

# Inhalt

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Krebs und Gene	1
1.2	Tumorsuppressorgene	2
1.3	Wilms Tumor und <i>WT1</i>	2
1.4	<i>WT1</i> -Mutationen und damit assoziierte Krankheiten	3
1.5	Struktur und Isoformen von <i>WT1</i>	4
1.6	Das Expressionsmuster von <i>WT1</i> und seine Rolle während der Embryonalentwicklung	7
1.7	Zielgene von <i>WT1</i>	9
1.8	RNA-Bindung und Spleißen durch <i>WT1</i> ?	11
1.9	<i>WT1</i> -interagierende Proteine	12
1.10	Der Einfluß von <i>WT1</i> auf Zellproliferation und Apoptose	14
1.11	Fragestellung	15
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>17</b>
2.1	Material	17
2.1.1	Bezugsquellen	17
2.1.2	Radiochemikalien	19
2.1.3	Enzyme	19
2.1.4	Bakterienstämme und eukaryontische Zelllinien	19
2.1.5	Kulturmedien, Puffer und Lösungen	20
2.1.6	Plasmide	21
2.1.7	Oligonukleotide	22
2.1.8	Antikörper	23
2.1.9	Mausstämme	24

2.2	Methoden	24
2.2.1	Allgemeine Methoden zur Behandlung von Nukleinsäuren	24
2.2.2	Klonierungstechniken	25
2.2.3	Transformation von Bakterien	26
2.2.4	Präparation von rekombinanter Plasmid-DNA aus transformierten Bakterien	26
2.2.5	Sequenzierung von DNA und Auftrennung der Sequenzierprodukte	27
2.2.6	Zellkultur	28
2.2.7	Polymerasekettenreaktion zur Amplifikation spezifischer Sequenzen aus genomischer DNA	28
2.2.8	Allgemeine Methoden zur Behandlung von Proteinen	29
2.2.8.1	Probenerstellung für SDS-PAGE	29
2.2.8.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	29
2.2.8.3	Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen über SDS-Polyacrylamidgele	29
2.2.9	Methoden zum Nachweis spezifischer Proteine	30
2.2.9.1	Immunzytochemische Färbung von Zellen	30
2.2.9.2	Transfer von Proteinen auf Membranen und Detektion mit spezifischen Antikörpern ( <i>Westernblot</i> )	31
2.2.9.3	Radioaktive Markierung und anschließende Immunpräzipitation von Proteinen	31
2.2.9.4	Phosphoaminosäureanalyse	32
2.2.9.5	Phosphopeptidanalyse	33
2.2.10	Methoden zur Präparation von Mäusen und Analyse von Mausgeweben	34
2.2.10.1	Verpaaren der Mäuse und Bestimmung der embryonalen Entwicklungsstadien	34
2.2.10.2	Genotypisierung von <i>knock out</i> -Mäusen	34

2.2.10.3	Isolation von Mausembryonen .....	35
2.2.10.4	Blastozystentransfer .....	35
2.2.11	Anfertigung und Analyse von histologischen Schnitten .....	36
2.2.11.1	Beschichten von Objektträgern .....	36
2.2.11.2	Einbetten und Anfertigung von histologischen Schnitten .....	36
2.2.11.3	Entparaffinierung, Färbung und Entwässerung der Schnitte .....	37
2.2.12	Nachweis apoptotischer Zellen anhand des TUNEL-Assays unter Verwendung des ApopTag Plus Peroxidase Kits (Appligene, Heidelberg) .....	37
2.2.13	Immunhistochemische Expressionsanalyse .....	38
2.2.14	<i>In situ</i> -Hybridisierung embryonalen Gewebes ( <i>whole mounts</i> ) .....	38
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>41</b>
3.1	Die <i>Speckling</i> -Domäne von <i>Wt1</i> umfaßt die Aminosäuren 76-120 .....	41
3.1.1	Identifizierung der <i>Speckling</i> -Domäne .....	43
3.1.2	Die Aminosäuren 84-177 sind notwendig und ausreichend für die Lokalisation von <i>Wt1</i> in <i>Speckles</i> .....	45
3.2	Posttranslationelle Modifikation von <i>Wt1</i> durch Phosphorylierung .....	49
3.2.1	Phosphorylierung von Wildtyp- und mutantem <i>Wt1</i> .....	49
3.2.2	<i>Wt1</i> ist an den Aminosäuren Serin und Threonin phosphoryliert .....	50
3.2.3	Phosphopeptidanalyse von Wildtyp- und mutantem <i>Wt1</i> .....	52
3.2.4	<i>Wt1</i> ist an multiplen Stellen phosphoryliert .....	53
3.3	<i>Wt1</i> ist notwendig für die Entwicklung der Milz .....	56
3.3.1	Der mit der Inaktivierung von <i>wtl</i> assoziierte Phänotyp ist vom genetischen Hintergrund abhängig .....	56

3.3.2	In <i>wt1</i> defizienten Embryonen findet keine Entwicklung der Milz statt .....	57
3.3.3	<i>Wt1</i> ist ein antiapoptotischer Faktor .....	60
3.3.4	Während der Milzentwicklung werden <i>wt1</i> und <i>hox11</i> unabhängig voneinander reguliert .....	63
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>66</b>
4.1	Lokalisation von <i>Wt1</i> (+KTS) in <i>Speckles</i> .....	67
4.1.1	Die Identifikation der <i>Speckling</i> -Domäne von <i>Wt1</i> .....	67
4.1.2	Die <i>Speckling</i> -Domäne als Mittel zur Analyse der Funktion von <i>wt1</i> .....	69
4.1.3	Dienen die <i>Speckles</i> als Depot für <i>Wt1</i> (+KTS)-Isoformen? .....	70
4.2	<i>Wt1</i> ist posttranslationell modifiziert .....	71
4.3	<i>In vivo</i> Studien zur Funktion von <i>wt1</i> .....	74
4.3.1	Der Einfluß modifizierender Gene .....	74
4.3.2	Die Rolle von <i>Wt1</i> bei der Milzentwicklung .....	75
4.3.3	<i>Wt1</i> - ein antiapoptotischer Faktor? .....	76
<b>5</b>	<b>Abkürzungen</b> .....	<b>78</b>
<b>6</b>	<b>Literatur</b> .....	<b>80</b>