extracellular domain of Neu promote receptor dimerization and activation*. *PNAS* 99: 8878-8883.
- Smith, S. A., Easton, D. F., Evans, D. G., Ponder, B. A. J. (1992). *Allele losses in the region 17q12-21 in familial breast and ovarian cancer involve the wild-type chromosome*. *Nature Genetics* 2: 128-131.
- Southern, E. M. (1975). *Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis*. *Journal of Molecular Biology* 98: 503-517.

- Spangenberg, C., Winterpacht, A., Zabel, B. U., Löbber, R. W. (1998). *Cloning and characterization of a novel gene (TM7SF1) encoding a putative seven-pass transmembrane protein that is upregulated during kidney development*. Genomics 48: 178-185.
- Spangenberg, C., Kos, S., Trübenbach, J., Klemm, G., Winterpacht, A., Löbber, R. W., Zabel, B. U. (1999). *Characterization of differentially expressed genes involved in kidney development and Wilms' tumorigenesis*. Medizinische Genetik 11: 156 (P2-29).
- Stark, K., Vainio, S., Vassileva, G., McMahon, A. P. (1994). *Epithelial transformation of metanephric mesenchyme in the developing kidney regulated by Wnt-4*. Nature 372: 679-683.
- Steenman, M., Redeker, B., de Meulemeester, M., Wiesmeijer, K., Voute, P. A., Westerveld, A., Slater, R., Mannens, M. (1997). *Comparative genomic hybridization of Wilms' tumors*. Cytogenetics and Cell Genetics 77: 296-303.
- Strachan, T., Abitbol, M., Davidson, D., Beckmann, J. S. (1997). *A new dimension for the human genome project: towards comprehensive expression maps*. Nature Genetics 16: 126-132.
- Strader, C. D., Fong, T. M., Tota, M. R., Underwood, D., Dixon, R. (1994). *Structure and function of G protein-coupled receptors*. Annual Reviews in Biochemistry 63: 101-131.
- Strehl, S., Glatt, K., Liu, Q. M., Glatt, H., Lalande, M. (1998). *Characterization of two novel protocadherins (PCDH8 and PCDH9) localized on human chromosome 13 and mouse chromosome 14*. Genomics 53: 81-89.
- Stultz, C. M., White, J. V., Smith, T. (1993). *Structural analysis based on state-space modeling*. Protein Science 2: 305-314.
- Sykes, D. E., Weiser, M. M. (1992). *The identification of genes specifically expressed in epithelial cells of the rat intestinal crypts*. Differentiation 50: 41-46.
- Takeichi, M. (1990). *Cadherins: A molecular family important in selective cell-cell adhesion*. Annual Reviews in Biochemistry 59: 237-252.
- Takeichi, M. (1993). *Cadherins in cancer: implication in invasion and metastasis*. Current opinion in Cell Biology 5: 806-811.
- Talts, J. F., Aufderheide, E., Sorokin, L., Ocklind, G., Mattsson, R., Ekblom, P. (1993). *Induction of mouse tenascin expression by a human sarcomatoid Wilms' tumor cell line growing in nude mice*. International Journal of Cancer 54: 868-874.
- Tamaki, H., Ogawa, H., Ohyashiki, K., Ohyashiki, J. H., Iwama, H., Inoue, K., Soma, T., Oka, Y., Tatekawa, T., Oji, Y., Tsuboi, A., Kim, E. H., Kawakami, M., Fuchigami, K., Tomonaga, M., Toyama, K., Aozasa, K., Kishimoto, T., Sugiyama, H. (1999). *The Wilms' tumor gene WTI is a good marker for diagnosis of disease progression of the myelodysplastic syndromes*. Leukemia 13: 393-399.
- Topper, J. N., Cai, J., Qiu, Y., Anderson, K. R., Xu, Y. Y., Deeds, J. D., Feeley, R., Gimeno, C. J., Woold, E. A., Tayber, O., Mays, G. G., Sampson, B. A., Schoen, F. J., Gimbrone, M. A., Falb, D. (1997). *Vascular MADs: two novel MAD-related genes selectively inducible by flow in vascular endothelium*. PNAS 94: 9314-9319.
- Tronche, F., Yaniv, M. (1992). *HNF1, a homeoprotein member of the hepatic transcription regulatory network*. BioEssays 14: 579-586.
- Trübenbach, J. (1998). *Analyse differentiell in normaler Niere und Wilmstumor exprimierter Transkripte zur Identifizierung von Faktoren der Tumorgenese*. Diplomarbeit im Fachbereich Biologie der Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.
- Tsuda, H., Zhang, W. D., Shimosato, Y., Yokota, J., Terada, M., Sugimura, T., Miyamura, T., Hirohashi, S. (1990). *Allele loss on chromosome 16 associated with progression of human hepatocellular carcinoma*. PNAS 87: 6791-6794.

