

**Identifizierung einer Funktion des
Transkriptionsfaktors LMX1B bei der
Regulation des Interferon-beta-Signalwegs**

DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES DER NATURWISSENSCHAFTEN
(DR. RER. NAT.) DER NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT III
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

vorgelegt von

Tanja Neumann

aus Kaiserslautern



Dezember 2008

Promotionsgesuch eingereicht: am 14.01.2009

Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. R. Witzgall

Prüfungsausschuß: Vorsitzender: Prof. Dr. W. W. Minuth

1. Gutachter (1. Prüfer): Prof. Dr. R. Witzgall

2. Gutachter (2. Prüfer): Prof. Dr. A. Kurtz

3. Prüfer: Prof. Dr. M. Thomm

Ersatzperson: Prof. Dr. R. Warth

Meiner Tochter Annika Maleen,
die „Bio(s)“ in wundervollster Form ist
und mich jeden Tag auf's Neue über eben dieses staunen lässt.

Abkürzungsverzeichnis.....	1
1. Einleitung.....	11
1.1 Der glomeruläre Filter der Niere.....	11
1.2 Podozyten.....	12
1.3 Das Nagel-Patella-Syndrom.....	14
1.4 Der LIM-Homöodomäne-Transkriptionsfaktor LMX1B.....	16
1.5 Der Zellzyklus.....	20
1.6 Der Zellzyklus bei Podozyten.....	23
1.7 Der Interferon- β -Signalweg.....	24
1.8 Der Transkriptionsfaktor NF- κ B.....	29
1.9 Tumore und Tumorsuppressorgene des Urothels.....	31
1.10 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit.....	33
2. Material und Methoden.....	36
2.1 Material.....	36
2.1.1 Chemikalien, Medien und Reagenzien.....	36
2.1.2 Kits.....	39
2.1.3 Verbrauchsmaterial.....	39
2.1.4 Geräte und Instrumente.....	40
2.1.5 Antikörper.....	41
2.1.6 Oligonukleotide für die Echtzeit-PCR.....	42
2.1.7 Vektoren.....	45
2.1.8 Säugerzelllinien.....	45
2.1.9 Medien, Lösungen und Puffer.....	46
2.2 Methoden.....	53
2.2.1 Zucht und Genotypisierung von <i>Lmx1b</i> -Knockout-Mäusen.....	53
2.2.2 Kultivierung eukaryotischer Zellen.....	58
2.2.3 Transfektion eukaryotischer Zellen.....	61
2.2.4 Stimulierung von HfTA-1-Zellen mit Interferon- β	62
2.2.5 Neutralisierung der biologischen Aktivität von Interferon- β mittels Anti-IFN β -Antikörper.....	63
2.2.6 Inhibierung der I κ B-Kinase durch Prostaglandin A ₁	64

2.2.7	Bromodesoxyuridin-Färbung von Zellen in der S-Phase	64
2.2.8	Laktatdehydrogenase-Aktivitätstest	67
2.2.9	Isolierung von Protein.....	69
2.2.10	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	70
2.2.11	Western-Blotting.....	71
2.2.12	Isolierung von Gesamt-RNA	72
2.2.13	Reverse Transkription mit dem iScript cDNA Synthesis-Kit von Bio-Rad	75
2.2.14	Echtzeit-PCR	76
2.2.15	RNase-Protection-Assay.....	79
3.	Ergebnisse	84
3.1	Nähere Charakterisierung des wachstumsinhibierenden Effekts von LMX1B.....	84
3.1.1	Im Gegensatz zur LIM2-Domäne ist die LIM1-Domäne nicht essentiell für den wachstumsinhibierenden Effekt von LMX1B	85
3.1.2	Bei LMX1B-produzierenden Zellen befindet sich ein geringerer Anteil in der S-Phase des Zellzyklus	88
3.2	Analyse des Einflusses von LMX1B auf die differentielle Genexpression.....	93
3.2.1	Die Expression von <i>p21</i> und mehreren Interferon-induzierten Genen ist in LMX1B-produzierenden Zellen erhöht	93
3.2.2	Die Methode der RT-qPCR	95
3.2.3	RT-qPCR und RNase-Protection-Assay liefern vergleichbare Ergebnisse.....	99
3.2.4	Die RT-qPCR-Analyse bestätigt die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse	104
3.2.5	Die C95F-Mutante von LMX1B zeigt keine erhöhte Expression von ISGs	108
3.3	Aufklärung der Rolle von LMX1B im Interferon-α/β-System	112
3.3.1	Die Expression von <i>IFNβ</i> , nicht aber die von <i>IFNα</i> oder <i>IFNγ</i> ist in LMX1B-synthetisierenden Zellen erhöht	112
3.3.2	Beide Untereinheiten des IFN α/β -Rezeptors werden in HeLa-Zellen exprimiert.....	117
3.3.3	Die Expression vieler am Interferon- β -Signalweg beteiligter Gene ist in LMX1B-synthetisierenden Zellen erhöht	119

3.3.4	Auch die Expression des Gens für Interleukin-6 ist in LMX1B-synthetisierenden Zellen erhöht.....	126
3.3.5	Unter den in LMX1B-produzierenden Zellen induzierten Genen gibt es bezüglich ihrer Stimulierbarkeit durch IFN β zwei verschiedene Klassen	127
3.3.6	Die in LMX1B-produzierenden Zellen erhöhte Expression von <i>IFNβ</i> und <i>IL-6</i> ist nur partiell durch Neutralisierung von IFN β hemmbar	133
3.3.7	Zwei weitere NF- κ B-Zielgene, <i>IL-1β</i> und <i>IL-8</i> , verhalten sich in LMX1B-produzierenden Zellen wie <i>IFNβ</i> und <i>IL-6</i>	136
3.3.8	Die Inhibierung von NF- κ B durch Prostaglandin A ₁ hemmt die durch LMX1B ausgelöste Induktion verschiedener Gene.....	141
3.4	Überprüfung der an HeLa-Zellen gewonnen Erkenntnisse mit <i>in vivo</i>-Modellen.....	146
3.4.1	<i>Lmx1b</i> beeinflusst die Expression von Genen des Interferon- β -Signalwegs in der sich entwickelnden, nicht aber in der adulten Niere von Mäusen.....	146
3.4.2	Die Expression von Interferon-stimulierten Genen ist in den Nieren neugeborener <i>Lmx1b</i> -Knockout-Mäuse erhöht	151
3.4.3	Expression von <i>Lmx1b</i> und <i>Isg15</i> im Thymus von <i>Lmx1b</i> -Knockout-Mäusen.....	154
3.4.4	Untersuchung menschlicher Urothel- und Urothelkarzinom-Zelllinien auf die Bedeutung endogener LMX1B-Produktion für die Entwicklung von Karzinomen.....	156
3.4.5	Urothel- und Urothelkarzinom-Zelllinien zeigen unterschiedlich starke Expression von <i>LMX1B</i>	157
3.4.6	Die Expression von LMX1B-Kofaktoren unterscheidet sich zwischen Urothel- und Urothelkarzinom-Zellen.....	159
3.4.7	Die Expression von Genen des Interferon- β -Signalwegs ist in Urothelkarzinomzellen erhöht	161
4.	Diskussion	164
4.1	Einführung.....	164
4.2	Die durch LMX1B erhöhte Induktion der NF- κ B-Zielgene und Interferon-stimulierten Gene ist spezifisch und wie die Wachstumsinhibition von der LIM2-Domäne abhängig.....	165

4.3	LMX1B reguliert die Expression von NF- κ B-Zielgenen und stimuliert dadurch die Expression von Interferon-stimulierten Genen	166
4.4	Mögliche Modelle der Regulation von NF- κ B-Zielgenen durch LMX1B	170
4.5	Die Interferon- β -vermittelte Regulation der ISG-Expression durch LMX1B	179
4.6	Biologische Signifikanz	181
4.7	Mögliche vermittelnde mKomponenten des wachstumshemmenden Effekts von LMX1B auf HeLa-Zellen	185
4.8	LMX1B ist kein Tumorsuppressor in Urothelzellen	191
4.9	Schlussfolgerung und Ausblick	193
5.	Zusammenfassung	197
6.	Literaturverzeichnis	200
7.	Veröffentlichungen	230
8.	Lebenslauf	259
9.	Eidesstattliche Erklärung	260
10.	Danksagung	261

Abkürzungsverzeichnis

2xLim1	Austausch der LIM2-Domäne durch eine zweite LIM1-Domäne bei LMX1B
2xLim2	Austausch der LIM1-Domäne durch eine zweite LIM2-Domäne bei LMX1B
A	Adenin
A	Ampere
AAF	Interferon-a-aktivierter Faktor
(ACG)TP	Mischung aus ATP, CTP und GTP zu gleichen Teilen
APC	„adenomatous polyposis coli“
APS	Ammoniumpersulfat
Asp	Asparaginsäure
ASPP	„apoptosis-stimulating protein of p53“
ATF-2	„activating transcription factor 2“
ATP	Adenosintriphosphat
<i>Bam</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
BCL3	„B-cell CLL/lymphoma 3“
BHK-21	Zelllinie aus Nierenzellen des Hamsters
B-Lymphozyten	Lymphozyten, die im Knochenmark („bone marrow“) gebildet werden
bp	Basenpaare
BrdU	5-Bromo-2-Desoxyuridin
BSA	Rinder-Serumalbumin („bovine serum albumine“)
BZH	Biochemie-Zentrum Heidelberg
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
°C	Grad Celcius
C95F	Austausch von Cystein gegen Phenylalanin an Position 95 von LMX1B
ca.	circa
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CBP	„CREB-binding protein“
CCL-2	„chemokine (C-C motif) ligand 2“
CD	„cluster of differentiation“

CD2AP	CD2-assoziiertes Protein
cdc2	„cell division cycle 2“
CDC25A	„cell division cycle 25A“
Cdk	Cyclin-abhängige Proteinkinase („cyclin-dependent kinase“)
cDNA	komplementäre DNA („complementary DNA“)
c/EBP α	„CCAAT/enhancer binding protein alpha“
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
ChIP	Chromatin-Immunpräzipitation
Ci	Curie
Cip1	„Cdk-inhibitory protein 1“
Cip/Kip	„cdk-inhibitory protein/ kinase inhibitory protein“
CITED2	„Cbp/p300-interacting transactivator 2“
CKI	Cdk-Inhibitor
<i>Cla</i>	<i>Caryophanon latum</i>
CLIM	„cofactor of LIM homeodomain proteins“
Clim2	„cofactor of LIM 2“ (Synonym für Ldb1)
cm	Zentimeter
cM	Zentimorgan
CMV	Cytomegalie-Virus
c-Myc	Myc-Protoonkogen
CO ₂	Kohlendioxid
COL4A3	Kollagen IV α 3
COL4A4	Kollagen IV α 4
cpm	Zerfälle pro Minute („counts per minute“)
CREB	„cAMP response element binding protein“
Crk	„chicken tumour virus no. 10 (CT10) regulator of kinase“
C-Terminus	Karboxyterminus
CTP	Cytidintriphosphat
CT-Wert	Schwellenwert bei der Echtzeit-PCR („cycle-threshold“)
Cy3	Carbocyanin 3
Cys	Cystein
d	Tag
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DCC	„deleted in colorectal cancer“

dCTP	Desoxycytidintriphosphat
ΔLIM1	Deletion der LIM1-Domäne bei LMX1B
ΔLIM1+2	Deletion der LIM1- und der LIM2-Domäne bei LMX1B
d(GAT)TP	Mischung aus dGTP, dATP und dTTP
dGTP	Desoxyguanidintriphosphat
d.h.	das heißt
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
DMEM	„Dulbecco’s modified Eagle Medium“
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure („deoxyribonucleic acid“)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
DRAF1	„double-stranded RNA-activated factor 1“
dsRNA	doppelsträngige RNA
dT	Desoxythymidin
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
E47/Pan1	ein Helix-Loop-Helix-Transkriptionsfaktor
<i>Eco</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	„enzyme linked immunosorbent assay“
EMSA	„electrophoretic mobility shift assay“
EST	„expressed sequence tag“
et al.	et alteri
FACS	Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierer („fluorescence-activated cell sorter“)
FAT1	„fatty acid transporter 1“
FCS	Fötale Kälberserum („fetal calf serum“)
FITC	Fluoreszein-Isothiozyanat
FOXC2	„forkhead box C2“
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
FSGS	fokal-segmentale Glomerulosklerose
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/sec ²)

G	Guanin
G _{0/1/2} -Phase	„Lücken“-Phase des Zellzyklus („gap“)
G1P3	Interferon-alpha-induzierbares Protein (Klon IFI-6-16)
GAS	„interferon-gamma activated site“
<i>Gax</i>	„growth arrest-specific homeobox“
GBM	glomeruläre Basalmembran
GLEPP1	„glomerular epithelial protein 1“
Gly	Glycin
GTP	Guanidintriphosphat
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HDAC	Histondeacetylase
HEK293	Zelllinie aus humanen embryonalen Nierenzellen („human embryonic kidney“)
HEK293T	mit dem Gen für das SV40 T-Antigen transfizierte HEK293-Zelllinie
HeLa	humane Zervixkarzinom-Zelllinie
HIF	Hypoxie-induzierbarer Faktor
<i>Hind</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>
His	Histidin
HIV	humanes Immundefizienz-Virus
HMG I	„high mobility group I“
HOOD	Hereditäre Osteo-Onycho-Dysplasie
HRP	Meerrettichperoxidase („horseradish peroxidase“)
HT 1080	Zelllinie aus einem humanen Fibrosarkom
HtTA	HeLa-Zellklon, der konstitutiv den Tetrazyklin-Transaktivator exprimiert
iASPP	„inhibitory ankyrin-repeat-, SH3-domain- and proline-rich-region-containing protein“
IFI16	Interferon-gamma-induzierbares Protein 16
IFI44	Interferon-induziertes Protein 44
IFIT1	Interferon-induziertes Protein mit Tetratrikopeptid-Wiederholungen 1
IFITM1	Interferon-induziertes Transmembranprotein 1 (9-27)
IFITM2	Interferon-induziertes Transmembranprotein 2 (1-8D)
IFITM3	Interferon-induziertes Transmembranprotein 3 (1-8U)

IFN	Interferon
IFN β 2	Interleukin-6
IFNAR	Interferon-alpha/beta-Rezeptor
IgG	Immunglobulin G
I κ B	„inhibitor of κ B”
IKK	I κ B-Kinase
IL	Interleukin
Ink4	„inhibitor of CDK4”
iNOS	„inducible nitric oxide synthetase”
IRF	„interferon regulatory factor“
IRF-E	„IRF response element”
IRS	Insulin-Rezeptor-Substrat
ISG	Interferon-stimuliertes Gen
ISG15	Interferon-stimuliertes Protein, 15 kDa
ISGF3	„interferon-stimulated gene factor 3“
ISRE	„interferon-stimulated response element“
J82	humane Urothelkarzinom-Zelllinie
JAK	Janus-Kinase
JSH-23	4-Methyl-N1-(3-Phenyl-Propyl)-Benzol-1,2-Diamin
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
l	Liter
LamA/C	Lamin A/C
LDB1	„LIM-domain-binding protein 1“ (Synonym für CLIM2)
LDH	Laktatdehydrogenase
Leu	Leucin
Lim6	LMX1B-Ortholog aus <i>Caenorhabditis elegans</i>
LIM-Domäne	benannt nach den Transkriptionsfaktoren Lin-11, Isl-1 und Mec-3, in denen sie erstmals identifiziert wurde
LKB1	eine Tumorsuppressor-Kinase
LMX	LIM-Homöobox-Protein
Lmx1	LMX1B-Ortholog des Huhns
Lmx1.1	ein LMX1B-Ortholog des Hamsters
Lmx1.2	ein LMX1B-Ortholog des Hamsters

LMX1B	LIM-Homöobox-Transkriptionsfaktor 1 beta
LPS	Lipopolysaccharid
Lrrfip1	„leucine rich repeat (in FLII) interacting protein 1“
m	Meter
M	molar
MafB	„musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B“
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MATH6	„meprin-associated Traf homology domain containing protein 6“
MCP-1	„monocyte chemotactic protein 1“
MDB	„membrane desalting buffer“
MEN2A	„multiple endocrine neoplasia type 2A“
mg	Milligramm (10^{-3} g)
min	Minute
ml	Milliliter (10^{-3} l)
mm	Millimeter (10^{-3} m)
mM	millimolar (10^{-3} M)
MMLV	Molonea-Mäuse-Leukämie-Virus
M-Phase	Mitose-Phase des Zellzyklus
mRNA	Boten-RNA („messenger RNA“)
Myt1	Myelin-Transkriptionsfaktor 1
μ Ci	Mikro-Curie (10^{-6} Ci)
μ g	Mikrogramm (10^{-6} g)
μ l	Mikroliter (10^{-6} l)
μ M	mikromolar (10^{-6} M)
n	Anzahl
NAD ⁺	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADH	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid, das ein Hydrid-Ion aufgenommen hat
NEPH1	„nephrin related protein 1“
NF1	Neurofibromin-1
NF2	Neurofibromin-2
NF- κ B	„nuclear factor κ B“
<i>NFKB1</i>	Gen für p105
<i>NFKB2</i>	Gen für p100

NFκBIA	„nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha”
ng	Nanogramm (10^{-9} g)
Nkip1	„NF-κB interacting protein 1“
NK-Zellen	Natürliche Killer-Zellen
Nli	„nuclear LIM interactor“
nm	Nanometer (10^{-9} m)
nM	nanomolar (10^{-9} M)
<i>NPHS1</i>	Gen für Nephtrin
<i>NPHS2</i>	Gen für Podocin
NPS	Nagel-Patella-Syndrom
nTRIP6	„nuclear form of TRIP6”
OAS	2'-5'-Oligoadenylate-Synthase
OD	optische Dichte
OMIM	„Online Mendelian Inheritance in Man“
ORF	kodierende Sequenz eines Gens („open reading frame“)
Otx	„orthodenticle homeobox“
p15	Cdk-Inhibitor p15
p16	Cdk-Inhibitor p16
p18	Cdk-Inhibitor p18
p19	Cdk-Inhibitor p19
p21	Cdk-Inhibitor p21
p27	Cdk-Inhibitor p27
p38 MAPK	eine Unterfamilie der MAPK
p50	eine mögliche Untereinheit von NF-κB-Dimeren
p52	eine mögliche Untereinheit von NF-κB-Dimeren
p53	ein Transkriptionsfaktor und Tumorsuppressor
p57	Cdk-Inhibitor p57
p65	eine mögliche Untereinheit von NF-κB-Dimeren
p100	eine mögliche Untereinheit von NF-κB-Dimeren
p105	eine mögliche Untereinheit von NF-κB-Dimeren
p107	ein Pocketprotein
p130	ein Pocketprotein
p300	ein transkriptioneller Koaktivator

PAX2	„paired box protein 2“
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung („phosphate-buffered saline“)
PCNA	„proliferating cell nuclear antigen“
PCR	Polymerasekettenreaktion („polymerase chain reaction“)
PGA ₁	Prostaglandin A ₁
pH-Wert	negativer dekadischer Logarithmus der Oxoniumionenkonzentration
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIPES	Piperazin-1,4-bis(2-ethansulfonsäure)
PKR	„ds-RNA-dependent protein kinase“
PMSF	Phenylmethylsulphonylfluorid
POD1	„podocyte-expressed 1“
PolyI:C	zweistrangiger Komplex aus Polyinosinsäure und Polycytidylsäure
pRb	Retinoblastom-Protein
PRD	„positive regulatory domain“
PRR	„pattern-recognition receptor“
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RAI	RelA-assoziiertes Inhibitor
RAS	„rat sarcoma“
Rb	Retinoblastom
RELA	„Rel-like domain-containing protein A“
RELB	„Rel-like domain-containing protein B“
RHD	„Rel homology domain“
RIPA	Radio-Immuno-Präzipitations-Assay
RLIM	„RING finger LIM-domain-binding protein“
RNA	Ribonukleinsäure („ribonucleic acid“)
RNAi	„RNA interference“
RNase	Ribonuklease
RNasin	Ribonuklease Inhibitor
rpm	Umdrehungen pro Minute („revolutions per minute“)
RPMI	„Roswell Park Memorial Institute“
rRNA	ribosomale RNA
RT	reverse Transkriptase
RT4	humane Urothelzellkarzinom-Zelllinie
RT112	humane Urothelzellkarzinom-Zelllinie

RT-qPCR	Echtzeit-RT-PCR
s	Sekunde
S9	ribosomales Protein der 30S-Untereinheit
SDS	Natriumdodecylsulphat („sodium dodecyl sulphat“)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Sin3A	Sin3-Homolog A
sog.	sogenannt
S-Phase	Synthese-Phase des Zellzyklus
SSC	„sodium chloride/sodium citrate“
STAT	„signal transducer and activator of transcription“
STR	„short tandem repeat“
T	Thymin
TAE-Puffer	Tris/Azetat/EDTA-Puffer
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris/Borat/EDTA-Puffer
TE	Tris/EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin
Tet	Tetrazyklin
tetO	Tetrazyklin-Operator
<i>T. gondii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
Thr	Threonin
TIR	Toll/IL-1-Rezeptor
TLR	Toll-like Rezeptor
T-Lymphocyten	Lymphocyten, die ihre Differenzierung im Thymus durchlaufen
T _M	Schmelztemperatur („melting temperature“)
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TRAM	„TRIF-related adaptor molecule“
TRIF	„TIR-domain-containing adaptor-inducing IFN“
TRIP6	„thyroid hormone receptor interactor 6“
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	Transport-RNA
TSC1	tuberöse Sklerose-Komplex („tuberous sclerosis complex“)
tTA	tetrazyklin-kontrollierter Transaktivator
TUNEL	„terminal deoxynucleotidyl transferase biotin-dUTP nick end labelling“

TYK	Tyrosinkinase
U	Unit (internationale Enzymeinheit)
u.a.	unter anderem
UROtsa	humane Urothelzelllinie, mit SV40 large T-Antigen immortalisiert
UTP	Uridintriphosphat
UV-Licht	ultraviolettes Licht
V	Volt
v.a.	vor allem
VEGF	„vascular endothelial growth factor“
VSM	„vascular smooth muscle“
v:v	Verhältnis Volumen zu Volumen
Wee1	eine Tyrosin-Kinase
WT1	Wilms Tumor 1
X	beliebige Aminosäure
<i>Xba</i>	<i>Xanthomonas badrii</i>
z.B.	zum Beispiel
ZMBH	Zentrum für Molekulare Biologie Heidelberg
ZMF	Zentrum für medizinische Forschung (Mannheim)
ZO-1	Zonula Occludens 1
z.T.	zum Teil

1. Einleitung

1.1 Der glomeruläre Filter der Niere

Der glomeruläre Filter der Niere und die präzise Kontrolle der Filtrationsrate sind für den Menschen überlebenswichtig. Die menschlichen Nieren produzieren täglich ungefähr 180 Liter Primärharn aus Blut mit einer Konzentration von 50 bis 70 Gramm Protein pro Liter [Haraldsson und Sörensson, 2004]. Umso erstaunlicher ist es, dass dieses Primärfiltrat nur eine äußerst geringe Menge hochmolekularer Proteine wie Albumin oder Immunglobuline enthält. Der hochkomplizierte Aufbau des glomerulären Filters und Mechanismen, die zu Störungen dieses Systems führen, sind noch immer Gegenstand reger Forschung.