- Udvardia, A. J., Rogers, K. T., Horowitz, J. M. (1992). *A common set of nuclear factors bind to promoter elements regulated by the retinoblastoma protein*. Cell Growth and Differentiation 3: 597-608.
- Udvardia, A. J., Rogers, K. T., Higgins, P. D. R., Murata, Y., Martin, K. H., Humphrey, P. A., Horowitz, J. M. (1993). *Sp-1 binds promoter elements regulated by the RB protein and Sp-1-mediated transcription is stimulated by RB coexpression*. PNAS 90: 3265-3269.
- Udvardia, A. J., Templeton, D. J., Horowitz, J. M. (1995). *Functional interactions between the retinoblastoma (Rb) protein and Sp-family members: superactivation by Rb requires amino acids necessary for growth suppression*. PNAS 92: 3953-3957.
- Vainio, S., Müller, U. (1997). *Inductive tissue interactions, cell signaling, and the control of kidney organogenesis*. Cell 90: 975-978.
- van Biesen, T., Luttrell, L. M., Hawes, B. E., Lefkowitz, R. J. (1996). *Mitogenic signaling via G protein-coupled receptors*. Endocrine Reviews 6: 698-714.
- Velculescu, V. E., Zhang, L., Vogelstein, B., Kinzler, K. W. (1995). *Serial analysis of gene expression*. Science 270: 484-488.
- Vogelstein, B., Kinzler, K. W. (1993). *The multistep nature of cancer*. Trends in Genetics 9: 138-141.
- von Heijne, G. (1992). *Membrane protein structure prediction. Hydrophobicity analysis and the positive-inside rule*. Journal of Molecular Biology 225: 487-494.
- Vortkamp, A., Gessler, M., Grzeschik, K.-H. (1991). *GLI3 zinc finger gene interrupted by translocations in Greig syndrome families*. Nature 352: 539-540.
- Vukicevic, S., Kopp, J. B., Luyten, F. P., Kuber Sampath, T. (1996). *Induction of nephrogenic mesenchyme by osteogenic protein 1 (bone morphogenetic protein 7)*. PNAS 93: 9021-9026.
- Wang, A. M., Doyle, M. V., Mark, D. F. (1989). *Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction*. PNAS 86: 9717-9721.
- Wang, Z. Y., Madden, S. L., Deuel, T. F., Rauscher, F. J. III (1992). *The Wilms' tumor gene product, WT1, represses transcription of the platelet-derived growth factor A-chain gene*. Journal of Biological Chemistry 267: 21999-22002.
- 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.
- Ward, A., Pooler, J. A., Miyagawa, K., Duarte, A., Hastie, N. D., Caricasole, A. (1995). *Repression of promoters for the mouse insuline-like growth factor 2-encoding gene (Igf2) by products of the Wilms' tumor suppressor gene WT1*. Gene 167: 239-243.
- Webster, N. J. G., Kong, Y., Sharma, P., Haas, M., Sukumar, S., Seely, B. L. (1997). *Differential effects of Wilms' tumor WT1 splice variants on the insuline receptor promoter*. Biochemistry and Molecular Medicine 62: 139-150.
- Weinberg, R. A. (1995). *The Retinoblastoma protein and cell cycle control*. Cell 81: 323-330.
- Werner, H., Rauscher, F. J. III, Sukhatme, V. P., Drummond, I. A., Roberts, C. T., LeRoith, D. (1994). *Transcriptional repression of the insuline-like growth factor 1 receptor (IGF1R) gene by the tumor suppressor WT1 involves binding to sequences both upstream and downstream of the IGF1R gene transcription start site*. Journal of Biological Chemistry 269: 12577-12582.
- White, J. V., Stultz, C. M., Smith, T. (1994). *Protein classification by stochastic modeling and optimal filtering of amino-acid sequences*. Mathematical Biosciences 119: 35-75.
- Wiener, J. S., Coppes, M. J., Ritchey, M. L. (1998). *Current concepts in the biology and management of Wilms tumor*. Journal of Urology 159: 1316-1325.

- Wierenga, R. K., Hol, W. G. J. (1983). *Predicted nucleotide-binding properties of p21 protein and its cancer-associated variant*. Nature 302: 842-844.
- Wilmore, H. P., White, G. F., Howell, R. T., Brown, K. W. (1994). *Germline and somatic abnormalities of chromosome 7 in Wilms' tumor*. Cancer Genetics and Cytogenetics 77: 93-98.
- Witzgall, R., O'Leary, E., Gessner, R., Oullette, A. J., Bonventre, J. V. (1993). *Kid-1, a putative renal transcription factor: regulation during ontogeny and in response to ischemia and toxic injury*. Molecular and Cellular Biology 13: 1933-1942.
- Witzgall, R., Volk, R., Yeung, R. S., Bonventre, J. V. (1994). *Genomic structure and chromosomal location of the rat gene encoding the zinc finger transcription factor Kid-1*. Genomics 20: 203-209.
- Wu, Q., Maniatis, T. (1999). *A striking organization of a large family of human neural cadherin-like cell adhesion genes*. Cell 97: 779-790.
- Xie, J., Murone, M., Luoh, S.-M. et al. (1998). *Activating Smoothed mutations in sporadic basal-cell carcinoma*. Nature 391: 90-92
- Yamagami, T., Ogawa, H., Tamaki, H., Oji, Y., Soma, T., Oka, Y., Tatekawa, T., Tsuboi, A., Kim, E. H., Akiyama, T., Sugiyama, H. (1998). *Suppression of Wilms' tumor gene (WT1) expression induces G(2)/M arrest in leukemic cells*. Leukemia Research 22: 383-384.
- Yoon, J. W., Liu, C. Z., Yang, J. T., Swart, R., Iannaccone, P., Walterhouse, D. (1998). *GLI activates transcription through a herpes simplex viral protein 16-like activation domain*. Journal of Biological Chemistry 273: 3496-3501.
- Zabel, B. U., Trübenbach, J., Spangenberg, C., Winterpacht, A., Löbber, R. W. (1998). *Identification of differentially expressed genes in kidney and Wilms' tumor*. American Journal of Human Genetics 63 (supplement): A93 (512).
- Zarkower, D., Hodgkin, J. (1992). *Molecular analysis of the C. elegans sex-determining gene tra-1: a gene coding two zinc finger proteins*. Cell 70: 237-249.
- Zhan, S., Helman, L. J. (1998). *Glimpsing the cause of rhabdomyosarcoma*. Nature Medicine 4: 559-560.
- Zhang, H., Zhang, R., Liang, P. (1996). *Differential screening of gene expression difference enriched by differential display*. Nucleic Acids Research 24: 2454-2455.
- Zhang, H., Zhang, R., Liang, P. (1997). *Differential screening of differential display cDNA products by reverse northern*. Methods in Molecular Biology 85: 87-93.
- Zhang, X., Xing, G., Fraizer, G. C., Saunders, G. F. (1997). *Transactivation of an intronic hematopoietic-specific enhancer of the human Wilms' tumor 1 gene by GATA-1 and c-Myb*. Journal of Biological Chemistry 272: 29272-29280.
- Zuppan, C. W., Beckwith, J. B., Luckey, D. W. (1988). *Anaplasia in unilateral Wilms' tumor. A report from the National Wilms' Tumor Study Pathology Center*. Human Pathology 19: 1199-1209.