Die klassische Baueinheit in der Rinde der menschlichen Niere ist das Nephron. Es besteht aus einem Nierenkörperchen und einem unverzweigtem Nierentubulus. Letzterer mündet in ein Sammelrohr, das den im Nephron gebildeten Harn in das Nierenbecken leitet. Die Nierenkörperchen, auch Malpighi-Körperchen genannt, von denen jede menschliche Niere ungefähr eine Million enthält, setzen sich aus Bowman-Kapsel mit innerem und äußerem Blatt, Blutkapillare und Mesangium zusammen. Das äußere Blatt der Bowman-Kapsel bildet die äußere Begrenzung des Nierenkörperchens. Das innere Blatt besteht aus den sog. Podozyten und liegt dem Glomerulus, einem Blutkapillarknäuel, welches das zu filtrierende Blut führt und sich in die Bowman-Kapsel einstülpt, auf [Übersicht der Nierenstruktur in Sobotta und Welsch, 2003]. Durch diesen Aufbau vorgegeben besteht die glomeruläre Filtrationsbarriere aus den drei folgenden Komponenten: dem fenestrierten Endothel der Blutkapillaren, der glomerulären Basalmembran (GBM) und den Podozyten.

Über die Funktion des fenestrierten Kapillarendothels bei der Filtration ist noch wenig bekannt. Die Öffnungen in den Endothelzellen besitzen einen Durchmesser von 70 bis 100 nm und werden nicht von einer Membran bedeckt, die eine physikalische Barriere für Makromoleküle aus dem Blut darstellen könnte. Auch für eine Bedeutung der Glykokalyx auf der Oberfläche der Zellen bei der Filtration gibt es keine direkten Beweise [Tryggvason et al., 2006]. Bei der Einwanderung der Endothelzellen und ihrer späteren Fenestrierung spielt das

von den Podozyten sezernierte VEGF („vascular endothelial growth factor“) eine entscheidende Rolle [Eremina und Quaggin, 2004].

Bei der glomerulären Basalmembran handelt es sich um eine extrazelluläre Matrix mit einer Dicke zwischen 300 und 350 nm. Sie übt eine wichtige Stützfunktion für die Kapillarwände aus, auf denen ein hoher transmuraler Druck lastet [Tryggvason et al., 2006]. Die Hauptbestandteile der GBM sind Kollagen vom Typ IV, das auch das Grundgerüst anderer Basalmembranen bildet [Desjardins und Bendayan, 1991], Proteoglykane [Groffen et al., 1997], Laminin [Hansen und Abrass, 1999] und Nidogen/Entactin [Katz et al., 1991]. Auch die Rolle der GBM bei der Filtration von Makromolekülen ist noch umstritten. So scheint Kollagen IV zwar für die Stützfunktion der Membran unverzichtbar zu sein, aber nicht zur Größen- oder Ladungselektivität des Filters beizutragen [Barker et al., 1990; Hudson et al., 2003]. Auch die Proteoglykane scheinen dabei keine wichtige Rolle zu spielen. Dagegen gibt es Hinweise darauf, dass Laminin-11 wichtig für die Filtration ist [Zenker et al., 2004]. Am Anfang der Glomerulumentwicklung wird die GBM sowohl von den sich differenzierenden Podozyten als auch von den Endothelzellen synthetisiert. Später wird diese Aufgabe fast ausschließlich von den Podozyten übernommen [McCarthy, 1997].

1.2 Podozyten

Während der Beitrag der Endothelzellen und der Basalmembran zum glomerulären Filter noch kontrovers diskutiert wird, ist die zentrale Rolle der Podozyten bei der Ultrafiltration und demnach bei einer Vielzahl erblicher und erworbener Krankheiten der Niere unumstritten. Die Details der Podozytenfunktion sind dennoch weitgehend unbekannt.

Podozyten sind hochdifferenzierte Zellen. Ihr voluminöser Zellkörper wölbt sich in den, den Primärharn aufnehmenden, Kapselraum und besitzt kräftige primäre Fortsätze. Von diesen gehen wiederum zahlreiche sekundäre Fortsätze, die sog. Fußfortsätze, aus. Die Fortsätze umschließen die Kapillare, der der Podozyt aufsitzt, wobei die Fußfortsätze benachbarter Primärfortsätze verzahnt sind. Zwischen ihnen bleibt ein 30 bis 40 nm weiter meanderförmiger Spaltraum frei, ein im Dienste der Ultrafiltration stehender Interzellulärraum. Er wird von einer 5 nm dicken extrazellulären Struktur mit 2 bis 5 nm weiten Poren, der Schlitzmembran, überspannt. Diese ist reich an negativ geladenen

Sialoglykoproteinen wie Podokalyxin. Diese sind auch kennzeichnend für die Glykokalyx der Podozytenfortsätze. Die negative Ladung beeinflusst zusammen mit der Weite der Poren die Filtrationseigenschaften des Interzellularraums [Übersicht über die Podozytenstruktur bei Sobotta und Welsch, 2003 und Pavenstädt et al., 2003].

Die Schlitzmembran ähnelt einer Adhärenz-Verbindung zwischen Zellen [Pavenstädt et al., 2003]. Die sie aufbauenden Proteine wurden teilweise erst in den letzten Jahren identifiziert, vornehmlich im Zusammenhang mit verschiedenen Erkrankungen der Niere. Zu ihnen gehören Nephrin, Podocin, ZO-1, CD2AP, FAT1, NEPH1 und P-Cadherin [Huber und Benzing, 2005]. So führen Mutationen im Gen für Podocin, *NPHS2*, zum Steroid-resistenten nephrotischen Syndrom [Boute et al., 2000], welches bei den betroffenen Patienten bereits in jungen Jahren zu Nierenversagen führt. *NPHS2* wird ausschließlich in den Podozyten sich entwickelnder und reifer Glomeruli exprimiert [Huber und Benzing, 2005]. Podocin, ein Mitglied der Stomatin-Proteinfamilie, interagiert mit CD2AP und Nephrin [Pavenstädt et al., 2003]. Es rekrutiert Nephrin an seinen Bestimmungsort und erhöht dadurch dessen Signaltransduktion [Huber et al., 2003]. Das Gen für Nephrin, *NPHS1*, ist bei Patienten mit kongenitalem nephrotischem Syndrom vom finnischen Typ, das u.a. mit einer massiven Proteinurie einhergeht und rasch zum Tod führt, mutiert [Kestilä et al., 1998].

Über die Transkriptionsregulation in Podozyten ist noch wenig bekannt [Rascole et al., 2007]. Transkriptionsfaktoren, die nachweislich eine wichtige Rolle in Podozyten spielen, sind WT1 [Mundlos et al., 1993; Grubb et al., 1994], MafB [Sadl et al., 2002], FOXC2 [Takemoto et al., 2006] und LMX1B (siehe Kapitel 1.4). *WT1* kodiert für ein Tumorsuppressorprotein aus der Familie der Cys₂His₂-Transkriptionsfaktoren. Mutationen in diesem Gen führen zu Wilms-Tumoren [Haber et al., 1990] und den beiden seltenen Nierenfehlbildungen Denys-Drash-Syndrom [Pelletier et al., 1991] und Frasier-Syndrom [Barboux et al., 1997]. Das für Nephrin kodierende *NPHS1* ist ein Zielgen von WT1 [Wagner et al., 2004]. Bei Inaktivierung des für MafB (Maf-1, Kreisler) kodierenden Gens unterbleibt die Entwicklung von Fußfortsätzen und Schlitzmembranen bei Podozyten. Ein Zielgen von MafB ist bis heute nicht sicher identifiziert, allerdings geht der zuvor genannte Verlust von Fußfortsätzen mit der verminderten Expression von *Nphs1*, *Nphs2* und *Cd2ap* einher [Sadl et al., 2002; Moriguchi et al., 2006]. Auch die Podozyten von *Foxc2*^(-/-)-Mäusen bilden keine Fußfortsätze und Schlitzmembranen. Die Synthese von Podocin, den Kollagen VI α 3- und VI α 4-Ketten und MafB sowie die Expression des kürzlich identifizierten Podozyten-Markers *Cited2* waren in

diesen Mäusen herunterreguliert [Takemoto et al., 2006]. Weitere Transkriptionsfaktoren, die mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit eine Rolle in Podozyten spielen, sind Hypoxie-induzierbare Faktoren (HIFs), der mit LMX1B verwandte LIM-Homöodomäne-Transkriptionsfaktor LIM1, das mit LMX1B interagierende PAX2, CITED2, Lrrfip1, MATH6, POD1 und Retinolsäure-Rezeptoren [Übersicht in Rasclé et al. 2007].

1.3 Das Nagel-Patella-Syndrom

Das Nagel-Patella-Syndrom (NPS; OMIM 161200) ist eine nach ihren hervorstechendsten Symptomen, Hypo- oder Dysplasie der Finger- und seltener der Fußnägel und hypoplastische oder fehlende Kniescheiben (Patellen), benannte Erbkrankheit. Durch Turner, Kieser, Trauner, Rieger und Fong veröffentlichte Fallstudien gaben ihr ebenfalls die Namen Turner-Kieser-Syndrom, Trauner-Rieger-Syndrom und Fong-Syndrom [Turner, 1933; Fong, 1946], andere prägten das Synonym „Hereditäre Osteo-Onycho-Dysplasie“ (HOOD) [Looij et al., 1988].

NPS tritt mit einer Prävalenz von ungefähr 1 pro 50.000 Lebendgeburten weltweit vergleichbar selten auf und wird autosomal-dominant vererbt [Bongers et al., 2002]. Die klinischen Symptome von NPS sind sowohl bezüglich der Häufigkeit ihres Auftretens als auch ihrer Schwere äußerst variabel. Außerdem sind inter- und intrafamiliäre Variabilität typisch für diese Krankheit [McIntosh et al., 2005]. Außer den oben beschriebenen Nagel- und Knieanomalien treten bei den Patienten weitere Anomalien des Skelettsystems auf, wobei Knochen, Sehnen, Bänder und Muskeln gleichermaßen betroffen sein können. So finden sich z.B. Exostosen im Bereich der Darmbeinschaukeln (sog. Beckenhörner), Fehlbildungen der Ellenbogen durch Radiusköpfchenluxation, Wirbelsäulenverkrümmung (Skoliose und Lordose) oder Hand- und Fußdeformationen (Klumpfüße) [Übersicht bei Sweeney et al, 2003]. Häufig sind auch andere Körpersysteme wie das Auge in Form eines primären Offenwinkelglaukoms, der Gastrointestinaltrakt, das Nervensystem, die Vasomotorik oder die Zähne betroffen [Sweeney et al, 2003]. Eine größere Anzahl weiterer Symptome wird diskutiert.

Der schwerwiegendste Aspekt von NPS ist jedoch eine Beteiligung der Nieren, wie sie bei 12 bis 55% der Patienten auftritt und lebensbedrohlich werden kann. Bei 5 bis 14% entwickelt

sich im Laufe des Lebens eine terminale Niereninsuffizienz [Sweeney et al, 2003]. Die zunächst auftretenden milderen Formen zeigen sich als Proteinurie oder seltener Hämaturie. Strukturelle Veränderungen in der Niere können diese Nephropathie erklären. So finden sich lichtmikroskopisch eine Glomerulosklerose und Proteinzyylinder in den Tubuli. Elektronenmikroskopisch lässt sich, höchst spezifisch für NPS, eine Verdickung der glomerulären Basalmembran nachweisen, die sowohl mit irregulären Ablagerungen von Kollagenfibrillen-ähnlichem Material als auch mit an Mottenfraß erinnernden Aufhellungen einhergeht [del Pozo und Lapp, 1970; Ben-Bassat et al., 1971]. Zusätzlich wurden Verschmelzungen der podozytären Fußfortsätze beobachtet [Chen et al., 1998]. Die durch diese Veränderungen entstehende höhere Durchlässigkeit des glomerulären Filters erlaubt ein Durchtreten von Proteinen und korpuskulären Blutbestandteilen in den Urin, was zu besagter Protein- und Hämaturie führt.

Schon früh konnte die Kopplung des NPS-Lokus an die Loci für die AB0-Blutgruppen [Renwick und Lawler, 1955] und das Adenylatkinase 1-Gen [Schleutermann et al., 1969] nachgewiesen werden. Erst viel später wurde der Locus auf einen 1 bis 2 cM großen Bereich auf Chromosom 9q34.1 eingegrenzt [McIntosh et al., 1997; Eyaid et al., 1998]. Aufgrund der Ähnlichkeit des Phänotyps von NPS-Patienten mit dem der *Lmx1b*-Knockout-Maus und der mittlerweile bekannten Lokalisation des *LMX1B*-Gens auf Chromosom 9q34 wurden dann erstmals Mutationen im *LMX1B*-Gen für das Nagel-Patella-Syndrom verantwortlich gemacht [Dreyer et al., 1998; McIntosh et al., 1998; Vollrath et al., 1998]. Bis heute wurden mehr als 130 Mutationen bei NPS-Patienten beschrieben [Dunston et al., 2004]. Eine neue Studie konnte zeigen, dass Patienten mit einer Mutation im für die Homöodomäne des LMX1B-Proteins kodierenden Bereich (siehe Kapitel 1.4) häufiger und stärker unter Proteinurie leiden als Patienten mit Mutationen in anderen Bereichen [Bongers et al., 2005]. Für nicht-renale Manifestationen ergab sich, auch innerhalb von NPS-Familien mit der gleichen Mutation, bisher keine Korrelation zwischen Schwere des Krankheitsbildes und Typ oder Lokalisation der Mutation [McIntosh et al., 1998; Knoers et al., 2000].

Für den pathogenetischen Wirkmechanismus der Mutationen scheint ein dominant-negativer Mechanismus oder ein Funktionsgewinn ausgeschlossen. Es wurden Mutationen am 5'-Ende der kodierenden Region des *LMX1B*-Gens beschrieben, die ein Stopp-Kodon einführen und so zur Synthese eines sehr kurzen Proteins ohne die für seine Funktion essentiellen Domänen führen [Vollrath et al., 1998]. Plausibler erscheint Haploinsuffizienz [Dreyer et al., 2000].

1.4 Der LIM-Homöodomäne-Transkriptionsfaktor LMX1B

LMX1B ist ein, je nach Isoform, 395 bzw. 402 Aminosäuren großes Mitglied der Familie der LIM-Homöodomäne-Proteine [Dunston et al., 2004]. Als solches besitzt es aminoterminal zwei proteinbindende LIM-Domänen (LIM1 mit 51 Aminosäuren und LIM2 mit 54 Aminosäuren) und darauf folgend eine DNA-bindende Homöodomäne (mit 63 Aminosäuren). Zusätzlich befindet sich am Karboxyterminus eine glutamin- und serinreiche mutmaßliche transkriptionelle Aktivator-domäne.

Die LIM-Domänen sind nach den ersten drei Proteinen benannt, in denen sie identifiziert wurden: Lin-11 aus *C. elegans*, Isl-1 aus der Ratte und Mec-3 wiederum aus *C. elegans*. Alle drei sind Transkriptionsfaktoren, die eine wichtige Rolle bei der Ontogenese spielen [Freyd et al., 1990; Karlsson et al., 1990; Way und Chalfie, 1998]. Danach wurden sie in mehreren Dutzend verschiedenen Proteinen wie z.B. Transkriptionsfaktoren, Protoonkogen-Produkten und Zytoskelett-assoziierten Proteinen gefunden. Eine LIM-Domäne besteht aus zwei Zinkfinger-ähnlichen Modulen und hat die cysteinreiche Konsensus-Sequenz Cys-X₂-Cys-X₁₆₋₂₃-His-X₂-Cys-X₂-Cys-X₂-Cys-X₁₆₋₂₁-Cys-X₂-Cys/His/Asp [Freyd et al., 1990]. Diese ist wichtig für die zinkbindenden Eigenschaften der Module [Michelsen et al., 1993]. LIM-Domänen scheinen trotz ihrer strukturellen Ähnlichkeit mit klassischen Zinkfingern nicht an DNA binden zu können, sondern vermitteln Protein-Protein-Interaktionen [Dawid et al., 1995], darunter auch Dimerisierung [Feuerstein et al., 1994]. Man findet LIM-Domänen alleine oder in Kombination mit anderen Domänen wie der Homöodomäne. Letzteres ist bei den LIM-Homöodomäne-Transkriptionsfaktoren der Fall, zu denen auch LMX1B gehört. Diese regulieren die Expression von Genen, die Körperbauplan und Zelldifferenzierung während der Entwicklung bestimmen, und enthalten zwei LIM- und eine Homöodomäne [Curtiss und Heilig, 1998].

Die hochkonservierte Homöodomäne hat ihren Namen von den homöotischen Genen aus *Drosophila melanogaster*, bei denen sie zum ersten Mal entdeckt wurde. Diese Gene bestimmen die Identität von Körperstrukturen und kontrollieren den Grundbauplan des Embryos [McGinnis et al., 1984]. Eine Homöodomäne umfasst 60 Aminosäuren, die drei α -Helices und einen verlängerten aminoterminalen Arm bilden. Gemäß der Ähnlichkeit von zweiter und dritter Helix mit dem Helix-turn-helix-Motiv lagert sich die dritte, carboxyterminale Helix an die große Furche der DNA und übernimmt die Mehrzahl der

Protein-DNA-Kontakte. Der aminoternale Arm geht in der kleinen Furche Kontakt mit der DNA ein [Gehring et al., 1994]. Für die Homöodomäne von LMX1B wurde in EMSAs („electrophoretic mobility shift assays“) eine Bindung an adenin- und thyminreiche FLAT-Elemente (FLAT-E: TAATTA; FLAT-F: TTAATA) gezeigt [German et al., 1992; Dreyer et al., 1998]. Die Homöodomänen von LIM-Homöodomäne-Proteinen besitzen als charakteristische Signatur die Aminosäuresequenz Thr-Gly-Leu auf Position 38 bis 40 [Banerjee-Basu und Baxevanis, 2001].

Eine Transaktivierungsdomäne besteht häufig aus sauren oder glutamin-, prolin-, serin/threonin- oder alaninreichen Aminosäuresequenzen [Übersicht bei Knippers, 1997]. Transaktivierungsdomänen findet man bei aktivierenden spezifischen Transkriptionsfaktoren, die die Formation des basalen Transkriptionsapparates aus allgemeinen Transkriptionsfaktoren und RNA-Polymerase II am Promotor und damit die Transkriptionsinitiation beschleunigen. Dies führt zu einer erhöhten Transkriptionsrate [Alberts et al., 1995]. Durch die Bindung des Transkriptionsfaktors an DNA wird die Transaktivierungsdomäne in die Nähe der transkriptionellen Startstelle gebracht. Spezifische Transkriptionsfaktoren bestimmen die differentielle Genexpression, d.h. die durch zeitliche, räumliche, zelltyp- oder organspezifische und signalvermittelte Parameter beeinflusste genspezifische Transkription.

LIM-Homöodomäne-Transkriptionsfaktoren regulieren die Expression von Genen, die Zell- bzw. Gewebedifferenzierung und Körperbauplan während der Entwicklung bestimmen [Übersicht bei Curtiss und Heilig, 1998]. Dies gilt selbstverständlich auch für die LMX-Gruppe, einer der sechs Subgruppen der LIM-Homöodomäne-Proteine, der LMX1B angehört. Die anderen Mitglieder dieser Gruppe sind *Lmx1b* aus der Maus, *Lmx1* aus dem Huhn, *Lmx1.1* und *Lmx1.2* aus dem Hamster und *Lim6* aus *Caenorhabditis elegans* [Hobert und Westphal, 2000].

Zur Aufklärung der Funktion von LMX1B und seiner Rolle während der Entwicklung haben v.a. Knockout-Studien des orthologen Gens in der Maus beigetragen. Das murine *Lmx1b* ist auf der Ebene der Aminosäuren zu 99% identisch mit dem humanen LMX1B [Dreyer et al., 1998], der Phänotyp von NPS-Patienten und Knockout-Maus ähnelt sich [Chen et al., 1998]. Im Unterschied zum Menschen, bei dem NPS autosomal-dominant vererbt wird, entwickeln heterozygote Mäuse jedoch keinen Phänotyp, weswegen sämtliche Beobachtungen an

Lmx1b^(-/-)-Mäusen gemacht werden mussten [Chen et al., 1998]. Aufgrund der Schwere der Anomalien sterben diese Mäuse binnen 24 Stunden nach Geburt.

In guter Übereinstimmung mit den Skelettanomalien von NPS-Patienten besteht der Phänotyp der Knockout-Mäuse im Bereich der Gliedmaßen in einem Defekt bei der Ausbildung dorsoventraler Muster. Hierbei ist die Expression von *Lmx1b* für die Spezifikation dorsaler Strukturen wie Nägel und Patellen notwendig [Chen et al., 1998] und zuerst ab dem embryonalen Tag 8,5 in den Anlagen für die vorderen Gliedmaßen zu detektieren [Cygan et al., 1997]. Nägel und Patellen fehlen der Knockout-Maus, ferner findet sich eine Verdopplung ventraler Strukturen [Chen et al., 1998].

Die ultrastrukturellen Anomalien der glomerulären Basalmembran und der Podozyten in der Niere der Knockout-Mäuse gleichen ebenfalls den für die NPS-Patienten beschriebenen [Chen et al., 1998]. *Lmx1b*-Expression ist erstmals am embryonalen Tag 13,5 in S-förmigen Körpern der Niere zu beobachten [Chen et al., 1998]. Sie scheint, zumindest postnatal, auf die Podozyten beschränkt zu sein [Chen et al., 1998; Rascle, Daten nicht veröffentlicht]. Ihr Fehlen in den Knockout-Tieren führt zu einer fehlerhaften Genexpression in der Niere, was die Rolle von *Lmx1b* als Transkriptionsfaktor unterstreicht. So scheinen die Gene für Kollagen IV α 3 und Kollagen IV α 4, Podocin und CD2AP Zielgene von *Lmx1b* zu sein, und ihre Expression wird vermutlich durch seine Bindung an FLAT-Elemente im Promotor oder Enhancer dieser Gene kontrolliert [Morello et al., 2001; Miner et al., 2002; Rohr et al., 2002]. Im Kontrast hierzu konnte an Nierenbiopsien von NPS-Patienten kein Mangel an Kollagen vom Typ IV, Podocin oder CD2AP nachgewiesen werden [Heidet et al., 2003]. Dies lässt sich vielleicht durch die großen Unterschiede zwischen den verglichenen Systemen bezüglich Entwicklungsstadium, Pathologie und Zahl der verbliebenen Wildtypallele erklären.

Lmx1b wird nachgewiesenermaßen auch im sich entwickelnden Auge der Maus exprimiert. Veränderungen in der Hornhaut der Knockout-Mäuse wie abnorme Ausbildung der Kollagenfibrillen sprechen für eine direkte Beteiligung von *LMX1B* an der Entstehung von Glaukomen bei NPS-Patienten [Pressman et al., 2000]. Ferner können die sehr gut untersuchte Expression von *Lmx1b* im zentralen Nervensystem der Maus und die Bedeutung von *Lmx1b* bei der Entwicklung diverser neuronaler Strukturen verschiedene Symptome der Patienten wie vermindertes Schmerzempfinden erklären [Dunston et al., 2005].

Über die Biochemie von LMX1B ist bisher wenig bekannt. LIM-Homöodomäne-Transkriptionsfaktoren können über ihre LIM-Domänen mit anderen Proteinen, sog. Kofaktoren, oder anderen Transkriptionsfaktoren in Wechselwirkung treten. Dies kann sowohl steigernde (Koaktivatoren) als auch inhibierende (Korepressoren) Effekte auf die Aktivierung der Gene durch die Transkriptionsfaktoren haben [Übersicht bei Rétaux und Bachy, 2002]. Durch direkte Interaktion zweier Transkriptionsfaktoren oder indirekte Interaktion durch ein vermittelndes Protein können Aktivierungskomplexe höherer Ordnung gebildet werden. Zwei bekannte Interaktionspartner von LMX1B sind LDB1 und E47/Pan1. Für RLIM wird eine Interaktion vermutet [McIntosh et al., 2005].

LDB1 („LIM-domain-binding protein 1,“) [Agulnick et al., 1996], auch als Nli („nuclear LIM interactor“) [Jurata et al., 1996] und Clim2 („cofactor of LIM 2“) [Bach et al., 1997] bezeichnet, ist ein Adaptorprotein. Es bindet als Homodimer an LIM-Domänen von LIM-Homöobox-Proteinen [Agulnick et al., 1996; Matthews und Visvader, 2003; Suleiman et al., 2006] und verbindet diese mit anderen Transkriptionsfaktoren. In dieser Funktion kann es sowohl hemmend [Dreyer et al., 2000] als auch aktivierend [Hobert und Westphal, 2000] auf LMX1B wirken. So verbindet bei Mäusen ein Ldb1-Homodimer das Protein Otx mit Lmx1b, wodurch Gene aktiviert werden, die während der Embryogenese von Bedeutung sind [Bach et al., 1997]. Bei E47/Pan1 handelt es sich um ein Helix-Loop-Helix-Protein, das in einer Interaktion mit Lmx1.1 bzw. Lmx1.2 einen Minienhancerkomplex bildet, der den Ratten-Insulinpromotor aktiviert [German et al., 1992]. Dabei treten die beiden miteinander in Kontakt, während Lmx1.1 bzw. Lmx1.2 an FLAT-Sequenzen des Promotors und E47/Pan1 an benachbarte FAR-Sequenzen gebunden sind. Bindet hieran wiederum ein Ldb1-Komplex, wird die synergistische Aktivierung des Promotors durch Lmx1 und E47/Pan1 inhibiert [Jurata und Gill, 1997]. RLIM („RING finger LIM-domain binding protein“) ist ein negativer Kofaktor von LIM-Homöodomäne-Transkriptionsfaktoren, der die Transkription über die Rekrutierung des Sin3A/Histondeacetylase (HDAC)-Korepressor-Komplexes inhibiert. [Bach et al., 1999]. Auch hier können Ldb1-Komplexe zur Inhibierung beitragen. Auf einer anderen Ebene negativer Regulation markiert RLIM mittels Ubiquitinligase-Aktivität LDB1 und andere Kofaktoren von LIM-Homöodomäne-Transkriptionsfaktoren für die Degradierung über den 26S-Proteasomen-Weg [Ostendorff et al., 2002]. CLIM-Kofaktoren können mit RLIM um die Bindung an LIM-Domänen konkurrieren, und so ist der beschriebene Mechanismus eine Möglichkeit des Austausches von Kofaktoren bei der Transkriptionsregulation.

Das *LMX1B*-Gen ist aus acht Exons aufgebaut, von denen das zweite und dritte jeweils für eine der beiden LIM-Domänen kodiert. Die Sequenz für die Homöodomäne teilt sich auf die Exons 4, 5 und 6 auf. Die bei NPS-Patienten festgestellten Missense-Mutationen konzentrieren sich auf die Homöodomäne und die LIM-Domänen [Clough et al, 1999; Hamlington et al., 2001], Frameshift- und Nonsense-Mutationen sind etwas weiter über die kodierende Sequenz verteilt, wobei jedoch nur ein verschwindend geringer Anteil von Mutationen in den Exons 1, 6, 7 und in dem für die Transaktivierungsdomäne kodierenden Exon 8 entdeckt wurden [Dunston et al., 2004]. Dies lässt darauf schließen, dass die Aktivator-domäne für die Funktion von LMX1B weniger wichtig ist, Mutationen könnten aber auch zu einem von NPS verschiedenen Phänotyp führen. Die glutamin- und serinreiche Sequenz, die eine Aktivator-domäne vermuten lässt, findet sich außer in LMX1B nur noch im Lmx1.1-Protein des Hamsters [McIntosh et al., 2005]. Ihre Deletion führte in *in vitro*-Studien bei beiden Proteinen zum Funktionsverlust [Dreyer et al., 2000; Johnson et al., 1997]. Es existieren jedoch keine Hinweise darauf, dass *in vitro*-Effekte von Mutationen mit der Art und Schwere von Symptomen *in vivo* bei NPS-Patienten korrelieren [McIntosh et al., 1998; Clough et al., 1999]. Missense-Mutationen in der Homöodomäne betreffen hauptsächlich bei den LIM-Homöodomäne-Proteinen konservierte Aminosäurereste und verhindern die Bindung des Transkriptionsfaktors an die DNA [McIntosh et al., 1998]. Auch die Missense-Mutationen in den für die LIM-Domänen kodierenden Exons führen zu Änderungen von Aminosäureresten, die bei allen LIM-Domänen konserviert sind [Dawid et al., 1995]. Sie zerstören die für die Bindung anderer Proteine benötigten Zinkfinger-Strukturen [Hamlington et al., 2001]. Interessanterweise wurde in der LIM1-Domäne eine größere Anzahl von Mutationen gefunden als in der LIM2-Domäne [Clough et al., 1999]. Beobachtungen, die der LIM2-Domäne eine größere funktionelle Signifikanz zuschreiben [Johnson et al., 1997], lassen vermuten, dass Mutationen dieser Domäne bereits in der frühen Embryonalentwicklung letal sind.

1.5 Der Zellzyklus

Beim sog. Zellzyklus handelt es sich um den Zyklus aus Verdopplung der Erbinformation und anschließender Zweiteilung, mit dem sich eine Zelle vermehrt. Er wird durch ein strenges, mehrere Ebenen umfassendes Kontrollsystem überwacht. Dies ist z.B. bei der Regulation der

Zellzahl in Geweben unverzichtbar, da unregelmäßige Zellteilungen zur Krebsentstehung führen können.

Nach seinen unterschiedlichen Vorgängen teilt man den Zellzyklus in S-Phase, M-Phase und G-Phasen ein. In der Synthese-Phase (S-Phase) wird die DNA der Zelle verdoppelt. In der darauf folgenden Mitose-Phase (M-Phase) erfolgen Chromosomentrennung und Zellteilung. In den meisten Zellzyklen sind zusätzliche Lücken, die Gap-Phasen (G-Phasen; engl.: gap = Lücke) eingeschoben: eine G₁-Phase zwischen M-Phase und S-Phase sowie eine G₂-Phase zwischen S-Phase und Mitose. Diese Phasen ermöglichen das Zellwachstum und dienen der Zelle zur Überprüfung der inneren und äußeren Bedingungen zur Fortsetzung des Zyklus. Bei ungünstigen Umweltbedingungen z.B. verzögern Zellen das Durchlaufen der G₁-Phase oder treten in einen eigenen Ruhezustand, genannt G₀, ein. Dieser kann Tage bis Jahre andauern, manche Zellen wie Podozyten oder Neuronen verbleiben nach abgeschlossener Differenzierung sogar dauerhaft in G₀. In den meisten Zellen gibt es zusätzlich mehrere Kontrollpunkte, an denen der Zellzyklus angehalten werden kann, falls vorhergehende Vorgänge nicht erfolgreich beendet wurden [Übersicht in Alberts et al., 1995].

Den Kern der Zellzykluskontrolle bilden die Cyclin-abhängigen Kinasen (Cdks), eine Familie von Proteinkinasen, deren Aktivität im Laufe des Zellzyklus zu- und wieder abnimmt. Damit einhergehend ändert sich auch der Phosphorylierungszustand und somit die Aktivität von Proteinen, die an der Steuerung wesentlicher Zellzyklusvorgänge beteiligt sind. Die Aktivität der Cdks andererseits wird u.a. von den Cyclinen kontrolliert, an die sie gebunden werden. Durch periodische Schwankungen der Cyclinspiegel werden die Cyclin-Cdk-Komplexe periodisch zusammengebaut und aktiviert, was wiederum Zellzyklusvorgänge aktiviert. In den verschiedenen Phasen des Zyklus bilden sich verschiedene dieser Komplexe. So üben die an Cdk4 und Cdk6 bindenden Cycline D1, D2 und D3 ihre Funktion zu Beginn der G₁-Phase aus, Cyclin E bindet in der späten G₁- und frühen S-Phase an Cdk2. Cyclin A bindet ebenfalls an Cdk2, dies jedoch beim Übergang zur S-Phase sowie beim Übergang von der G₂- zur M-Phase. An Cdk1 (cdc2) gebunden wirkt Cyclin B in der M-Phase [Übersicht in Alberts et al., 1995].

Die Aktivität von Cyclin-Cdk-Komplexen wird auch infolge starker Veränderung der Struktur des aktiven Zentrums der Cdks durch die Bindung von Cdk-Inhibitorproteinen (CKIs) gehemmt. Hier unterscheidet man die CKIs der Ink4-Familie (p15, p16, p18 und p19) und der

Cip/Kip-Familie (p21, p27 und p57) [Übersicht in Pagano, 1995]. Eine weitere Möglichkeit der Hemmung ist die Phosphorylierung von Aminosäuren im aktiven Zentrum der Cdks durch bestimmte Proteinkinasen wie Myt1 und Wee1. Eine Dephosphorylierung dieser Stellen durch Phosphatasen wiederum verstärkt die Cdk-Aktivität [Übersicht in Obya und Sedivy, 2002].

Das CKI p21 besitzt eine Vielzahl von Funktionen [Dotto, 2000], von denen seine Mitwirkung bei der Zellzykluskontrolle die am besten untersuchte und dabei vielfältigste ist [Übersicht bei Gartel und Tyner, 1998]. *In vitro* auch als positiver Regulator der G₁-Phase des Zellzyklus charakterisiert [Griffin et al., 2003], spielt p21 in der Regel jedoch die Rolle eines negativen Regulators. So kann es in der G₁-Phase durch Inhibition von Cdk2, Cdk3, Cdk4 und Cdk6 verzögernd auf den Zellzyklus wirken [Harper et al., 1995], aber auch einen Stillstand in G₀ [Pavenstädt et al., 2003] oder in der G₂-Phase [Dulic et al., 1998; Niculescu et al., 1998] hervorrufen. Es interagiert mit PCNA und blockiert damit dessen Aktivierung der DNA-Polymerase δ , was *in vitro* die DNA-Replikation inhibiert [Waga et al., 1994]. Über die Regulation der *p21*-Expression ist bekannt, dass sie sowohl auf der transkriptionellen als auch auf der posttranskriptionellen Ebene erfolgen kann. Auf beiden Ebenen spielt das Tumorsuppressor-Protein p53, das für die Transaktivierung mehrerer an der Wachstumskontrolle beteiligter Gene benötigt wird, eine wichtige Rolle. Es kann durch posttranskriptionelle Modifikationen die Stabilität der *p21*-mRNA erhöhen, die posttranslationale Stabilität des *p21*-Proteins wird durch den Transkriptionsfaktor c/EBP α erhöht [Übersicht bei Gartel und Tyner, 1999]. Es existieren jedoch auch p53-unabhängige Mechanismen der transkriptionellen Regulation. So resultierte interessanterweise die Überexpression des für einen Homöobox-Transkriptionsfaktor kodierenden Gens *Gax* in Fibroblasten und VSM-Zellen zu einem durch p53-unabhängige *p21*-Hochregulierung hervorgerufenen Wachstumsstillstand [Smith et al., 1997]. Der zugrunde liegende Mechanismus ist noch unbekannt.

Dagegen hemmt c-Myc, ein Transkriptionsfaktor und Protoonkogen, die Expression von *p21* [Mitchell und El-Deiry, 1999; McNeil und Musgrove, 2006] und anderen proliferationshemmenden Genen [Übersicht bei Gartel und Shchors, 2003]. Es ist bekannt, dass die proximale Promotor-Region des *p21*-Gens für diese Inhibierung ausreicht und dass Bindung von c-Myc an DNA nicht erforderlich ist. An welchen Transkriptionsfaktor oder welche -faktoren c-Myc am *p21*-Promotor bindet, wird jedoch noch kontrovers diskutiert

[Gartel und Radhakrishnan, 2005]. Darüber hinaus aktiviert c-Myc die Transkription von Cyclin D1 und D2, Cdk4 und der Phosphatase Cdc25A, die negativ regulierende Phosphatreste von Cdks entfernt [Sears and Nevins, 2002]. Die Induktion von Cyclin D1 und D2 führt zu einer Abspaltung des CKIs p27 von Cyclin E, was letzteres aktiviert und zu Zellproliferation führt [Perez-Roger et al., 1999].

1.6 Der Zellzyklus bei Podozyten

Die auf den Kapillaren des Glomerulus aufsitzenden Podozyten spielen durch die Ausbildung ihrer Füßchenfortsätze und ihre Beteiligung am Aufbau der glomerulären Basal- und der Schlitzmembran eine zentrale, wenn nicht sogar die wichtigste Rolle bei der Ultrafiltration in der Niere. Ihr hochdifferenzierter Zustand scheint es ihnen, ähnlich wie Neuronen, in der Regel nicht zu erlauben zu proliferieren [Kriz, 1996]. Die für eine Zellteilung notwendige Umordnung von Aktin hätte einen erheblichen Verlust der typischen Morphologie der Zellen und damit der Filtrationseigenschaften der zugehörigen Strukturen zur Folge [Saleem, 2003]. Wahrscheinlich aus diesem Grund wird sie selbst bei Beschädigung des Glomerulus vermieden. Die Auswirkungen einer solchen Flucht aus der Zellzyklus-Blockade werden bei den wenigen glomerulären Nierenerkrankungen wie HIV-assoziiierter Nephropathie deutlich, bei denen Podozyten dennoch proliferieren. Sie sind durch einen schweren Verlauf mit raschem Verlust der Nierenfunktion gekennzeichnet [Barisoni et al., 1999]. Bei der Mehrzahl der glomerulären Erkrankungen bleiben die Podozyten jedoch differenziert und teilen sich nicht, auch wenn dadurch ultrastrukturelle Läsionen der Filtrationsbarriere entstehen, weil einmal entblößte Bereiche des Kapillarknäuels nicht wieder mit Podozyten bedeckt werden können. Als hauptverantwortliche molekulare Komponenten dieses Phänomens werden die Cdk-Inhibitoren p21, p27 und p57 genannt.

Die besondere Rolle dieser Inhibitoren wird schon während der Nierenentwicklung deutlich. Im „S-shaped body“-Stadium der Glomeruli teilen sich die späteren Podozyten und exprimieren die entsprechenden Proliferationsmarker. Beim Übergang zum „capillary loop“-Stadium verschwinden alle den Zellzyklus fördernden Komponenten, während gleichzeitig die Expression der CKIs p27 und p57 gesteigert wird, was zu einem Ausstieg aus dem Zellzyklus führt [Nagahama et al., 2001]. Zeitlich fällt diese Hochregulierung mit dem erstmaligen Auftreten verschiedener Differenzierungsmarker von Podozyten wie WT1 und

GLEPP1 zusammen [Saleem, 2003]. Im adulten humanen Glomerulus findet sich dann eine konstitutive Expression von p27 und p57, während die von p21 nur im adulten Glomerulus der Maus, nicht aber in dem des Menschen nachweisbar ist [Shankland et al., 2000]. Die Expression von p57 ist dabei im Glomerulus auf die Podozyten beschränkt [Hiromura et al., 2001]. Im Verlauf humaner Krankheiten, bei denen Podozyten nicht proliferieren, treten keine Veränderungen in der Expression von p21, p27 und p57 auf. Bei Krankheiten mit proliferierenden und gleichzeitig ihre Differenzierungsmarker verlierenden Podozyten sinken die p27- und p57-Mengen in den betreffenden Zellen begleitet von einer *de novo*-Synthese von p21 [Shankland et al., 2000]. Dabei ist die genaue Rolle, die p21 in den Podozyten spielt, noch nicht verstanden. p21 wird zwar während der Glomerulogenese in sich entwickelnden Podozyten synthetisiert, die Nieren von *p21*-Knockout-Tieren sind jedoch histologisch normal [Kim et al., 1999]. Demnach scheint p21 nicht unabkömmlich für den Austritt der Podozyten aus dem Zellzyklus und die daran gekoppelte terminale Differenzierung zu sein. Bei den Knockout-Tieren wurden allerdings nach Induktion einer Glomerulonephritis ein Wiedereintritt der Podozyten in den Zellzyklus und Dedifferenzierung beobachtet [Kim et al., 1999]. Dies könnte als Hinweis darauf verstanden werden, dass p21 in einem Krankheitszustand mit proliferierenden Podozyten eine schützende Funktion zur Begrenzung weiterer Proliferation ausübt, wenn die p27- und p57-Level sinken. Es könnte aber auch als eine Art „Gerüst“ für die Bildung von Komplexen aus Cyclinen, Cdks und PCNA dienen, die die Proliferation unterstützen [Shankland, 2006].

1.7 Der Interferon- β -Signalweg

Interferone (IFNs) gehören wie auch Interleukine, koloniestimulierende Faktoren, Tumornekrosefaktoren und Chemokine zu den Cytokinen. Dabei handelt es sich um kurze, meist glykosylierte Proteine, die regulierende Funktionen bei Wachstum und Differenzierung von Zellen aber auch bei der Immunabwehr ausüben. Cytokine werden bei entsprechender Stimulation einer Zelle synthetisiert und sezerniert und wirken in pico- bis nanomolaren Konzentrationen überwiegend auf unmittelbar benachbarte Zellen. Ein weiteres Kennzeichen dieser Stoffe ist ein hohes Maß an Redundanz bezüglich ihrer Wirkung.