7 ANHANG

7.1 Lebenslauf

Zur Person

Name: Christian Spangenberg

Geburtstag:

Geburtsort:

Staatsangehörigkeit:

Familienstand:

Anschrift:

Schulen

Wehrdienst

Universitätsausbildung

WS 1991/92 – SS 1996

Studium der Humanbiologie (FB Humanmedizin) an der Philipps-Universität Marburg/Lahn; experimentelle Diplomarbeit durchgeführt am Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung (IMT) der Philipps-Universität Marburg in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. M. Beato

Thema der Diplomarbeit:	Das [H3•H4] ₂ -Tetramer: Eine mögliche Form des hormoninduzierten MMTV-Promotors
Abschluss:	Diplom Humanbiologe (Dipl. humbiol.)
seit 7/96	Experimentelle Doktorarbeit durchgeführt im molekulargenetischen Labor der Kinderklinik an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. B. U. Zabel
Thema der Dissertation:	Wilmstumor- und Metanephrogenese: Differenzielle Genexpressionsanalysen und weitere Charakterisierung identifizierter Kandidatengene

Wissenschaftliche Beschäftigung

2/96 – 6/96	Studentische Hilfskraft am IMT der Philipps-Universität Marburg in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. M. Beato
7/96 – 6/99	Stipendiat des Graduiertenkollegs „Molekulare und zelluläre Mechanismen der Pathogenese“ an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
seit 7/99	Wissenschaftlicher Mitarbeiter im molekulargenetischen Labor der Kinderklinik an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. B. U. Zabel

Sonstiges

1/00-12/00	Gefördert im Rahmen des Mainzer Forschungsförderungsprogramm (MAIFOR) des Fachbereichs Medizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz (Thema: Molekulare Analyse von Tumor-Kandidatengenen – Identifikation nierenspezifischer Interaktionspartner der Gene <i>TM7SF1</i> und <i>CDT151</i>)
------------	---

7.2 Publikationen

Spangenberg, C., Winterpacht, A., Zabel, B. U., Löbbert, R. W. (1998). *Cloning and characterization of a novel gene (TM7SF1) encoding a putative seven-pass transmembrane protein that is upregulated during kidney development*. Genomics 48: 178-185.

Prawitt, D., Enklaar, T., Klemm, G., Gärtner, B., Spangenberg, C., Winterpacht, A., Higgins, M., Pelletier, J., Zabel, B. (2000). *Identification and characterization of MTR1, a novel gene with homology to melastatin (MLSN1) and the trp gene family located in the BWS-WT2 critical region on chromosome 11p15.5 and showing allele-specific expression*. Human Molecular Genetics 9: 203-216.

Spangenberg, C., Trübenbach, J., Kos, S., Enklaar, T., Esswein, M., Löbbert, R. W., Prawitt, D., Winterpacht, A., Zabel, B. U. *Cloning and characterization of the murine gene Tm7sfl*. Manuskript in Vorbereitung.

P. Gerner, E. Lausch, M. Friedt, R. Tratzmüller, C. Spangenberg, S. Wirth (1999). *Hepatitis B virus core promoter mutations in children with multiple anti-HBeAg reactivations result in enhanced promoter activity*. Journal of Medical Virology 59: 415-423.