1957 wurden die Interferone zum ersten Mal beschrieben, und zwar als Faktoren, die sehr schnell von virusinfizierten Zellen gebildet werden und die Fähigkeit zur „Interferenz“ mit

der Virusreplikation besitzen [Isaacs und Lindenmann, 1957; Isaacs et al., 1957]. Später wurde zusätzlich zu dieser antiviralen auch die antiproliferative [Paucker et al., 1962] bzw. die tumorhemmende Wirkung [Gresser et al., 1969] der Interferone beschrieben. Immunmodulatorische Aktivität ist die dritte kennzeichnende Funktion der Interferone [Biron, 2001]. So werden sie in der Klinik bereits seit längerem erfolgreich zur Behandlung viraler Erkrankung aber auch verschiedener Tumorerkrankungen wie Leukämien oder Karzinomen von Nierenzellen eingesetzt [Einhorn und Strander, 1993]. Dabei wird für die Antitumor-Aktivität hauptsächlich der wachstumsinhibierende Effekt der Interferone verantwortlich gemacht. *In vitro* führt die Behandlung mit IFN in den meisten Zelllinien zu einem Zellzyklusarrest in der G₁-Phase [Roos et al., 1984]. Es wurde aber u.a. auch gezeigt, dass IFN ein G₀-Stadium in verschiedenen neoplastischen Zellen auslösen kann [Tiefenbrun et al., 1996]. Interferone üben Effekte auf eine Reihe von Zellzyklus-regulierenden Proteinen aus. So inhibieren sie die Expression des Retinoblastom-Proteins Rb und seiner Verwandten p107 und p130 und ändern deren Phosphorylierungszustand von der inaktiven hyperphosphorylierten zur aktiven, wachstumsinhibierenden hypophosphorylierten Form [Kimchi, 1992; Sangfelt et al., 1999; Thomas et al., 1998]. Die Phosphorylierung dieser sog. Pocketproteine wird durch Cdk-Komplexe reguliert. Die Cdk-Aktivität wiederum wird auf verschiedenen Wegen gesteuert [Morgan, 1995], und über alle davon scheint Interferon die Aktivität von Cdk2, Cdk3, Cdk4 und Cdk6 zu inhibieren [Sangfelt et al., 1997; Sangfelt et al., 1999, Hobeika et al., 1997]. Ferner können Interferone die Transkription der Gene für die Cdk-Inhibitoren p21 [Sangfelt et al., 1997], p27 [Sangfelt et al., 1999], p15 und p19 [Sangfelt et al., 1997] erhöhen.

Die Zahl der beschriebenen Interferone steigt ständig. Neben den länger bekannten Interferonen vom Typ I (IFN α , - β , - ω , - ϵ , - κ , - δ , - τ und - ζ) und Typ II (IFN γ) wurde 2003 eine dritte Gruppe beschrieben (Typ III: IFN λ 1, - λ 2, und - λ 3) [Übersicht in Takaoka und Yanai, 2006]. Die Familie der humanen Typ I-Interferone umfasst 14 Gene für IFN α (aus denen 12 verschiedene Proteine hervorgehen), ein Gen für IFN β und zwei Gene für IFN ω . Die mit Abstand meisten Studien wurden an IFN α / β durchgeführt. Wie auch die anderen Interferone dieses Typs übertragen beide ihr Signal über einen Rezeptor-Komplex (IFN α / β -Rezeptor (IFNAR)) aus den beiden Untereinheiten IFNAR1 und IFNAR2, wobei es hier jedoch Unterschiede bei Qualität und Effizienz zu geben scheint. So wird z.B. die Assoziation der beiden Moleküle nur durch IFN β -Stimulation ausgelöst, während IFNAR2 sowohl durch IFN α als auch IFN β phosphoryliert wird [Abramovich et al., 1994].

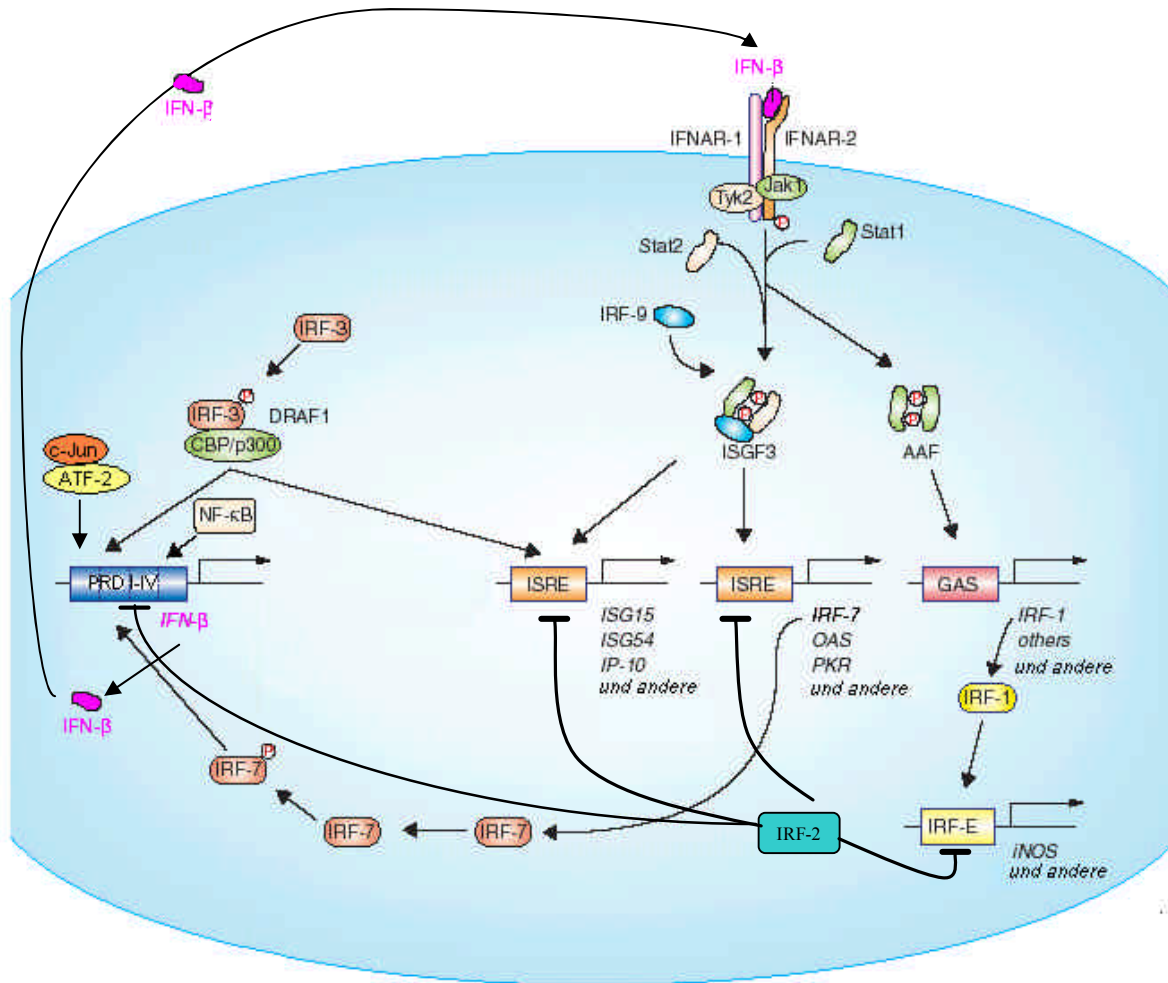
Durch die Interaktion von IFN β mit dem Rezeptor wird neben dem IRS/PI3K-Signalweg, der p38 MAPK-Kaskade, einem das Vav-Proteinkogenprodukt einbeziehenden Signalweg und einem Signalweg, der Adapterproteine der Crk-Familie verwendet [Übersichten in Pokrovskaja et al., 2005; Platanius und Fish, 1999; Parmar und Platanius, 2003], hauptsächlich der JAK-STAT-Signalweg stimuliert. IFNAR1 ist mit der Proteinkinase TYK2 („Tyrosinkinase 2“) präassoziiert, IFNAR2 mit JAK1 („Janus-Kinase 1“). Durch die Liganden/Rezeptor-Interaktion ausgelöst lagern sich die beiden Rezeptoruntereinheiten zusammen, die Kinasen phosphorylieren daraufhin ihre Zielproteine STAT1 und STAT2 („signal transducers and activators of transcription“), die anschließend ein Heterodimer bilden [Stark et al., 1998]. Dieses wandert in den Zellkern und bildet dort durch Bindung an IRF-9 („interferon regulatory factor 9“) den Komplex ISGF3 („interferon-stimulated gene factor 3“) [Fu et al., 1990]. Letzterer bindet dann an eine spezifische DNA-Sequenz, das ISRE („interferon-stimulated response element“) im Promotor einer Vielzahl von Zielgenen, sog. Interferon-stimulierten Gene (ISGs), und aktiviert deren Transkription [Kessler et al., 1990]. Neben dem weit verbreiteten ISGF3 können weitere Komplexe gebildet werden, deren Bestandteile Homo- oder Heterodimere von STAT1, STAT3, STAT5a oder STAT5b sind [Parmar und Platanius, 2003]. Diese Komplexe stimulieren durch die Bindung an GAS („IFN γ -activated site“)-Elemente die Transkription diverser Interferon-regulierter Gene wie *IRF-1* („interferon regulatory factor 1“).

Bei den IRFs handelt es sich um eine Familie von Transkriptionsfaktoren mit signifikanter Homologie in der DNA-Bindedomäne. Je nach Zelltyp und Stimulus regulieren sie die Expression unterschiedlicher Gene [Harada et al., 1998]. Im Kontext des Interferon- β -Systems kann IRF-1 wie IRF-9 bzw. der ISGF3-Komplex an ISREs binden und diese aktivieren [Kimura et al., 1996], und scheint damit die Wirkung des ISGF3-Komplexes zu unterstützen und zu verlängern. Zusätzlich wird die Bindung von IRF-1 an IRF-Es („IRF response elements“) für die IFN-induzierte Expression einer anderen z.B. *iNOS* („inducible nitric oxide synthetase“) enthaltenden Gruppe von Gene benötigt [Kamijo et al., 1994; Taniguchi und Takaoka, 2002] und kann die Expression von *IFN α* und *IFN β* verstärken [Harada et al., 1990]. Darüber hinaus wird IRF-1 eine gewisse Bedeutung bei der Regulation des Zellzyklus zugeschrieben [Taniguchi et al., 2001]. IRF-7 wird ebenfalls durch ein Interferon-induzierbares Gen mit ISRE kodiert. Wie auch das nicht durch Interferon induzierbare IRF-3 ist es Bestandteil des *IFN β* -Enhanceosoms, eines Transkriptionsfaktor-Komplexes, dessen Zusammenfinden an einem DNA-Enhancer kritisch für die Regulation des

Gens ist [Carey, 1998]. Während erhöhte IRF-7-Mengen in einer späteren Phase durch einen positiven Rückkopplungsmechanismus die Induktion von *IFN β* verstärken, scheint das konstitutiv exprimierte *IRF-3* hier primär für die frühe Induktion von *IFN β* zuständig zu sein [Sato et al., 2000]. IRF-3 assoziiert für eine erhöhte transkriptionelle Aktivierung mit den Koaktivatorproteinen CBP („CREB-binding protein“) und p300, mit denen es einen Komplex namens DRAF1 („double-stranded RNA-activated factor 1“) bildet [Taniguchi et al., 2001], der auch einige ISGs induzieren kann [Taniguchi und Takaoka, 2002]. Weitere Komponenten des *IFN β* -Enhanceosoms sind die Transkriptionsfaktoren NF- κ B, ATF-2 und c-Jun und das Stützprotein HMG I(Y) [Panne et al., 2004]. Durch die kooperative Bindung der Transkriptionsfaktoren an die vier PRDs („positive regulatory domains“) des *IFN β* -Promoters wird eine hohe Spezifität der Genaktivierung gewährleistet [Maniatis et al., 1998].

IRF-2 ist wie *IRF-1* und *IRF-7* durch IFN α/β stimulierbar, wenn auch mit einer langsameren Kinetik. *IRF-2* konkurriert mit ISGF3 bzw. *IRF-1* um ISREs und IRF-Es. Sein Karboxyterminus enthält eine Repressordomäne, die es im Gegensatz zu *IRF-1* und den anderen IRFs zu einem Repressor von Interferonen und Interferon-induzierten Genen macht [Tanaka et al., 1993; Yamamoto et al., 1994; Harada et al., 1998]. Die Expression von *IFN β* stört es durch Eindringen in das Enhanceosom [Senger et al., 2000; Taniguchi et al., 2001]. Es ist davon auszugehen, dass *IRF-2* eine Rolle bei der Begrenzung des Interferon-Systems spielt.

In einem positiven Rückkopplungsmechanismus wird neu synthetisiertes IFN β sezerniert und verstärkt durch Bindung an IFNARs derselben Zelle seine eigene Produktion. Gleichzeitig wird auch die IFN β -Produktion benachbarter Zellen stimuliert. In Abbildung 1 wird dieser Interferon- β -Signalweg schematisch dargestellt.



nach Taniguchi und Takaoka, 2002

Abbildung 1: Schema des Interferon-β-Signalwegs. Dargestellt sind der positive Rückkopplungsmechanismus der IFNβ-Synthese und die Regulation der Expression von Interferon-stimulierten Genen (ISGs). Der DRAF1-Komplex aus phosphoryliertem IRF-3 und CBP/p300 bildet zusammen mit phosphoryliertem IRF7, NF-κB, c-Jun/ATF-2 und dem Stützprotein HMG I(Y) (nicht dargestellt) das *IFNβ*-Enhanceosom. IFNβ löst durch Interaktion mit seinem aus den beiden Komponenten IFNAR1 und IFNAR2 bestehenden Rezeptor die Bildung verschiedener Komplexe aus STATs (und IRF-9) aus, die an Elemente im Promotor von ISGs, IRFs und anderen Genen binden und diese induzieren.

Ein wichtiger Vermittler der antiviralen [Katze, 1995] und antiproliferativen [Koromilas et al., 1992; Donzé et al., 1995] Wirkung von Interferonen ist die Serin/Threonin-Proteinkinase PKR. Behandlung von Zellen mit Interferonen vom Typ I erhöht die Transkription von *PKR* [Meurs et al. 1990], weshalb auch häufig von der „interferon-inducible, dsRNA-dependent protein kinase“ gesprochen wird. Sie aktiviert, unabhängig von bei Virusinfektion auftretender doppelsträngiger RNA, die IκB-Kinase (IKK), was zur Degradierung der NF-κB-Inhibitoren IκBα und IκBβ führt [Zamanian-Daryoush et al., 2000]. Daraufhin wird das zytosolmatische NF-κB von IκBα und IκBβ freigesetzt, kann in den Kern wandern und

dort als Transkriptionsfaktor wirken [Boone et al., 2002]. Unter den Zielgenen von NF- κ B befinden sich u.a. auch an der Regulation des Zellzyklus beteiligte Gene.

1.8 Der Transkriptionsfaktor NF- κ B

Der auch im Zusammenhang mit dem *IFN β* -Enhanceosom bereits erwähnte Transkriptionsfaktor NF- κ B wird ubiquitär produziert. Er reguliert die Expression einer großen Zahl von Genen, die z.B. an Immunreaktionen, Zellproliferation und Apoptose beteiligt sind [Li und Verma, 2002; Delhalle et al., 2004]. Damit spielt NF- κ B bei Krankheiten wie Krebs und Entzündungen eine wichtige Rolle, darunter auch bei einer Reihe von Nierenkrankheiten, wie an verschiedenen Nephritis-Modellen gezeigt wurde [Guijarro und Egido, 2001].

In Säugern liegt NF- κ B immer als Homo- oder Heterodimer aus den Mitgliedern der NF- κ B/Rel-Familie vor. Die fünf Gene *NFKB1*, *NFKB2*, *RELA*, *c-REL* und *RELB* kodieren für die sieben Proteine p105, p100, p50, p52, RelA (p65), c-Rel und RelB. Bei p50 handelt es sich um die aminoternale Hälfte von p105, welches von *NFKB1* kodiert wird, bei p52 um die aminoternale Hälfte von p100, welches von *NFKB2* kodiert wird [Übersicht bei Chen und Greene, 2004]. Die verschiedenen Homo- oder Heterodimere besitzen eine gewisse Spezifität für ihre Zielgene. Das in den meisten Zelltypen am stärksten vertretene Dimer und sozusagen der Prototyp ist jedoch das Heterodimer aus p50 und RelA (p65). Zu seinen Zielgenen gehören z.B. die Gene für IFN β [Hiscott et al., 1989; Lenardo et al., 1989], diverse Interleukine wie IL-6 [Libermann und Baltimore, 1990; Shimizu et al., 1990], IL-1 β [Hiscott et al., 1993] oder IL-8 [Kunsch und Rosen, 1993] und Chemokine, aber auch Zelladhäsionsmoleküle, Immunrezeptoren, andere Transkriptionsfaktoren, Enzyme und viele andere [Übersicht in Pahl, 1999]. Induziert wird die Aktivität des Heterodimers wiederum durch eine ebenso große Vielfalt von Stimuli wie Bakterien und Viren, Mitogene, Wachstumsfaktoren und Hormone, verschieden Arten von Stress (z.B. oxidativer Stress) und Chemikalien [Übersicht ebenfalls bei Pahl, 1999].

In seiner inaktiven Form befindet sich das NF- κ B-Protein im Zytoplasma einer Zelle. Dort ist es mit der aminoternalen Domäne, die auch für die Bindung an DNA verantwortlich ist

(RHD = „Rel homology domain“), an eines der Mitglieder der I κ B- („inhibitor of κ B“-) Familie von Inhibitoren gebunden. Zu dieser zählen I κ B α , I κ B β , I κ B γ , I κ B ϵ und BCL3 [Übersicht bei Chen und Greene, 2004]. Beim „klassischen“ Weg der NF- κ B-Aktivierung, der das p50/RelA-Dimer verwendet, wird in folge eines entsprechenden Stimulus das I κ B-Molekül durch den I κ B-Kinase (IKK)-Komplex aus IKK α , IKK β und IKK γ phosphoryliert. Phosphoryliertes I κ B kann nun von der Ubiquitin-Ligase-Maschinerie erkannt werden, wird polyubiquitiniert und anschließend degradiert. Das jetzt ungebundene NF- κ B wandert in den Zellkern und interagiert dort mit DNA-Sequenzen im Promotor oder Enhancer seiner Zielgene. NF- κ B kann durch verschiedene Mechanismen wieder inaktiviert werden. Eine gut charakterisierte Möglichkeit ist der Rückkopplungsmechanismus, bei dem neu synthetisiertes I κ B an das nukleäre NF- κ B bindet und es in das Zytosol exportiert [Übersicht bei Hayden und Gosh, 2004]. Diese Bindung wird durch Deacetylierung der RelA-Untereinheit gefördert. Die durch HDAC3 vermittelte deaktivierende Deacetylierung und die aktivierende Acetylierung durch p300/CBP stellen eine weitere Ebene der NF- κ B-Regulation dar [Übersicht in Chen und Greene, 2003]. Als ein Beispiel für andere nukleäre Proteine, welche die transkriptionelle Aktivität von NF- κ B hemmen können, sei hier noch iASPP/RAI erwähnt. Es bindet ebenfalls an RelA (RAI = „RelA-assoziiertes Inhibitor“) [Yang et al., 1999; Trigiani und Lu, 2006]. Ein alternativer Signalweg, der wahrscheinlich in sekundären lymphatischen Organen eine Rolle spielt, verwendet ein p52/RelB-Heterodimer, das von p100 im Zytoplasma inaktiviert wird [Bonizzi und Karin, 2004].

Die Stimulierbarkeit durch verschiedenste Faktoren setzt auch die Existenz verschiedener in die Signalwege einspeisender Rezeptoren voraus. Pathogene Mikroorganismen z.B. werden von zu den sog. „pattern-recognition receptors“ (PRRs) gezählten Toll-like Rezeptoren (TLRs) erkannt. In Säugern wurden bisher zehn TLRs beschrieben (TLR1 bis TLR10). Jeder TLR erkennt spezifische Komponenten von Pathogenen [Schnare et al., 2006]. So bindet beispielsweise TLR4 bakterielles LPS, TLR3 virale dsRNA [Übersicht bei Takeda und Akira, 2004]. Andere externe Stimuli aktivieren NF- κ B z.B. über T- und B-Zell-Rezeptoren, TNF-Rezeptoren und CD40 [Übersicht bei Hayden und Gosh, 2004]. Zumindest von TLR4 wird jedoch auch angenommen, dass es auch endogene Moleküle erkennt, die bei von Infektionen unabhängigen Beschädigungen der Zelle zugänglich werden [Anders et al., 2004]. Aktivierung von TLR3, TLR4, TLR7, TLR8 oder TLR9 kann die Produktion von Typ I-Interferonen stimulieren [Hertzog et al., 2003; Mogensen und Paludan, 2005].

TLR4 induziert *in vitro* ausschließlich die Expression von *IFN β* , nicht die von *IFN α* . Diese Induktion wird durch ein Homodimer von IRF-3 vermittelt, das über den TRAM-TRIF-Signalweg aktiviert wird. Auch IRF-7 kann durch TLR4 aktiviert werden, wenn es vor der Stimulation des Rezeptors bereits exprimiert wird [Sakaguchi et al., 2003]. Stimulierter TLR3 induziert sowohl *IFN β* als auch *IFN α* und benötigt dafür ebenfalls IRF-3 und IRF-7 [Honda et al., 2005; Moynagh, 2005]. Des Weiteren aktivieren alle Toll-like Rezeptoren, also auch TLR3 und TLR4, stromabwärts aller oben genannter Adaptorproteine NF- κ B [Dunne und O'Neill, 2003]. Dies geschieht über die Aktivierung von I κ B-Kinasen, die I κ B phosphorylieren, welches daraufhin NF- κ B zur Translokation in den Zellkern freigibt. Ein Unterschied zwischen TLR3 und TLR4 findet sich bei ihrer Lokalisation. Während sich TLR4 auf der Zelloberfläche befindet, wird TLR3 hauptsächlich in der Membran von Endosomen vorgefunden [Mogensen und Paludan, 2005]. Ferner scheint in einem positiven Rückkopplungsmechanismus *TLR3*-, nicht aber *TLR4*-Expression durch Typ I-Interferon über die Aktivierung von ISGF3 stimuliert zu werden [Miettinen et al., 2001].