Kurzpublikationen (Poster) und Vorträge:

Löbbert, R. W., Spangenberg, C., Klemm, G., Winterpacht, A., Zabel, B. (1997). *Search for novel genetic factors contributing to Wilms' tumorigenesis*. Medizinische Genetik 9: 49 (P1-29).

R. W. Löbbert, C. Spangenberg, G. Klemm, A. Winterpacht, B. U. Zabel, (1997). *Wilms' tumorigenesis: Search for novel genetic factors*. American Journal of Human Genetics 61 (supplement): A72 (393).

Wüchner, C., Löbbert, R., Spangenberg, C., Dreyer, S., Horton, B., Lee, B., Zabel, B., Winterpacht, A. (1998). *Strategies for the isolation of genes involved in chondrocyte growth and differentiation*. Medizinische Genetik 10: 149 (P8-47).

C. Spangenberg, A. Winterpacht, B. U. Zabel, R. W. Löbbert (1998). *SP3 is capable of binding at least three sites in the WT1 promoter*. Journal of Molecular Medicine 76: B38 (P-144).

R. W. Löbbert, C. Spangenberg, J. Trübenbach, G. Klemm, A. Winterpacht, B. U. Zabel (1998). *Studies on differential gene expression in kidney development and Wilms' tumors*. Journal of Molecular Medicine 76: B35 (P-131).

Löbbert, R. W., Spangenberg, C., Trübenbach, J., Wüchner, C., Klemm, G., Winterpacht, A., Zabel, B. U. (1998). *Gene expression studies in kidney development and Wilms' tumorigenesis*. European Journal of Human Genetics 6 (S1): 149 (P4.180).

C. Spangenberg, B. U. Zabel, J. Trübenbach, A. Winterpacht, R. W. Löbbert (1998). *Modulation of SP1-mediated WT1 transcriptional regulation*. American Journal of Human Genetics 63 (supplement): A193 (1106).

B. U. Zabel, J. Trübenbach, C. Spangenberg, A. Winterpacht, R. W. Löbbert (1998). *Identification of differentially expressed genes in kidney and Wilms' tumor*. American Journal of Human Genetics 63 (supplement): A93 (512).

Spangenberg, C., Kos, S., Trübenbach, J., Klemm, G., Winterpacht, A., Löbbert, R. W., Zabel, B. U. (1999). *Characterization of differentially expressed genes involved in kidney development and Wilms' tumorigenesis*. Medizinische Genetik 11: 156 (P2-29).

Gärtner, B., Enklaar, T., Prawitt, D., Spangenberg, C., Higgins, M., Winterpacht, A., Zabel, B. (1999). TSA induction of gene expression: *Analysis of imprinted genes involved in the pathogenesis of Beckwith-Wiedemann syndrome*. International Genomic Imprinting Meeting: 69 (P7).

Prawitt, D., Munroe, D. J., Spangenberg, C., Klemm, G., Trübenbach, J., Gärtner, B., Enklaar, T., Higgins, M., Pelletier, J., Winterpacht, A., Zabel, B. U. (1999). Cloning and characterization of genes from Wilms' tumor candidate regions. American Journal of Human Genetics 69 (supplement): A79 (1779).

Prawitt, D., Enklaar, T., Spangenberg, C., Langer, A., Klemm, G., Gärtner, B., Winterpacht, A., Zabel, B. (2000). *Identification and characterization of MTR1, a novel gene from the BWS-WT2 critical region on chromosome 11p15.5 with homology to the trp gene family*. Medizinische Genetik 12: 60 (W8-3).

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

Spangenberg, C., Prawitt, D., Zabel, B. (2000). cDNA-Microarray-Analyse möglicher Kandidaten- und Zielgene des familiären Wilmstumors. Klinische Pädiatrie 212: P52 (S96).

7.3 Danksagung

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

Christian Spangenberg