1.9 Tumore und Tumorsuppressorgene des Urothels

Neben der Niere gehören die ableitenden Harnwege - Nierenbecken, Harnleiter, Harnblase und Harnröhre - zu den Harnorganen. Diese werden von einem besonderen Typus Epithel, dem Übergangsepithel oder Urothel, ausgekleidet. Es ist mehrschichtig und besitzt eine hohe Dehnungsfähigkeit, die es ihm ermöglicht, sich den schwankenden Volumina der entsprechenden Organe anzupassen. Eine weitere Funktion liegt darin, eine Barriere zwischen dem sauren und hypertonen Harn und dem darunter liegenden Gewebe zu bilden. Für das Urothel typisch ist eine abschließende apikale Schicht aus sehr großen, z.T. zweikernigen Deckzellen. Bei Dehnung des Epithels nimmt die Zahl der Zellschichten ab und zusätzliche Oberfläche wird durch schnellen Einbau von Vesikeln in die apikale Oberfläche der Deckzellen geschaffen. Die Schicht unter der apikalen Oberfläche, die die Reservemembranen enthält, wird als „Crusta“ bezeichnet [Übersicht bei Sobotta und Welsch, 2003 und Junqueira et al., 2002].

Harnblasenkrebs ist als sechst häufigste Tumorart eine verbreitete Krankheit in Industrieländern [Sanchez-Carbayo et al., 2002]. Die häufigste Form des Harnblasenkrebses

ist ein Karzinom des Übergangsepithels [Amira et al., 2004]. Bei den meisten betroffenen Patienten werden Verluste des kompletten Chromosoms 9 oder seines langen Arms bzw. Deletionen in den Loci 9q12-q22, 9q33 oder 9q34 beobachtet [Miyao et al., 1993; Amira et al., 2004]. Die Suche nach potentiellen, hier lokalisierten Tumorsuppressorgenen lieferte z.B. *TSC1* (tuberöse Sklerose Komplex 1). Dessen Verlust scheint zu einer verminderten Expression des Cdk-Inhibitors p27 zu führen [Adachi et al., 2003]. *TSC1* befindet sich auf 9q34, also der Region, auf der auch *LMX1B* lokalisiert wurde.

Krebszellen sind durch zwei vererbare Eigenschaften gekennzeichnet. 1. Sie und ihre Nachkommen vermehren sich entgegen den üblichen Beschränkungen der Zellteilung. Bei vielen Tumoren sind Veränderungen wesentlich, welche die Zellreifung zu einem sich nicht teilenden, endgültig differenzierten Zustand hemmen oder den programmierten Zelltod, die Apoptose, verhindern. 2. Sie dringen in Gebiete ein, die normalerweise anderen Zellen vorbehalten sind, und besiedeln diese. Krebsgeschwüre aus Epithelzellen wie denen des Übergangsepithels bezeichnet man als Karzinome. Ungefähr 90% aller menschlichen Krebserkrankungen sind Karzinome. Dies könnte damit zu begründen sein, dass die meisten Zellteilungsvorgänge eines Körpers in Epithelien stattfinden, oder dass Epithelien am häufigsten physikalischen und chemischen Schädigungen ausgesetzt sind.

Eher selten wirken Änderungen im Muster der Genexpression bei der Tumorentwicklung mit, die meisten Krebserkrankungen werden durch genetische Veränderungen hervorgerufen. Im Allgemeinen liegen in einer einzelnen malignen Zelle Mehrfachmutationen vor. Eine einzige Mutation reicht in der Regel nicht aus, um Krebs zu verursachen, da Zellen redundante Regulationsmechanismen für die strenge Kontrolle ihres Verhaltens besitzen. Zusätzlich treffen Tumorzellen in jedem Stadium der Entwicklung auf neue physiologische oder pathologische Barrieren, die eine weitere Ausbreitung verhindern und durch den Erwerb weiterer Mutationen überwunden werden müssen. Die große Mehrheit menschlicher Tumoren zeigt daher auch eine stark erhöhte Mutationsrate, die Zellen sind genetisch instabil [Übersicht der Krebsentstehung in Alberts et al., 1995]. Krebskritische Gene werden nach der Aktivität ihres Genprodukts in zwei Klassen eingeteilt. Bei den sog. Protoonkogenen ist die Aktivität des Genprodukts zu hoch, d.h. eine Funktionsgewinn-Mutation treibt die Zelle zum Krebs. Die mutierten, überaktiven Genformen nennt man Onkogene. Bei den Tumorsuppressorgenen dagegen lässt eine Funktionsverlust-Mutation die Aktivität des

Genprodukts zu gering werden. Beide Mutationen erhöhen Zellproliferation und Überleben und haben daher ähnliche Wirkung.

Das Tumorsuppressorgen, das als erstes identifiziert wurde, ist das *RB*-Gen, das bei Patienten mit Retinoblastom mutiert ist und bei diversen Karzinomen der Lunge, Brust und Blase fehlt [Friend et al., 1986]. Es kodiert für das Rb-Protein, einen weit verbreiteten Zellzyklusregulator. Sein Verlust kann dazu führen, dass Zellen zum falschen Zeitpunkt in den Zellteilungszyklus eintreten [DeGregori, 2004]. Bei mehr als 50% aller Tumorerkrankungen ist das Gen für p53 betroffen. Dieser Transkriptionsfaktor wirkt entweder der Zellproliferation entgegen oder induziert Apoptose [Sherr, 2004]. Von den zahlreichen weiteren mittlerweile bekannten Tumorsuppressorgenen sind z.B. *WT1*, *APC*, *DCC*, *NF1*, dessen Genprodukt das RAS-Protein inaktivieren kann, *NF2* und *MEN2A* am besten charakterisiert [Levin, 1993]. Tumorsuppressorgene spielen neben der Kontrolle an kritischen Punkten des Zellzyklus auch bei einem breiten Spektrum anderer zellulärer Aktivitäten wie Detektion und Reparatur von DNA-Schäden, Protein-Ubiquitinierung und -Degradierung oder Zellspezifikation, -differenzierung und -migration eine Rolle [Sherr, 2004].

1.10 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den bei Patienten mit Nagel-Patella-Syndrom mutierten LIM-Homöodomäne-Transkriptionsfaktor LMX1B näher zu charakterisieren. Dabei lag der Fokus auf der transkriptionsregulatorischen Funktion dieses Proteins.

In Vorarbeiten [Prestel, 2003] war ein wachstumsinhibierender Effekt von LMX1B in HeLa-Zellen gezeigt worden. Weiterführend hatten sich Hinweise darauf ergeben, dass die proteinbindenden LIM-Domänen des Transkriptionsfaktors eine wichtige Rolle bei diesem Effekt spielen könnten. Dies sollte nun weiter verfolgt und präzisiert werden. Dazu wurden HeLa-Zelllinien eingesetzt, die verschiedene Mutanten des LMX1B-Proteins regulierbar produzieren. Bei dem hier verwendeten Tet-off-System kann die Expression eines Gens durch Inkubation der Zellen mit Tetrazyklin bzw. dessen Analogon Doxyzyklin inhibiert und durch Auswaschen des Antibiotikums induziert werden. Die Methode des Laktatdehydrogenase-

Aktivitätstests wurde zur Aufzeichnung von Wachstumskurven verwendet, mit denen LMX1B-Mutanten und Wildtyp verglichen werden konnten.

Des Weiteren hatten die Vorarbeiten nahe gelegt, dass Apoptose keine Rolle bei dem wachstumsinhibierenden Effekt von LMX1B spielt [bestätigt durch Kastner, 2004], sondern eine Verschiebung des Zellzyklus hin zur G₀/G₁-Phase hierfür ursächlich ist. Mit einer ergänzenden Methode, der Inkorporation des Thymidin-Analogs Bromodesoxyuridin (BrdU), sollte dieser Befund überprüft werden. Auch dazu wurden die induzierbaren HeLa-Zelllinien verwendet.

Ebenfalls mit Zellen eines induzierbaren LMX1B-Wildtyp-Klons war ein cDNA-Array durchgeführt worden, der bislang lediglich mit Blick auf für den Zellzyklus relevante Gene ausgewertet wurde [Prestel, 2003]. Als Kern der vorliegenden Arbeit sollten nun die Ergebnisse der Analyse weiter auf durch die Produktion von LMX1B beeinflusste Gene bzw. potentielle Zielgene des Transkriptionsfaktors untersucht werden. Anschließend war geplant, die Expression dieser Gene in den Zellen mit induzierbarer LMX1B-Produktion mit Hilfe des RNase-Protection-Assays bzw. der RT-qPCR näher zu beleuchten.

Die ersten Experimente dieses Projekts lieferten den bis dahin unbekanntem und überaus interessanten Befund, dass die Expression von Interferon-induzierten Genen und NF- κ B-Zielgenen in LMX1B-synthetisierenden Zellen erhöht ist. Der weitere Verlauf dieser Arbeit galt der Aufklärung der beteiligten Signalwege mit besonderem Augenmerk darauf, ob LMX1B seine Wirkung direkt durch Interaktion mit den entsprechenden Strukturen der betreffenden Gene oder indirekt über eine Kette von Ereignissen ausübt.

Um die unter Verwendung des HeLa-Zellsystems gewonnenen Ergebnisse anschließend *in vivo* überprüfen zu können, boten sich zwei unterschiedliche Systeme an. Zum einen standen *Lmx1b*-Knockout-Mäuse zur Verfügung. Die Nieren oder andere Organe adulter und neugeborener Tiere wurden isoliert, um einen cDNA-Array durchzuführen und die Expression einzelner Gene mittels RTq-PCR zu untersuchen. Zum anderen wurden vom Lehrstuhl für Urologie der medizinischen Fakultät an der Universität Regensburg verschiedene Zelllinien gesunder und tumorös veränderter Urothelzellen bereitgestellt. Es sollte vor allem der Frage nachgegangen werden, ob *LMX1B* in diesen Zellen ein Tumorsuppressorgen sein könnte. Entsprechende Hinweise hatten sich u.a. durch den

Genlokus ergeben. Aber auch die mit den HeLa-Zellen erworbenen Erkenntnisse über die LMX1B-Funktion konnten an diesen verschiedenen Zelllinien überprüft werden. Hierfür wurde ebenfalls die Methode der RT-qPCR angewendet.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien, Medien und Reagenzien

38% Acrylamid/2% Bisacrylamid, Roth

Agarose, Qbiogene

α -³²P-dCTP, MP Biomedicals

α -³²P-UTP, Amersham Biosciences

Ammoniumpersulfat, Bio-Rad

Aprotinin, Serva

*Bam*H I, New England BioLabs

Bisbenzimid (Hoechst 33258), Sigma

Borsäure, Merck

Brij 97, Sigma

5-Bromo-2-Desoxyuridin, Roche Applied Science

Bromphenolblau, Sigma

Chloroform/Isoamylalkohol, Roth

Coomassie Brilliant Blau G 250, Serva

d(GAT)TP, Amersham Biosciences

di-Kaliumhydrogenphosphat Trihydrat, Merck

Dimethylsulfoxid, Sigma

di-Natriumhydrogenphosphat-1-hydrat, Merck

dNTPs, MBI Fermentas

Doxyzyklinhydrochlorid, Sigma

Dulbecco's Modified Eagle Medium, PAA

EDTA, Roth

Eisessig, Merck

Entwickler Eukobrom, Tetenal

Ethanol, J.T. Baker
Ficoll 400, Serva
Fixierer Acidofix, Agfa
Formamid, Merck
Fötale Kälberserum, Gibco/PAA
Geneticin, PAA
Glyzerin, Roth
Glyzin, Merck
Harnstoff, Roth
HotStarTaq DNA-Polymerase, Qiagen
Hygromycin B, Calbiochem
Interferon- β (human, rekombinant), ImmunoTools
Isopropanol, Merck
Kaliumdihydrogenphosphat, Merck
Klenow-Polymerase, New England Biolabs
Leupeptin, Serva
Lithiumlaktat, Sigma
Magermilchpulver, Sucofin
Magnesiumchlorid für die PCR, Qiagen
 β -Mercaptoethanol, Bio-Rad
Methanol, Acros
 β -NAD, Sigma
Natriumazetat, Merck
Natriumcarbonat, Riedl-de Haen
Natriumbicarbonat, Sigma
Natriumchlorid, Merck
Natriumdeoxycholat, Sigma
Natriumdihydrogenphosphat-2-hydrat, Merck
Natriumdodecylsulfat, Sigma
Natriumphosphat, Merck
Natriumzitat-dihydrat, J.T. Baker
Natronlauge 1 M, Merck
Nonidet P40, Fluka
ortho-Phosphorsäure 85%, Merck

Paraformaldehyd, Merck
10x PCR-Puffer, Qiagen
Phenol, Roth
Phosphorsäure, Merck
PIPES, Sigma
PMSF, Sigma
Poly-L-Ornithin, Sigma
prestained protein marker broad range, New England BioLabs
Prostaglandin A₁, Cayman Chemical
Proteinase K, Roth
Puromycindihydrochlorid, Calbiochem
Rinder-Serumalbumin, Sigma
RNase A, Roth
RNase Free, Mercury
RNasin, Promega
Rotiphorese Gel 30 (30% Acrylamid/0,8% Bisacrylamid), Roth
RPMI 1640-Medium, PAA
Salzsäure 1 M, Merck
Schwefelsäure, Merck
Spermidin, Sigma
SYBR Green I Nucleic Acid Gel Stain, Roche Applied Science
T3-RNA-Polymerase, Roche Applied Science
T7-RNA-Polymerase, Roche Applied Science
TEMED, Serva
Thimerosal, Sigma
Tris, USB
Tris Base, Roth
Triton X-100, Merck
Trypsin/EDTA, PAA
Tween 20, Serva
Western Lightning Chemiluminescence Reagent, PerkinElmer
Xylencyan, Serva

2.1.2 Kits

iScript cDNA Synthesis Kit, Bio-Rad

NucleoSpin RNA II, Macherey-Nagel

Wizard *Plus* Midipreps DNA Purification System, Promega

2.1.3 Verbrauchsmaterial

0,1 ml-Röhrchen in 4er-Streifen mit Kappen, Corbett research

0,2 ml-Reaktionsgefäße, Biostep

1,5 ml-Reaktionsgefäße, Sarstedt

15 ml-Röhrchen, Greiner bio-one

50 ml-Röhrchen, Greiner bio-one/Sarstedt

Deckgläser, Langenbrinck

Deckgläser für Neubauer-Zählkammer, Fisher Scientific

Einfrierröhrchen, VWR International

Gewebekulturflaschen, Greiner bio-one

Gewebekulturplatten, Greiner bio-one

Gewebekulturschalen, Greiner bio-one

Glasplättchen, VWR

Haushaltstücher, Fripa

Halb-Mikro-Küvetten, Sarstedt

Mikro-Säulchen MicroSpin S-200 HR, Amersham Biosciences

Mikro-Säulchen ProbeQuant G-50, Amersham Biosciences

NY-Plus-Membran, Macherey-Nagel

Objektträger, Langenbrinck

Parafilm, American National Can

Pasteurpipetten aus Glas, Brand

Pipettenspitzen, Sarstedt

Pipettenspitzen mit Filter, Sarstedt

Porablot PVDF-Membran, Macherey-Nagel

Röntgenfilm Super RX, Fuji

Serologische Pipetten, Sarstedt
Spritzen, Braun
Sterilfilter, Millipore
Szintillationsröhrchen, VWR
Whatman-3MM Chromatographie-Papier, Roth
Zellschaber, Sarstedt

2.1.4 Geräte und Instrumente

Brutschrank, Heraeus
Digitalkamera „DMC2“, Polaroid
Drehschüttler, CMV
Echtzeit-Thermocycler „Rotorgene™ 3000“, Corbett research
Fluoreszenzmikroskop „Axioskop“, Leica
Gelektrophoreseapparatur „Horizon 58“, Whatman Biometra
Heizblock, VLM
Inkubator, Binder/Heraeus/Nuaire
Mikrotiterplatten-Photometer „Sunrise remote control“, TECAN
Neubauer-Zählkammer, Brand
Phospho-Imager „FLA-5000“, Fuji
Schüttler „Unimax 2010“, Heidolph
SDS-PAGE-Apparatur SE 600, Amersham Biosciences
Spektrophotometer „U2000“, Hitachi
Sterilbank, Heraeus
Thermocycler „Mastercycler gradient“, Eppendorf
Thermocycler „MyCycler“, Bio-Rad
Tischzentrifuge „Biofuge pico“, Kendro Heraeus
UV-Crosslinker, UVP
UV-System, Intas
Vakuumentrifuge „Univapo 150H“ und Vakkumpumpe „Unijet II“, Uniequip
Vortex, Scientific Industries
Western-Blotting-Apparatur TE62, Amersham Biosciences
Zentrifuge „Multifuge 3 L-R“, Kendro Heraeus

2.1.5 Antikörper

Tabelle 1: Primärantikörper

Antikörper	gerichtet gegen	Spezies	mono-/polyklonal	Verdünnung	Quelle/Referenz
9E10	c-Myc	Maus	monoklonal	Western Blot 1:3	Hybridom selbst kultiviert; Evan et al., 1985
anti-BrdU (#305)	Bromo-desoxyuridin	Maus	monoklonal	Immunzytochemie 1:1.000	NeoMarkers
anti-hIFN β (#404)	Interferon- β	Ziege	polyklonal	Neutralisierung 0,2 bis 0,6 μ g/ml	R&D Systems
anti-LMX1B (#193-67)	LMX1B	Maus	monoklonal	Western Blot 1:10	Daniel Heudobler; Suleiman et al., 2007
BMO8	LMX1B	Kaninchen	polyklonal	Western Blot 1:1.000	Prestel, 2003; Suleiman et al., 2007

Tabelle 2: Sekundärantikörper

Antikörper	gerichtet gegen	Spezies	mono-/polyklonal	Verdünnung	Quelle
Cy3/anti-Maus-IgG (#266)	Maus-IgG	Ziege	polyklonal	Immunzytochemie 1:300	Dianova
HRP/anti-Maus-IgG (#15)	Maus-IgG	Ziege	polyklonal	Western Blot 1:10.000	Sigma

2.1.6 Oligonukleotide für die Echtzeit-PCR

Tabelle 3: In der Echtzeit-PCR verwendete Oligonukleotide (Primer) für humane mRNAs. ORF, open reading frame. T_M, Schmelztemperatur berechnet mit PrimerExpress Software (Applied Biosystems)

Primer	Sequenz (5'® 3')	Länge [bp]	Position im ORF	T _M [°C]	Länge Amplikon [bp]
h/m/rc-Myc F1	AACAGGA ACTATGACCTCG	19	583	48,6	143
h/m/rc-Myc R1	AGCAGCTCGAATTTCTTC	18	725	49,1	
hG1P3 F1	GCAGAAGGCGGTATCGCTT	19	6	59,0	71
hG1P3 R1	TCTTACCTGCCTCCACCCC	19	76	58,5	
hFIT1 up	CCCTGATCCAGCGCTGGG	19	93	64,7	171
hFIT1 low	CCTTCATCCTGAAGCTTCAGGG	22	263	61,0	
hIFN α F1	GATTCCCCAGGAGGAGTTTG	21	239	58,5	51
hIFN α R1	GGATGGTTTCAGCCTTTTGG	20	289	58,1	
hIFN β F1	TCAGAAGCTCCTGTGGCAATT	21	189	58,5	61
hIFN β R1	GTTTCATCCTGTCTTGAGGCA	21	249	58,7	
hIFN γ F2	TTGAATGTCCAACGCAAAGC	20	504	58,4	61
hIFN γ R2	CTGGCGACAGTTCAGCCAT	19	564	58,4	
hIFNAR1 F1	ACACCATTTTCGCAAAGCTCAG	21	440	59,0	124
hIFNAR1 R1	TTAAACCATCCAAAGCCCACA	21	563	58,9	
hIFNAR2 F1	AAGCACACACGAGGCCTATGT	21	626	58,3	55
hIFNAR2 R1	CGTTGTGTTCCCGCTGAAT	19	680	58,2	
hI κ B- α F1	CTGTGATCCTGAGCTCCGAGA	21	496	59,1	107
hI κ B- α R1	GGGTGGTGCAGGACTGAGTC	20	602	59,1	
hIL-1 β F1	CCTGAGCTCGCCAGTGAAA	19	100	58,7	113
hIL-1 β R1	CAGAGGTCCAGGTCCTGGAA	20	212	58,7	
hIL-6 F1	CTGCGCAGCTTTAAGGAGTTC	21	669	58,0	71
hIL-6 R1	CTGAGGTGCCCATGCTACATT	21	739	58,7	
hIL-8 F1	CTGCAGCTCTGTGTGAAGGTG	21	148	58,3	148
hIL-8 R1	TCTGTGTTGGCGCAGTGTG	19	295	59,0	
hIRF1 F1	ATCCCAGTGGAAGTTGTGCC	20	786	58,4	61
hIRF1 R1	TGGGTGACACCTGGAAGTTGT	21	846	58,9	
hIRF2 F1	GACTCGAGGCTCCTACCTGCT	21	978	58,7	83
hIRF2 R1	CCTCTTTGATGGTGACCTGGA	21	1060	58,6	
hIRF3 F1	AACCGCAAAGAAGGGTTGC	19	299	58,8	55
hIRF3 R1	GGTCGTGAGGGTCCTTGCT	19	353	58,7	

hIRF7 F2	TGACCATCATGTACAAGGGCC	21	1181	59,3	71
hIRF7 R2	GTATAGGAACGTGCAGCTCGG	21	1251	58,5	
hIRF9 F2	CACCCGAAAACCTCCGGAAC	19	58	59,0	54
hIRF9 R2	GGAAACTGCCACTCTCCAC	20	111	58,2	
hISG15 F1	GCTGGTGGTGGACAAATGC	19	216	58,5	60
hISG15 R1	CGGCCCTTGTTATTCCTCAC	20	275	58,1	
hLamA/C F	TGCGTACGGCTCTCATCAACT	21	1577	59,5	87
hLamA/C R	CTCGTCGTCCTCAACCACAGT	21	1663	58,8	
hLDB1 F2	GGCTGGAGAACACCCAGTTT	20	971	57,7	54
hLDB1 R2	AGCTGTCCTCGTCGTCATG	20	1024	57,5	
h/mLMX1B F1	AGGAGTGTTTGCAGTGCGC	19	164	58,6	78
h/mLMX1B R1	TGCAGTACAGTTTCCGATCCC	21	241	58,6	
hLMX1B F5	CGAAGAGCCTTCAAGGCCT	19	622	58,2	71
hLMX1B R5	GCTGCCAGTGTCTCTCGGA	19	692	58,7	
hLMX1B F7	GTGTGAACGGCAGCTACGC	19	366	59,1	141
hLMX1B R7	TCATCCTCGCTCTTACGG	19	506	58,5	
hLMX1B F8	TCGTGGCCATGGAACAGAG	19	887	59,2	126
hLMX1B R8	GGCTGGTTAAGGAGGTATCGC	21	1012	58,7	
hMCP-1 F1	GCCAAGGAGATCTGTGCTGAC	21	284	58,5	83
hMCP-1 R1	TTCGGAGTTTGGGTTTGCTT	20	366	58,3	
hNF-κB p50 F1	GGCTACACCGAAGCAATTGAA	21	3108	58,8	71
hNF-κB p50 R1	GAGTGGGCCTGAGAGGTGG	19	3178	59,2	
hNF-κB p65 F1	GATCTGCCGAGTGAACCGA	19	657	58,3	52
hNF-κB p65 R1	GATCTCATCCCCACCGAGG	19	708	58,8	
hp21 F1	CGACTGTGATGCGCTAATGG	20	174	58,9	71
hp21 R1	CGGTGACAAAGTCGAAGTTCC	21	244	58,3	
hPKR F1	TGGCACCCAGATTTGACCTT	20	1355	59,0	193
hPKR R1	CGCTCCGCCTTCTCGTTAT	19	1163	59,0	
hRLIM F2	GAAGTCAGATGGACCGATTGG	21	59	58,0	172
hRLIM R2	GGTGGTGGGCCTTCTTTAATT	21	230	58,0	
h/mS9 F	GCAAGATGAAGCTGGATTAC	20	321	51,3	166
h/mS9 R	GGGATGTTACACACCTG	17	486	50,8	
hSTAT1 F1	CCGCACCTTCAGTCTTTTCC	20	1260	58,4	66
hSTAT1 R1	ATGCAGGGCTGTCTTTCCAC	20	1325	58,7	
hSTAT2 F1	CCCTGCTCTCAGTTGGCAG	19	1569	58,1	90
hSTAT2 R1	TGCCCGAACAGCTTGTTTC	19	1658	58,4	

hSTAT5a F	CATGGCATCCAAGAGTGCG	19	3236	59,8	53
hSTAT5a R	GGCTCGGTCTCTACCATGACA	21	3289	58,8	
hTLR3 F1	AACCCTGGTGGTCCCATTAT	21	1749	58,1	77
hTLR3 R1	TCAAAGCCGTTGGACTCCA	19	1825	58,8	
hTLR4 F1	GGTGGAGCTGTACCGCCTT	19	2466	58,8	155
hTLR4 R1	GCCAATTGCATCCTGTACCC	20	2620	58,9	
hTLR7 F1	TGAATTCCAACCTTTAGCAGAGC	23	1747	58,6	59
hTLR7 R1	AATCAAGCCGTTGTTGGAG	20	1805	58,6	
hTLR8 F1	AACCCCTTTGAATGCACCTGT	21	2382	59,3	125
hTLR8 R1	CTCTTCCCTCTTTGATCCCCA	21	2506	59,1	
hTLR9 F1	ACACAGCTGCGCAAGCTTAA	20	1021	58,5	146
hTLR9 R1	GTCTCATCGAGTGAGCGGAAG	21	876	58,6	

Tabelle 4: In der Echtzeit-PCR verwendete Oligonukleotide (Primer) für murine mRNAs. ORF, open reading frame. T_M, Schmelztemperatur berechnet mit PrimerExpress Software (Applied Biosystems)

Primer	Sequenz (5'® 3')	Länge [bp]	Position im ORF	T _M [°C]	Länge Amplikon [bp]
mCOL4A3 F1	AACACCAGCTCTGATGCCAAT	21	4938	58,3	88
mCOL4A3 R1	ACCTTACAGACGGTGCATCT	21	5025	58,3	
mCOL4A4 F1	GGCAGGCACTGATGTCACC	19	5108	58,6	68
mCOL4A4 R1	CTGGCATTCAACGAACGGT	19	5175	58,2	
mIRF7 F1	ACCAACTTCCGCTGTGCAC	19	697	58,3	51
mIRF7 R1	TTGGCGCAAGATAAAACGC	19	747	58,5	
mIRF9 F1	CCAGCAGGAACCTCCCTA	19	501	58,7	61
mIRF9 R1	TGATACTTCGCTTGCATGGTG	21	561	58,4	
mISG15 F1	TTGCCAGAAAGATTGGTGTG	20	95	58,1	77
mISG15 R1	GGTAAGACCGTCTGGAGCA	20	171	58,7	
mLMX1B F4	CAGCAGCGAAGAGCTTTCAA	20	616	58,1	68
mLMX1B R4	GTCTCTCGGACCTTCGACA	20	683	58,8	
mPodocin F1	TGGAAGCTGAGGCACAAAGAC	21	921	59,1	51
mPodocin R1	CTTCTGCAGCAATCACCCG	19	971	59,0	
h/mS9 F	GCAAGATGAAGCTGGATTAC	20	321	51,3	166
h/mS9 R	GGGATGTTACACACCTG	17	486	50,8	

Die Oligonukleotide wurden von MWG Biotech und Metabion bezogen.

2.1.7 Vektoren

Tabelle 5: Vektoren

Vektor	Größe [kbp]	Selektionsmarker	Beschreibung	Quelle
pUHD10-3	3,2	Ampicillin	enthält einen tTA-abhängigen CMV-Minimalpromotor	H. Bujard (ZMBH, Heidelberg)

Tabelle 6: Rekombinante Vektoren

Vektor	Größe [kbp]	Selektionsmarker	Klonierung	Referenz
pCRII topo/hLMX1B	5,2	Ampicillin	menschliche LMX1B-cDNA subkloniert in pCRII topo	Brendan Lee (Baylor College, Houston)
pUHD10-3/myc-LMX1B	4,4	Ampicillin	<i>Cla</i> I/ <i>Xba</i> I (Klenow)-Insert von p3M/LMX1B kloniert in <i>Xba</i> I/ <i>Xba</i> I (Klenow) geschnittenen pUHD10-3	Rohr, 2003
pBS-ISG15	3,1	Ampicillin	PCR-Produkt (205 bp) von ISG15, TA-Klonierung in <i>EcoRV</i> geschnittenen pBluescript SK	H. Suleiman
pTRI RNA 18S	3,2	-	vom Hersteller bereits linearisiert und gebrauchsfertig für die <i>in vitro</i> -Transkription geliefert	Ambion Applied Biosystems

2.1.8 Säugerzelllinien

Tabelle 7: Säugerzelllinien

Zelllinie	Charakterisierung	Quelle/Referenz
9E10-Hybridom	Hybridom, das einen monoklonalen Antikörper gegen das humane c-Myc-Protein sezerniert [Evan et al., 1985]	American Type Culture Collection
HEK293T	HEK293-Zellen mit dem Gen für das SV40 T-Antigen	W. Nickel (BZH, Heidelberg)
HfTA-1	HeLa-Zellen mit konstitutiver Synthese des Tetrazyklin-Transaktivators (tTA) [Gossen und Bujard, 1992]	H. Bujard (ZMBH, Heidelberg)

2.1.9 Medien, Lösungen und Puffer

Isolierung genomischer DNA aus Gewebe

Verdau-Lösung	100 mM Tris pH 8,0 5 mM EDTA 0,2% SDS 200 mM NaCl 200 µg/ml Proteinase K frisch zugeben
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl pH 7,4 1 mM EDTA pH 8,0
5x Stopp-Puffer	0,125% Bromphenolblau 15% Ficoll 400 50 mM EDTA pH 8,0 0,5% SDS
Denaturierungslösung	1,5 M NaCl 0,5 M NaOH
Neutralisierungslösung	1,5 M NaCl 0,5 M Tris-HCl pH 7,2 1 mM EDTA
20x SSC	3 M NaCl 0,3 M Na ₃ -Citrat Mit 1 M HCl auf pH 7,0 einstellen.

Hybridisierungslösung	5% SDS 1% BSA 1 mM EDTA pH 8,0 25 mM Natriumphosphat pH 7,2 100 mM NaCl
-----------------------	---

Zellkultur

10x PBS	1,4 M NaCl 100 mM K ₂ HPO ₄ Mit 100 mM KH ₂ PO ₄ auf pH 7,5 einstellen.
---------	---

Bromodesoxyuridin-Färbung

4%-iges Paraformaldehyd	4 g Paraformaldehyd In 90 ml H ₂ O mit 4 Tropfen 1 M NaOH unter Rühren und Erhitzen auf 50°C lösen. Mit 10 ml 10x PBS mischen, abkühlen lassen. Filtrieren und mit 1 M HCl auf pH 7,4 einstellen.
-------------------------	---

Blockierungslösung	2% BSA 1x PBS
--------------------	------------------

Hochsalz-PBS	350 mM NaCl 1x PBS
--------------	-----------------------

Eindeckmittel	40% Glycerin 1x PBS
---------------	------------------------

Vor Gebrauch sterilfiltrieren.

Laktatdehydrogenase-Aktivitätstest

Lysepuffer
1% Triton X-100
1x PBS

Glyzin/Laktat-Puffer
58 mM Lithiumlaktat
0,2 M Glyzin

Auf pH 8,9 einstellen, Lagerung bei -20°C.

Arbeitslösung
10 ml Glyzin/Laktat-Puffer
48 mg β -NAD

Protein-Isolierung

RIPA-Puffer
1% Nonidet P40
1% Natriumdeoxycholat
0,1% SDS
150 mM NaCl
10 mM Natriumphosphat pH 7,2

Proteinase-Inhibitoren vor Gebrauch frischzugeben:

10 μ g/ml Aprotinin
1 μ g/ml Leupeptin
100 μ g/ml PMSF

Brij[®]-Puffer
10 mM Tris pH 7,5
150 mM NaCl
2 mM EDTA pH 8,0
0,875% Brij[®] 97
0,125% Nonidet P40

Proteinase-Inhibitoren vor Gebrauch frisch zugeben:

10 µg/ml Aprotinin

10 µg/ml Leupeptin

500 nM PMSF

Coomassie-Lösung

100 mg Coomassie Brilliant Blau G 250

In 50 ml Ethanol (95%) lösen, dann 100 ml Phosphorsäure (85%) zugeben und mit H₂O auf 1 l auffüllen.

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

10x Laufpuffer

250 mM Tris

1,9 M Glyzin

1% SDS

5x SDS-Probenpuffer

625 mM Tris pH 6,7

50% Glycerin

12,5% SDS

12,5% β-Mercaptoethanol

0,05% Bromphenolblau

4x Lower Tris

1,5 M Tris-HCl pH 8,8

0,4% SDS

4x Upper Tris

500 mM Tris-HCl pH 6,8

0,4% SDS

Trenngel
7 ml 4x Lower Tris
6,5 ml - 18,7 ml 30% Acrylamid/0,8% Bisacrylamid
H₂O ad 28 ml
16 µl TEMED
78 µl APS

Sammelgel
2,5 ml 4x Upper Tris
1,3 ml 30% Acrylamid/0,8% Biacrylamid
6,1 ml H₂O
50 µl 10% APS
10 µl TEMED

Western-Blotting

Tranferpuffer
50 mM Tris
384 mM Glyzin
20% Methanol
0,01% SDS

Blocklösung
1x PBS
5% Magermilchpulver
0,5% Tween 20

Waschlösung
1x PBS
0,5% Tween 20

Gesamt-RNA-Isolierung

50x TAE
2 M Tris
100 mM EDTA (freie Säure)

Mit Eisessig auf pH 8,0 einstellen.

RNA-Ladepuffer	80% Formamid
	20 mM EDTA pH 8,0
	0,05% Bromphenolblau
	0,05% Xylencyan

2.2 Methoden

2.2.1 Zucht und Genotypisierung von *Lmx1b*-Knockout-Mäusen

Lmx1b^(+/-)-Mäuse wurden von Randy Johnson (Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Texas MD Anderson Cancer Center, Houston, Texas, USA) zur Verfügung gestellt. Sie wurden mehrmals mit C57BL/6-Mäusen von Charles River Laboratories rückgekreuzt, um einen einheitlichen genetischen Hintergrund zu erhalten.

Für die in dieser Arbeit gezeigten Versuche wurden *Lmx1b*^(+/-)-Mäuse miteinander verpaart. Entweder wurde bei den Nachkommen im juvenilen Stadium der Genotyp aus der Schwanzspitze bestimmt und im adulten Stadium die erforderlichen Organe entnommen, oder von neugeborenen Nachkommen Organe entnommen und der Genotyp aus dem Kopf bestimmt.

Isolierung von genomischer DNA aus Köpfen neugeborener Mäuse oder Schwanzspitzen juveniler Mäuse

Die für die Genotypisierung der *Lmx1b*-Knockout-Mäuse (*Lmx1b*^(+/+), *Lmx1b*^(+/-) und im Fall der Neugeborenen auch *Lmx1b*^(-/-)) benötigte genomische DNA wurde aus den Köpfen neugeborener Mäuse oder aus den Schwanzspitzen juveniler Mäuse isoliert. Die Köpfe wurden zu diesem Zweck halbiert, Schwanzspitzen waren ungefähr 1 cm lang.

Das Gewebe wurde zusammen mit 700 µl Verdau-Lösung in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß gegeben und bei 50°C in einem Brutschrank über Nacht rotiert. Am nächsten Tag wurde auf dem Vortex kräftig gemischt und anschließend bei 14.000 rpm und 4°C für 30 min zentrifugiert. Vom Überstand wurden 600 µl abgenommen und mit 600 µl Isopropanol durch Schütteln gemischt. Die bei diesem Schritt aus der Lösung ausfallende und als weißes „Knäuel“ sichtbare genomische DNA wurde dann mit einer zuvor zum Haken geschmolzenen Pasteurpipette herausgehoben und zum Waschen in 900 µl 70%-iges Ethanol überführt. Daraufhin wurde die DNA für 10 s bei 14.000 rpm und Raumtemperatur abzentrifugiert und

das entstandene Pellet für 15 bis 30 min luftgetrocknet. Dann wurde die DNA in 150 µl TE gelöst, wobei das Reaktionsgefäß zur Unterstützung des Vorgangs bei 50°C geschüttelt wurde. Nach ca. 2 bis 3 h wurde für 10 s auf dem Vortex gemischt und über Nacht oder solange weiterinkubiert, bis sich die DNA vollständig gelöst hatte.

Die Konzentration der DNA-Proben wurde am Spektralphotometer bestimmt und auf der Basis dieses Ergebnisses auf 1 µg/µl eingestellt.

Bestimmung der Konzentration von DNA-Lösungen

Zur Bestimmung der Konzentration der in TE oder Wasser gelösten DNA wurde die Absorption einer 1:20-Verdünnung (v:v in TE oder Wasser) bei 260 nm gegen TE oder Wasser als Referenz an einem Spektralphotometer gemessen. Bei dieser Wellenlänge und einem Strahlengang von 10 mm entspricht eine optische Dichte (OD) von 1,0 einer Konzentration von 0,05 µg/µl. Die Konzentration der DNA in der Lösung berechnet sich demnach folgendermaßen:

$$20 \times OD_{260} \times 0,05 \mu\text{g}/\mu\text{l}.$$

Daraus ergibt sich, dass der am Spektralphotometer abgelesene Wert der DNA-Konzentration in µg/µl entspricht.

Zusätzlich wurde die 1:20-Verdünnung der DNA-Lösung bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen. Der Quotient OD_{260}/OD_{280} gibt Auskunft über den Grad der Verunreinigung der gemessenen DNA-Lösung mit Proteinen. Er sollte idealerweise zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

Restriktionsverdau

Um ein Mittel zu haben, das Wildtyp-Gen von dem in der Knockout-Maus veränderten zu unterscheiden, wurde die aus den Geweben isolierte DNA mit dem Restriktionsenzym *BamH* I verdaut. Dazu wurde folgender Restriktionsansatz mit einem Gesamtvolumen von 40 µl gemischt:

Tabelle 8: BamH I-Restriktionsansatz für die Genotypisierung von *Lmx1b*-Knockout-Mäusen

	Volumen [μl]	Endkonzentration
10x <i>Bam</i> H I-Puffer	4	1x
10 mg/ml BSA	0,4	0,1 mg/ml
100 U/ μ l <i>Bam</i> H I	0,5	1,25 U/ μ l
10 mM Spermidin	4	1 mM
1 μ g/ μ l DNA	10	0,25 μ g/ μ l
H ₂ O	21,1	

Die Reaktion wurde bei 37°C im Brutschrank über Nacht inkubiert.

Agarose-Gelelektrophorese

Die durch die Restriktion entstandenen DNA-Fragmente wurden am nächsten Tag bei einer Agarose-Gelelektrophorese im elektrischen Feld abhängig von ihrer Größe aufgetrennt.

Dazu wurde zunächst ein dickes 1%-iges Agarosegel hergestellt, indem die benötigte Agarosemenge mit dem entsprechenden Volumen an 1x TAE-Puffer in einem Mikrowellengerät zum Kochen gebracht und dann bis zum vollständigen Lösen der Agarose im Puffer geschwenkt wurde. Nach Abkühlen auf ca. 50°C wurde Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,5 μ g/ml zugefügt und die Agaroselösung in eine vorbereitete Gelkammer mit eingesetztem Kamm gegossen. Nach Auspolymerisieren der Gelmasse wurde die Gelkammer mit 1x TAE-Puffer gefüllt und der Kamm gezogen. Die Restriktionsansätze wurden mit 5x Stopp-Puffer gemischt und in die Taschen des Gels pipettiert. Zusätzlich wurde eine Positivkontrolle für den *Lmx1b*^(+/+)-Genotyp aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 150 V. Zur Kontrolle der gleichmäßigen Beladung aller Proben wurde das Gel anschließend auf einem UV-Tisch fotografiert.

Southern Blot

Für das Southern Blotting, bei dem die verdaute DNA auf eine Nylonmembran übertragen wird, wurde das Gel nach der Elektrophorese auf einem Schüttler bei Raumtemperatur

zunächst für 45 bis 60 min in Denaturierungslösung und anschließend für ebenfalls 45 bis 60 min in Neutralisierungslösung geschwenkt. Darauf folgte 20-minütiges Schwenken in 2x SSC.

Der Southern Blot wurde dann wie folgt aufgebaut. Mit einem Gelschlitten, der als Auflagefläche für Gel etc. dienen sollte, wurden zwei mit 20x SSC gefüllte Glasschalen verbunden. Darüber wurde ein Streifen von zuvor mit 20x SSC getränktem Whatman-Papier so gelegt, dass er mit seinen Enden in jeweils einen Puffertank eintauchte. Auf den Gelschlitten mit dem darüber gelegten Papier wurde das in 2x SSC geschwenkte Gel positioniert und mit einem Stück Nylon-Membran derselben Größe, das ebenfalls vorher mit 2x SSC benetzt worden war, bedeckt. Darauf folgten drei Lagen in 2x SSC getränkten, auf die Größe von Gel und Membran zugeschnittenen Whatman-Papiers und hierauf eine mehrere Zentimeter dicke Schicht ebenso zugeschnittenen aber trockenen Papiertuches. Zum Abschluss wurde eine Glasplatte aufgelegt und ein Gewicht von ca. 500 g darauf positioniert. Beim Zusammenbau des Blots musste darauf geachtet werden, dass keine „Kurzschlüsse“ zwischen Puffertank und Papierstapel entstehen konnten. Über Nacht wurde nun durch den Konzentrationsunterschied des SSC-Puffers und die Saugwirkung des Papiers die DNA auf die positiv geladene Nylon-Membran übertragen.

Um sie darauf auch zu fixieren, wurde die Membran zunächst für 20 min an der Luft getrocknet und dann für 2 h im Brutschrank bei 80°C gebacken. Eine weitere, ebenfalls genutzte Möglichkeit für die Fixierung ist die kurze Bestrahlung mit UV-Licht in einem sog. UV-Crosslinker. Nach beiden Methoden wurde die Membran bei -20°C eingefroren.

Hybridisierung und Detektion

Zur Vorbereitung der Sonde wurden zunächst 200 ng Sonden-DNA (2 µl von 100 ng/µl „LMX1B 48B2“) und 60 ng Random-Primer (1 µl von 60 ng/µl) gemischt, mit Wasser auf 8,5 µl aufgefüllt, für 5 min bei 100°C gekocht und dann auf Eis abgekühlt. Dann wurden folgende Reagenzien zu einem Endvolumen von 20 µl dazugegeben und für mindestens 3 h bei Raumtemperatur inkubiert:

Tabelle 9: Zum Einbau von α -³²P-dCTP in die Sonden-DNA zugegebene Reagenzien

	Volumen [μl]	Endkonzentration
10x Klenow-Puffer	2	1x
0,5 mM d(GAT)TP	2	50 μM
10 μCi/μl α - ³² P-dCTP	5	2,5 μCi/μl
2 U/μl Klenow-Polymerase	2,5	0,25 U/μl

Parallel dazu wurde die Membran für 3 h bei 60°C im Hybridisierungssofen in einer Hybridisierungsröhre mit 20 ml vorgewärmter Hybridisierungslösung inkubiert.

Um nicht eingebautes α -³²P-dCTP aus dem Sonden-Ansatz zu entfernen, wurde dieser im Anschluss an die 3-stündige Inkubation 2 min bei 2.700 rpm über ein Mikro-Säulchen zentrifugiert, welches zuvor aufgeschüttelt und 1 min bei 2.700 rpm zentrifugiert worden war. Der Durchfluss wurde für 5 min bei 100°C auf dem Heizblock gekocht und dann auf Eis abgekühlt. Dann wurde die Hybridisierungslösung bei der Membran durch frische Lösung ersetzt und die fertige, nun radioaktiv markierte Sonde zugegeben. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 60°C im Hybridisierungssofen.

Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal für 20 min bei 60°C gewaschen, indem die alte Lösung abgegossen und die Hybridisierungsröhre jeweils mit 100 ml 2x SSC gefüllt wurde. Darauf folgten zwei 10-minütige Waschschrte ebenfalls in der Röhre mit 2x SSC/0,1% SDS. Der letzte, 5-minütige Waschschrte mit 2x SSC wurde in einer Glasschale bei Raumtemperatur durchgeführt.

Nach dem Waschen wurde die Membran in Zellophanfolie eingeschlagen für 4 h bei Raumtemperatur auf eine sog. Image Plate aufgelegt. Diese wurde dann mit einem Phospho-Imager eingescannt. Die Auswertung erfolgte durch Vergleich des Bandenmusters mit der *Lmx1b*^(+/+)-Kontrolle.

2.2.2 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Die Zellkulturarbeiten wurden mit sterilen Verbrauchsmaterialien, Medien und Lösungen (durch Autoklavieren oder Sterilfiltrieren) an einer Sterilbank durchgeführt, um eine Kontamination der Zellen mit Bakterien, Viren oder Pilzen zu verhindern. Alle verwendeten Zelllinien wurden in Gewebekulturflaschen oder Gewebekulturschalen bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Dabei waren je nach Zelllinie verschiedene Kulturmedien mit verschiedenen Zusätzen notwendig:

Tabelle 10: Zelllinien mit benötigtem Kulturmedium und Zusätzen

Zelllinie	Kulturmedium	Zusätze
HEK293T	DMEM	10% FCS
9E10-Hybridom	RPMI 1640	10% FCS
HtTA-1	DMEM	10% FCS 200 µg/ml Geneticin 100 ng/ml Doxyzyklin
HtTA-1/myc-LMX1B	DMEM	10% FCS 200 µg/ml Geneticin 100 ng/ml Doxyzyklin 300 µg/ml Hygromycin
HtTA-1/myc-LMX1B Mutanten (ΔLIM1, C95F)	DMEM	10% FCS 200 µg/ml Geneticin 100 ng/ml Doxyzyklin 500 ng/ml Puromycin

Passagieren und Aussaat von HeLa- und HEK293T-Zellen

Sobald die adhärent wachsenden HeLa- (HtTA-1-) bzw. HEK293T-Zellen die gewünschte oder maximal sukongfluente Dichte erreicht hatten, wurde das Kulturmedium aus der Gewebekulturflasche oder -schale abgesaugt und die Zellen einmal mit 1x PBS gewaschen. Um die Zellen vom Gefäßboden abzulösen, wurden sie anschließend mit einem Volumen von Trypsin/EDTA inkubiert, das gerade ausreichte, um sie zu bedecken. Sobald die Zellen sich

bei Kippen des Gefäßes oder durch leichtes Klopfen an seine Seite vom Boden lösen, wurde mindestens das doppelte Volumen FCS-haltigen Mediums zugegeben, um das Trypsin zu inhibieren. Durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren wurden eventuell noch anheftende Zellen abgelöst und die Zellen voneinander getrennt. Je nach Versuchsaufbau unterschiedlich große Aliquots dieser Zellsuspension wurden dann auf die gewünschte Anzahl Gewebekulturflaschen oder -schalen verteilt. Zuletzt wurde mit Kulturmedium, dem im Fall der HtTA-1-Zellen frisch die erforderlichen Antibiotika zugesetzt worden waren, aufgefüllt und durch Schwenken des Gefäßes die Zellen mit dem Medium gemischt und verteilt.

Bei den HtTA-1-Zellen wurde jeden zweiten Tag das Kulturmedium abgesaugt und durch frisches, die benötigten Zusätze enthaltendes Medium ersetzt, um den Selektionsdruck auf die stabil transfizierten Klone aufrechtzuerhalten.

Zählen von Zellen

Für manche Versuche war es notwendig, die genaue Zahl der ausgesäten Zellen zu kennen. Dazu mussten sie nach dem Ablösen mit Trypsin gezählt werden.

100 µl der trypsinierten und bereits wieder mit FCS-haltigem Medium versetzten Zellen wurden mit 100 µl Trypan Blau gemischt. Ein Aliquot dieser Mischung wurde dann in eine vorbereitete Neubauer-Zählkammer pipettiert, mit deren Hilfe die lebenden, nicht mit Trypan Blau gefärbten Zellen gezählt werden konnten. Anschließend wurde unter Berücksichtigung der Anzahl ausgezählter Quadrate der Neubauer-Zählkammer, des Volumens über einem mittelgroßen Quadrat von 1×10^{-4} ml und der Verdünnungsstufe die Zellzahl pro ml berechnet.

Einfrieren von Zellen

Sollten Zellen eingefroren werden, wurde ein Aliquot trypsiniertes, mit FCS-haltigem Medium versetzter Zellen in einem 15 ml-Röhrchen für 5 min bei 100 g zentrifugiert. In der Regel wurde hierfür die Hälfte der Zellen einer 100% konfluenten 25 cm²-Gewebekulturflasche eingesetzt. Nach der Zentrifugation wurde das Medium abgesaugt und

das Zellpellet in 1,8 ml FCS/10% DMSO resuspendiert und in ein Einfrierröhrchen gefüllt. Dieses wurde sofort bei -80°C eingefroren und am nächsten Tag zur weiteren Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

Auftauen von Zellen

Zum Auftauen der Zellen wurde ein Einfrierröhrchen dem flüssigen Stickstoff entnommen und in handwarmem Wasser geschwenkt. Die Zellsuspension wurde dann in einem 15 ml-Röhrchen mit 12 ml FCS-haltigem Kulturmedium gemischt und für 5 min bei 100 g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 5 ml Kulturmedium mit frisch zugegebenen Zusätzen resuspendiert und anschließend in eine 25 cm^2 -Gewebekulturflasche pipettiert, in der die Zellen bei 37°C und 5% CO_2 anwachsen konnten.

Induktion von HtTA-1-Zellen

Um bei den HtTA-1-Zellen die Expression der unter Kontrolle des Tet-off-System stehenden LMX1B-cDNA zu induzieren, mussten die Zellen in Medium ohne Doxyzyklin kultiviert werden. Abgelöste Zellen in Trypsin wurden dazu mit doxyzyklinfreiem Medium versetzt und ausgesät. Bereits anhaftende Zellen wurden zweimal mit 1x PBS gewaschen, bevor das Kulturgefäß mit Medium ohne Doxyzyklin befüllt wurde.

Kultivierung von 9E10-Hybridom-Zellen und Gewinnung des antikörperhaltigen Überstands

Die 9E10-Hybridoma-Zellen sezernieren einen monoklonalen anti-c-Myc-Antikörper, der für die Detektion von c-Myc-gekoppelten Proteinen eingesetzt wurde.

9E10-Hybridom-Zellen wurden in 75 cm^2 -Gewebekulturflaschen in 50 ml Medium kultiviert. Im Abstand von zwei bis drei Tagen wurde das Medium abgenommen und in ein 50 ml-Röhrchen pipettiert. Anschließend wurde wieder frisches Medium auf die Zellen gegeben. Eine Trypsinierung der Zellen zum Passagieren war nicht erforderlich, da sich Hybridomzellen in den verwendeten Gewebekulturflaschen nur schwach anheften und sich

daher die Zelldichte durch Ablösen von Zellen in das Medium selbst reguliert. Das abgenommene Medium wurde für 10 min bei 1.000 rpm zentrifugiert, der Überstand wurde in ein frisches steriles Gefäß überführt. Nach Zugabe von 0,02% Thimerosal zur Verhinderung bakterieller Kontaminationen konnte der antikörperhaltige Überstand bei 4°C gelagert werden.

2.2.3 Transfektion eukaryotischer Zellen

Stabile Transfektion mit Poly-L-Ornithin

Es wurde eine Kotransfektion von HfTA-1-Zellen mit dem das Puromycin-Resistenzgen enthaltenden pWE3-Vektor und dem pUHD10-3-Plasmid, auf dem sich die Δ LIM1-Mutante der LMX1B-cDNA unter der Kontrolle eines tTA-abhängigen CMV-Promotors befindet, durchgeführt.

Am Vortag wurden HfTA-1-Zellen in eine 25 cm²-Gewebekulturflasche in Medium mit Doxzyklin ausgesät. Am nächsten Tag sollten die Zellen ungefähr 70%-ige Konfluenz erreicht haben. Für die Transfektion wurde das Medium abgesaugt und durch folgenden Ansatz ersetzt:

- 3 ml Kulturmedium mit allen Zusätzen
- + 30 µg Poly-L-Ornithin
- + 8 µg Plasmid-DNA.

Letztere unterteilte sich dabei in 7,2 µg des pUHD10-3-Plasmids und 0,8 µg des pWE3-Vektors.

Die Inkubation erfolgt für 6 h bei 37°C und 5% CO₂. Nach Ablauf der Zeit wurde das Medium wieder abgesaugt und 4 ml einer Mischung aus 70% Kulturmedium und 30% DMSO für 4 min bei Raumtemperatur auf den Zellen inkubiert. Nach Absaugen der Mischung wurde zweimal mit 1x PBS gewaschen und wieder frisches Kulturmedium zugefügt.

24 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit Trypsin abgelöst und die Suspension mit Kulturmedium auf 14 ml aufgefüllt. 1, 3, und 10 ml hiervon wurden auf 10 cm-Gewebekulturschalen ausgesät und weiterkultiviert. 72 h nach Transfektion wurden die Zellen unter Selektionsdruck gesetzt, indem dem Medium Puromycin in einer Endkonzentration von 500 ng/ml zugefügt wurde. Alle zwei Tage wurde das Medium abgesaugt und durch frisches antibiotikahaltiges Medium ersetzt und somit nicht resistente, abgestorbene und abgelöste Zellen entfernt.

Nach einer Zeitspanne von ungefähr 10 bis 14 Tagen hatten sich auf diese Weise Kolonien puromycinresistenter Zellen gebildet. Diese wurden dann mit Hilfe einer gelben Pipettenspitze abgeschabt und gleichzeitig aufgesaugt und in eine 24-Loch-Platte überführt. Dort wurden die Zellen unter Selektion so lange weiter kultiviert, bis sie eine hohe Dichte erreicht hatten. Dann wurden sie abgelöst und in eine 6 cm-Gewebekulturschale pipettiert, wobei ein kleiner Rest Zellen als Vorrat in der 24-Loch-Platte verblieb. Nach zwei Tagen in der 6 cm-Gewebekulturschale wurden die puromycinresistenten HtTA-1-Klone zweimal mit 1x PBS gewaschen und dann mit Medium ohne Doxyzyklin versetzt, um die Expression der transfizierten LMX1B-cDNA zu induzieren. Nach dreitägiger Induktion wurden die Zellen geerntet und mit RIPA-Puffer lysiert. Mit einer SDS-PAGE und anschließendem Western-Blot wurden so die Klone auf LMX1B-Synthese überprüft.

2.2.4 Stimulierung von HtTA-1-Zellen mit Interferon- β

HtTA-1-Zellen wurden von ihrem bisherigen Kulturgefäß mit Trypsin/EDTA abgelöst und in die Vertiefungen einer 6-Loch-Gewebekulturplatte in einer Dichte ausgesät, die es ermöglichte, sie zwei Tage später subkonfluent zu ernten. An diesem Tag wurde zunächst das Kulturmedium abgesaugt und frisches Medium auf die Zellen pipettiert. Diesem wurden dann verschiedene Konzentrationen von rekombinantem humanem Interferon- β (IFN β) zugesetzt. Je eine Vertiefung mit Zellen wurde mit 0, 0,02, 0,1, 0,5, 2,5 bzw. 12,5 ng/ml IFN β versetzt, wobei die zu pipettierenden Volumina zuvor mit sterilem Wasser auf das größte Volumen aufgefüllt worden waren. Dann wurde für 8 h unter Kulturbedingungen inkubiert. Anschließend wurden die Zellen wie in Kapitel 2.2.12 beschrieben geerntet und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Für eine weitere Versuchsreihe wurden die abgelösten HtTA-1-Zellen so dicht in die Vertiefungen einer 6-Loch-Platte ausgesät, dass die Ernte 4 Tage später erfolgen konnte. Zwei Tage nach der Aussaat wurden die Zellen zunächst mit IFN β stimuliert, indem das Kulturmedium ausgetauscht und mit folgenden Konzentrationen des Zytokins versetzt wurde (jeweils eine Vertiefung): 0, 12,5 und 62,5 ng/ml. Die Inkubation erfolgte bei diesem Experiment für 48 h unter Kulturbedingungen. Im Anschluss wurde wie in Kapitel 2.2.12 beschrieben für eine Gesamt-RNA-Isolierung geerntet und bei -80°C gelagert.

2.2.5 Neutralisierung der biologischen Aktivität von Interferon- β mittels Anti-IFN β -Antikörper

Der in diesem Versuch verwendete Antikörper gegen humanes IFN β neutralisiert durch seine Bindung die biologische Aktivität des Zytokins, indem er dessen Interaktion mit dem Interferon- α/β -Rezeptor und somit ein Signal an die betreffende Zelle verhindert.

HtTA-1/myc-LMX1B-Zellen wurden mehrere Tage in Kulturmedium mit 100 ng/ml Doxyzyklin kultiviert und dann für die kommende Aussaat wie in Kapitel 2.2.2 beschrieben mit Trypsin abgelöst. In vier Vertiefungen einer 6-Loch-Gewebekulturplatte wurden so viele Zellen ausgesät, dass sie vier Tage später subkonfluent geerntet werden konnten. Eine Vertiefung wurde mit Medium mit 100 ng/ml Doxyzyklin gefüllt, die anderen drei Vertiefungen mit Medium ohne Doxyzyklin, um die Synthese von LMX1B zu induzieren. Zwei dieser drei Vertiefungen wurden zusätzlich mit dem neutralisierenden Antikörper behandelt, eine mit 0,2 μ g/ml, die andere mit 0,6 μ g/ml Antikörper. Nach zweitägiger Kultur wurde das Medium abgesaugt und durch frisches Medium ersetzt. Diesem wurden erneut die angegebenen Konzentrationen von Doxyzyklin und Antikörper zugesetzt. Nach weiteren zwei Tagen wurde wie in Kapitel 2.2.12 beschrieben geerntet, um dann nach RNA-Extraktion und cDNA-Synthese eine Echtzeit-PCR (siehe Kapitel 2.2.14) durchzuführen.

2.2.6 Inhibierung der I κ B-Kinase durch Prostaglandin A₁

Prostaglandin A₁ wurde dazu eingesetzt, die Aktivität von NF- κ B zu inhibieren. Dies geschieht über kovalente Modifikation und damit Inhibierung der I κ B-Kinase, welche nun nicht mehr die Phosphorylierung von I κ B katalysieren kann. Dieses bleibt so an NF- κ B gebunden und verhindert dessen Translokation in den Zellkern und damit seine Aktion als Transkriptionsfaktor.

HtTA-1/myc-LMX1B-Zellen wurden nach mehrtägiger Kultur in Medium mit 100 ng/ml Doxyzyklin von ihrem bisherigen Kulturgefäß wie in Kapitel 2.2.2 beschrieben abgelöst und in die Vertiefungen einer 6-Loch-Platte erneut ausgesät. Dabei wurde die Zellzahl einer geplanten Kulturdauer von 3 Tagen angepasst. Drei Vertiefungen wurden mit doxyzyklinhaltigem Medium (100 ng/ml) zur Unterdrückung der LMX1B-Transkription gefüllt, die anderen drei Vertiefungen mit Medium ohne Doxyzyklin zur Induktion der Transkription. Nach zwei Tagen wurde das Medium abgesaugt und durch frisches Medium mit den erforderlichen Zusätzen ersetzt. Zu Beginn des dritten Tages wurde für einen 12-Stunden-Wert zu den Zellen einer Vertiefung mit und einer Vertiefung ohne Doxyzyklin Prostaglandin A₁ in einer Endkonzentration von 65 μ M pipettiert. Zwei andere Vertiefungen erhielten die entsprechende Menge des Lösungsmittels Ethanol. Neun Stunden später wurde für einen 3-Stunden-Wert die gleiche Menge Prostaglandin A₁ in die verbleibenden zwei Vertiefungen gegeben. Nach weiteren drei Stunden erfolgte die Ernte der Zellen für die RNA-Isolierung, der sich eine cDNA-Synthese (siehe Kapitel 2.2.13) und eine Echtzeit-PCR (siehe Kapitel 2.2.14) anschlossen.

2.2.7 Bromodesoxyuridin-Färbung von Zellen in der S-Phase

5-Bromo-2-Desoxyuridin (BrdU) ist ein Analog der Base Thymidin. Inkubiert man lebende Zellen mit BrdU, wird es von denjenigen, die sich gerade in der S-Phase (DNA-Synthesephase) des Zellzyklus befinden, in die neu synthetisierte DNA eingebaut. Durch immunzytochemische Detektion des BrdUs mit Antikörpern, die an BrdU, nicht aber an Thymidin binden, lassen sich so Zellen in der S-Phase nachweisen und damit die Teilungsrate einer Zellpopulation bestimmen [Pagano, 1995].

Kultivierung der Zellen

HtTA-1- und HtTA-1/pUHD10-3/myc-*LMX1B*-Zellen wurden von ihrem bisherigen Kulturgefäß mit Trypsin abgelöst (siehe Kapitel 2.2.2) und in die Vertiefungen einer 24-Loch-Gewebekulturplatte ausgesät. Zuvor waren unbeschichtete Glasplättchen in die Vertiefungen gegeben worden, auf denen sich die Zellen für die anschließende Immunzytochemie anheften konnten. Zum Zeitpunkt des BrdU-Pulses sollten die Zellen maximal subkonfluent gewachsen sein. Dementsprechend wurde die ausplattierte Zellmenge gewählt. Um induzierte und nicht induzierte Zellen vergleichen zu können, wurde eine Hälfte der Zellen in Medium ohne Doxzyklin, die andere Hälfte in Medium mit 100 ng/ml Doxzyklin kultiviert.

Inkubation mit Bromodesoxyuridin

Am vierten Tag nach Aussaat und direkt vor der Fixierung für die Immunzytochemie wurde Bromodesoxyuridin in einer Endkonzentration von 3 mg/ml in das Kulturmedium gegeben und durch vorsichtiges Schwenken mit diesem gemischt. Die Inkubation, bei der in der S-Phase befindliche Zellen das BrdU in ihre DNA einbauen, erfolgte für 30 min unter Kulturbedingungen.

Immunzytochemische BrdU-Färbung und Kernfärbung mit Hoechst 33258

Die Glasplättchen mit den angehefteten Zellen wurden mit Hilfe einer Pinzette der Gewebekulturplatte entnommen und in die Vertiefungen einer anderen 24-Loch-Platte, in die bereits 1x PBS vorgelegt worden war, überführt. Das 1x PBS wurde abgesaugt und durch frisches ersetzt, um Mediumreste abzuwaschen. Anschließend wurden die Zellen für 15 min in frisch angesetztem 4%-igem Paraformaldehyd fixiert. Nach einem Waschschrift mit 1x PBS wurden die Zellen für 30 min zum Zweck der Permeabilisierung und Blockierung in ebenfalls frischer Blockierungslösung mit 0,2% Triton X-100 inkubiert. Dann wurde zunächst wieder mit 1x PBS gewaschen und danach der Anti-BrdU-Primärantikörper in einer 1:1.000-Verdünnung in Blockierungslösung für 2 h bei 4°C auf die Zellen gegeben. Dazu wurde, um Antikörper zu sparen, ein Tropfen der Verdünnung auf Parafilm gegeben und das Glasplättchen mit der bewachsenen Seite ohne Luftblasen auf den Tropfen gelegt. Um ein

Eintrocknen der geringen Flüssigkeitsmenge zu verhindern, erfolgte die Inkubation in einer mit befeuchteten Papiertüchern ausgelegten Schachtel. Im Anschluss wurde in der Gewebekulturplatte dreimal 5 min mit Hochsalz-PBS und einmal mit 1x PBS gewaschen. Dann wurde mit dem Sekundärantikörper, einem Cy3-gekoppelten Anti-Maus-IgG-Antikörper, in einer 1:300-Verdünnung in Blockierungslösung für 1 h im Dunkeln wieder bei 4°C auf Parafilm in der Schachtel inkubiert. Auch hiernach erfolgten drei fünfminütige Waschschriffe mit Hochsalz-PBS und einer mit 1x PBS in der Gewebekulturplatte. Letztere wurde für die Inkubationszeiten abgedeckt, um ein Verblässen der Fluoreszenz zu vermeiden. Um eine DNA- bzw. Kernfärbung aller Zellen auf den Glasplättchen als Kontrolle zu haben, wurde nach dem letzten Waschschriff noch eine Färbung mit Bisbenzimid (Hoechst 33258), einer fluoreszierenden Substanz, die an DNA bindet, durchgeführt. Dazu wurden die Glasplättchen mit 10 µg/ml Hoechst 33258 in 1x PBS überschichtet und 2 min im Dunkeln inkubiert. Dann wurden sie dreimal für 5 min ebenfalls im Dunkeln mit 1x PBS gewaschen und anschließend auf Objektträgern eingebettet.

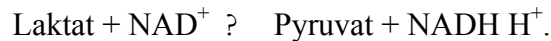
Für diesen Schriff wurde ein Tropfen Eindeckmittel auf einen Objektträger gegeben, ein Glasplättchen mit den Zellen nach oben darauf gelegt und mit einem weiteren Tropfen Eindeckmittel bedeckt. Nachfolgend wurde ein Deckglas luftblasenfrei darüber gelegt und gegebenenfalls noch etwas Eindeckmittel zwischen die Glasschichten pipettiert.

Auswertung

Der Versuch wurde am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Hierbei wurde durch Wechsel der Wellenlänge sowohl die rote Fluoreszenz des Cy3-gekoppelten Sekundärantikörpers als auch die blaue Fluoreszenz des Bisbenzimids im Kern der Zellen betrachtet. Es wurden pro Glasplättchen mindestens 1.000 Bisbenzimid-gefärbte Kerne gezählt und der Anteil der ebenfalls rot fluoreszierenden und somit BrdU-positiven Kerne an diesen bestimmt. Eventuell angefertigte Fotografien wurden mit einer Digitalkamera aufgenommen und an einem daran angeschlossenen Computer mit entsprechender Software ausgewertet.

2.2.8 Laktatdehydrogenase-Aktivitätstest

Das Enzym Laktatdehydrogenase (LDH) ist eine ubiquitär vorkommende Oxidoreduktase, die folgende Reaktion katalysiert:



Im Gegensatz zu NAD^+ absorbiert $\text{NADH} + \text{H}^+$ Licht der Wellenlänge 340 nm. Mit einem Photospektrometer kann also das Endprodukt vom Ausgangsprodukt unterschieden werden. Dies macht man sich beim Laktatdehydrogenase-Aktivitätstest zunutze, mit dem man die relative Laktatdehydrogenase-Aktivität von Zelllysaten bestimmen kann. Da die LDH-Aktivität der Zellzahl direkt proportional ist, können mit Hilfe des Tests Wachstumskurven erstellt werden.

Kultivierung der Zellen

HtTA-1-Zellen und stabil mit pUHD10-3/myc-LMX1B (Wildtyp oder Mutante) transfizierte HtTA-1-Zellen wurden zunächst drei Tage entweder mit 100 ng/ml Doxyzyklin (nicht induzierte Zellen) oder ohne Doxyzyklin (induzierte Zellen) in 10 cm-Gewebekulturschalen kultiviert. Dann wurden sie wie beim Passagieren mit Trypsin abgelöst (siehe Kapitel 2.2.2) und nach der Zugabe von Medium und Überführen in ein 15 ml-Plastikröhrchen für 5 min bei 100 g zentrifugiert. Das Medium wurde abgesaugt, das Pellet in 10 ml Medium resuspendiert und die Anzahl der Zellen in dieser Suspension gezählt (siehe Kapitel 2.2.2). Anschließend wurden je 18.000 Zellen in 6 cm-Gewebekulturschalen ausgesät (Tag 0). Für jeden zu messenden Zeitpunkt (Tag 1, 3, 5, 7 und 9) wurden sechs Gewebekulturschalen angelegt. Drei davon wurden mit 3 ml Medium mit 100 ng/ml Doxyzyklin, die anderen drei mit Medium ohne Doxyzyklin befüllt [Cedzich, 2000].

Lyse der Zellen

Am ersten, dritten, fünften, siebten und neunten Tag nach der Aussaat in die 6 cm-Gewebekulturschalen wurden drei Schalen mit Doxyzyklin behandelte Zellen und drei

Schalen ohne Doxyzyklin gewachsener Zellen geerntet. Dazu wurde das Medium abgesaugt und zweimal mit 1 ml 1x PBS gewaschen. Danach wurden 500 µl Lysepuffer in die Schalen pipettiert und auf den Zellen verteilt. Es folgte eine Inkubation bei 4°C für 15 min. Anschließend wurden die lysierten Zellen mit einem Zellschaber von der Schalenoberfläche gelöst, mehrmals auf- und abpipettiert und dann in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Nach einer Zentrifugation bei 14.000 rpm und 4°C wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert und dieses laktatdehydrogenasehaltige Zelllysate bis zur Durchführung des Aktivitätstests bei 4°C gelagert. Die Lysate der drei jeweils gleich behandelten Schalen wurden hierbei nicht zusammengeführt, sondern getrennt verarbeitet.

Laktatdehydrogenase-Aktivitätstest

Zur Vorbereitung des Aktivitätstests musste zunächst die Arbeitslösung frisch angesetzt werden. Als nächstes wurden jeweils 20 µl der zu messenden Zelllysate in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte (96-Loch) pipettiert. Darauf wurden, um einen ungefähr gleichzeitigen Start aller Reaktionen zu gewährleisten, mit einer Mehrkanalpipette möglichst rasch je 200 µl der Arbeitslösung gefüllt. Nach 20 min und 45 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde dann die Absorption der Proben bei 340 nm mit Hilfe eines Mikroplattenlesegeräts gemessen. Zusätzlich zu den Proben wurde auch eine Mischung aus 20 µl Lysepuffer und 200 µl Arbeitslösung gemessen, um einen Basalwert der Absorption zu haben. Dieser wurde für die Berechnung der relativen Laktatdehydrogenase-Aktivität von den Werten der Lysate abgezogen. Es wurden die Mittelwerte der drei gleichen Proben jeder Bedingung berechnet und die Differenz der bereinigten Mittelwerte nach 45 min und 20 min ermittelt. Diese Differenz ist der LDH-Aktivität der Proben direkt proportional. Diese wiederum ist der Zellzahl direkt proportional, und konnte so zur Darstellung des Zellwachstums in einem Graphen gegen die Dauer der Kultivierung aufgetragen werden.

Lag die Absorption der Proben über 0,8 OD und somit, wie bei der Etablierung des Aktivitätstests festgestellt, nicht mehr im linearen Bereich der Messung (Daten nicht gezeigt), wurden die Lysate in Dreierschritten mit Lysepuffer verdünnt und erneut gemessen. Wie ebenfalls in Vorexperimenten bestimmt (Daten nicht gezeigt), mussten die nach der Verdünnung erhaltenen Absorptionswerte pro Verdünnungsstufe mit dem Faktor 2,3 statt dem

Faktor 3 multipliziert werden, um mit den unverdünnten Proben verglichen werden zu können.

2.2.9 Isolierung von Protein

Ernte von HeLa-Zellen für die Protein-Isolierung

HeLa-Zellen wurden in 6 cm-Gewebekulturschalen ausgesät und für die gewünschte Zeitdauer in DMEM-Medium mit den entsprechenden Zusätzen kultiviert. Am Tag der Ernte sollte ein subkonfluenten Zellrasen vorliegen.

Für die Ernte wurde zuerst das Medium abgesaugt und die Zellen mit 1 ml 1x PBS gewaschen. Dieser Waschschrift wurde einmal wiederholt. Dann wurde 1 ml 1x PBS in die Kulturschale gegeben und die Zellen mit einem Zellschaber von der Schale gelöst. Die nun im PBS schwimmenden Zellen wurden in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und durch Zentrifugation für 1 min bei 3.000 rpm pelletiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet entweder sofort zur Lyse weiterverwendet oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und dann bei -80°C gelagert.

Zellyse mit RIPA-Puffer oder Brij-Puffer

Die Zellpellets wurden ihrer Größe entsprechend in 50 µl bis 200 µl RIPA- oder Brij-Puffer resuspendiert. Die Inkubation erfolgte auf Eis für 15 bis 30 min. Anschließend wurde 15 min bei 4°C und 13.000 rpm zentrifugiert und der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Die Lagerung des Lysats erfolgte bei -80°C.

Bestimmung der Proteinkonzentration

Um die Konzentration von Protein in den hergestellten Lysaten zu bestimmen, wurde ein abgewandeltes Protokoll nach Bradford angewendet.

Wurde RIPA-Puffer für die Lyse verwendet, mussten die Proben zunächst 1:20 in 1x PBS/1% Triton X-100 verdünnt werden, da das im RIPA-Puffer enthaltene SDS bei dieser Methode das Ergebnis verfälscht. Proben in Brij-Puffer konnten unverdünnt gemessen werden. 2 bis 5 μl des verdünnten bzw. unverdünnten Lysats wurden in einer Küvette mit Wasser auf 10 μl aufgefüllt und mit 1 ml Coomassie-Lösung gemischt. Ebenso wurde eine Standard-Reihe von 0, 1, 2,5, 5, 15 und 50 μg Serumalbumin (BSA) in 10 μl Wasser mit 1 ml Coomassie-Lösung gemischt. Sowohl die Lysat- als auch die Standard-Proben wurden in einem Spektralphotometer bei 450 und 590 nm gegen Wasser gemessen.

Zur Berechnung der Proteinkonzentrationen wurde zunächst bei allen Proben der Quotient aus OD_{590} und OD_{450} berechnet und jeweils der Quotient der Negativkontrolle (0 μg BSA) von diesem Wert abgezogen. Durch diesen so erhaltenen korrigierten Quotienten wurden die eingesetzten BSA-Mengen dividiert. Von den hieraus resultierenden Quotienten wurde der Mittelwert gebildet. Mit diesem Mittelwert wurden die korrigierten Quotienten der Lysat-Proben multipliziert. Im letzten Schritt wurden Verdünnungsfaktor und eingesetztes Volumen berücksichtigt und die Proteinkonzentration in $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ berechnet.

2.2.10 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) können Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Anschließend besteht die Möglichkeit einer Färbung der Proteine im Gel oder des Transfers der Proteine auf eine Membran mit nachfolgender Immundetektion.

Für diese Arbeit wurde ein vertikales Elektrophorese-System verwendet und aus Sammel- und Trenngel bestehende Polyacrylamid-Gele eingesetzt. Die Konzentration des Acrylamids im Trenngel richtete sich nach dem Molekulargewicht der aufzutrennenden Proteine. Zuerst mussten Glasplatten und Abstandshalter zusammengesetzt und fixiert werden. Dann wurden 28 ml Trenngel gemischt und zwischen die Glasplatten gegossen. Durch Übersichten mit 2 ml Wasser wurde die Oberfläche des Gels geglättet. Nachdem das Trenngel polymerisiert war, wurde zuerst das Wasser abgegossen und dann 10 ml Sammelgel gemischt und auf das Trenngel gegeben. Anschließend wurde ein Kamm in der Stärke der Abstandshalter eingesetzt und die Polymerisierung des Sammelgels abgewartet. Nach Aufsetzen der oberen Kammer

und deren Befüllen mit Laufpuffer konnten die Proben geladen werden. Hierfür mussten die Proteinlysate zunächst mit dem erforderlichen Volumen an 2x bzw. 5x SDS-Probenpuffer gemischt und 5 min bei 100°C im Heizblock aufgeköcht werden. Wenn nicht anders erforderlich, wurden 40 µg Gesamtprotein je Probe aufgetragen. Um das Molekulargewicht der aufgetrennten Proteine angeben zu können, wurde ein vorgefärbter Proteinmarker mit aufgetragen. Nun wurde auch die untere Kammer mit Laufpuffer befüllt und die Gelelektrophorese bei 500 V unter ständiger Kühlung gestartet. Sobald das Bromphenolblau des Probenpuffers das untere Ende des Gels erreicht hatte, wurde die Elektrophorese gestoppt und das Trenngel für das weitere Vorgehen isoliert.

2.2.11 Western-Blotting

Beim Western-Blotting werden die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine mit Hilfe eines elektrischen Feldes auf eine Membran transferiert und immobilisiert. Dadurch werden sie für eine Immundetektion zugänglich.

Zuerst wurden eine PVDF-Membran und sechs Lagen Whatman-3MM-Papier auf die Größe des Trenngels zugeschnitten. Die Membran wurde zuerst kurz mit Methanol benetzt und dann in Transferpuffer geschwenkt. Das Whatman-Papier wurde ebenso wie zwei zur Blotting-Apparatur gehörige Schaumstoffpolster mit Transferpuffer getränkt. Das Gel wurde kurz in Transferpuffer äquilibriert. Anschließend wurde der Blot auf einem Träger der Apparatur von Anodenseite zu Kathodenseite wie folgt aufgebaut: ein Schaumstoffpolster, drei Lagen Whatman-Papier, PVDF-Membran, Gel, drei Lagen Whatman-Papier, ein Schaumstoffpolster. Der Träger wurde geschlossen und in die mit Transferpuffer gefüllte Western-Blotting-Kammer gehängt. Der Transfer erfolgte für 2,5 h bei 1 A unter ständiger Kühlung.

Nach Ende des Transfers wurden die Banden des Proteinmarkers auf der Membran markiert. Dann wurde die Membran in Blocklösung überführt und über Nacht darin blockiert. Dieser Schritt erfolgte wie alle weiteren auf einem Schüttler. Am nächsten Tag wurde die Membran 2 h mit dem in Blocklösung verdünnten Primärantikörper inkubiert. Danach wurde zuerst zweimal 10 min mit Waschlösung und dann zweimal 10 min mit Blocklösung gewaschen. Darauf folgte eine einstündige Inkubation mit einem Meerrettichperoxidase (HRP)-

gekoppelten Sekundärantikörper in Blocklösung, nach der die Membran viermal 10 min in Waschlösung und zweimal 10 min in 1x PBS gewaschen wurde. Für die Detektion wurden Luminol- und Oxidations-Reagenz des Western Lightning Chemiluminescence Reagent von PerkinElmer 1:1 gemischt. Das Volumen richtete sich dabei nach der Größe der Membran. Diese wurde 1 min in der Mischung inkubiert und dann in einer Klarsichthülle in eine Filmkassette überführt. Nun konnte im Dunkeln ein Röntgenfilm aufgelegt werden. Nach unterschiedlichen, u.a. von Primärantikörper und Proteinmenge abhängigen Expositionszeiten wurde der Röntgenfilm dann entwickelt.

Entwicklung eines Röntgenfilms

Der fertig exponierte Röntgenfilm wurde zuerst solange in Entwickler inkubiert, bis die gewünschte Schwärzung zu sehen war, dann wurde er kurz in Wasser gespült und für 15 min in Fixierer gelegt. Anschließend wurde der Film 15 min mit Wasser gewaschen und zum Trocknen aufgehängt. Durch Auflegen auf die zugehörige Membran konnten die Banden des Proteinmarkers auf den Röntgenfilm übertragen werden.

2.2.12 Isolierung von Gesamt-RNA

Kultivierung von Zellen für die Gesamt-RNA-Isolierung

Für die Isolierung von Gesamt-RNA bestimmte HeLa-Zellen wurden je nach Versuchsaufbau in DMEM für unterschiedliche Zeitdauer und mit verschiedenen Mediumzusätzen auf Gewebekulturschalen oder in Gewebekulturplatten kultiviert. Um die Kapazitätsgrenze des RNA-Kits von 5×10^6 Zellen nicht zu überschreiten, wurden ausschließlich subkonfluente Kulturen von 6 cm-Gewebekulturschalen oder von 6-Loch-Gewebekulturplatten verwendet.

Ernte von HeLa-Zellen für die Gesamt-RNA-Isolierung

Die Zellen wurden wie in Kapitel 2.2.2 beschrieben mit Trypsin/EDTA von ihrem Kulturgefäß abgelöst. Dann wurde durch Zugabe des vierfachen Volumens von FCS-haltigem Medium das Trypsin/EDTA inhibiert und durch Auf- und Abpipettieren noch anhaftende Zellen abgelöst

und alle Zellen vereinzelt. Die erhaltene Zellsuspension wurde in ein 50 ml-Röhrchen gegeben, mit eiskaltem 1x PBS auf 40 ml aufgefüllt und 5 min bei 100 g und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml eiskaltem 1x PBS resuspendiert und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Nach einer weiteren Zentrifugation, dieses Mal 1 min bei 3.000 rpm, wurde das PBS abgesaugt und das geschlossene Reaktionsgefäß in flüssigen Stickstoff getaucht. Bis zur RNA-Isolierung wurde das schockgefrorene Zellpellet dann bei -80°C aufbewahrt.

Isolierung von Gesamt-RNA mit dem NucleoSpin RNA II Kit von Macherey-Nagel

Alle Schritte des Protokolls fanden bei Raumtemperatur statt. Es wurden ausschließlich RNase-freie Pipettenspitzen mit Filtereinsatz und RNase-freie Reaktionsgefäße verwendet. Zur Herstellung des 70%igen Ethanol wurde autoklaviertes Wasser benutzt.

Pro Pellet wurden zu Beginn 350 µl Puffer RA1 und 3,5 µl β-Mercaptoethanol gemischt. Diese Mischung wurde dann zur Lyse der Zellen und gleichzeitigen Inaktivierung von RNasen eingesetzt. Dazu wurde sie auf das noch gefrorene Zellpellet gegeben und ca. zehnmal auf- und abpipettiert bis eine klare, visköse Lösung entstand. Durch einminütige Zentrifugation bei 13.000 rpm über eine mitgelieferte Filtereinheit wurde das Lysat gereinigt und die Viskosität verringert. Das aufgefangene Filtrat wurde mit 350 µl 70%-igem Ethanol versetzt und durch zehnmaliges Auf- und Abpipettieren gemischt, um optimale Bedingungen für die Bindung der RNA an die Membran der im nächsten Schritt verwendeten Quarzsäule zu erhalten. Die Bindung erfolgte während einer Zentrifugation des Lysats für 30 s bei 10.000 rpm über die Säule. Als nächstes wurden 350 µl MDB für 1 min bei 13.000 rpm über die Säule zentrifugiert. Dieser Puffer entfernt Salze von der Säule, der folgende DNase I-Verdau wird dadurch effektiver. 95 µl einer zuvor frisch angesetzten Lösung aus 90 µl DNase-Reaktionspuffer und 5 µl DNase I wurden für den Verdau direkt auf die Membran gegeben. Nach Ablauf der Inkubationszeit von 20 min wurden 200 µl Puffer RA2 zupipettiert und für 30 s bei 10.000 rpm über die Säule zentrifugiert. An diesen Schritt, bei dem die DNase inaktiviert wird, schlossen sich zwei weitere Waschschrte mit Puffer RA3 an. Im ersten wurden 600 µl dieses Puffers für 30 s mit 10.000 rpm über die Säule zentrifugiert, im zweiten 250 µl für 2 min bei 13.000 rpm, um die Membran vollständig zu trocknen. Eluiert wurde die RNA dann in einem einminütigen Zentrifugationsschritt bei 13.000 rpm mit 60 µl

RNase-freiem Wasser, welches direkt auf die Membran pipettiert wurde. Um die Ausbeute zu erhöhen, wurde das Eluat ein zweites Mal auf die Membran gegeben und zentrifugiert. Die Lagerung der RNA-Lösung erfolgte bei -80°C .

Bestimmung der Konzentration von RNA-Lösungen

Zur Bestimmung der Konzentration der in Wasser gelösten RNA wurde die Absorption einer 1:25-Verdünnung (v:v in RNase-freiem Wasser) dieser Lösung bei 260 nm gegen Wasser als Referenz in einem Spektralphotometer gemessen. Bei dieser Wellenlänge und einem Strahlengang von 10 mm entspricht eine optische Dichte (OD) von 1,0 einer Konzentration von $0,04 \mu\text{g}/\mu\text{l}$. Die RNA-Konzentration berechnet sich demnach wie folgt:

$$25 \times \text{OD}_{260} \times 0,04 \mu\text{g}/\mu\text{l}.$$

Daraus ergibt sich, dass der am Photometer abgelesene Wert mit der Konzentration der RNA-Lösung in $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ übereinstimmt.

Agarose-Gelelektrophorese von RNA

Um die Qualität der isolierten RNA zu überprüfen, wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt, bei der die RNA im elektrischen Feld in Abhängigkeit der Größe ihrer einzelnen Komponenten aufgetrennt wird. Dazu wurde eine Agarosekonzentration von 1,5% eingesetzt. Zur Herstellung des 1x TAE-Puffers durch Verdünnen von 50x TAE-Puffer wurde autoklaviertes Wasser verwendet, alle Glasgefäße wurden zuvor autoklaviert. Die Teile einer Gelkammer und ein Kamm wurden mit einem RNase-Dekontaminations-spray behandelt.

In einem autoklavierten Erlenmeyerkolben wurde zunächst die benötigte Agarosemenge abgewogen und das entsprechende Volumen frischen 1x TAE-Puffers zugegeben. Dieses Gemisch wurde dann in einem Mikrowellengerät zum Kochen gebracht und anschließend so lange geschwenkt, bis sich die Agarose vollständig im Puffer gelöst hatte. Nach Abkühlen auf ca. 50°C wurde Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von $0,5 \mu\text{g}/\text{ml}$ zugefügt und die Agaroselösung in die vorbereitete Gelkammer gegossen. Nach Auspolymerisieren der

Gelmasse wurde die Gelkammer mit 1x TAE-Puffer gefüllt und der Kamm gezogen. Ein 1 µg RNA entsprechendes Volumen der RNA-Proben wurde mit 6x RNA-Probenpuffer gemischt und in die Taschen des Gels pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei 150 V. Anschließend wurde das Gel auf einem UV-Licht-Tisch fotografiert. Dabei sollten 28S rRNA und 18S rRNA bei guter Qualität der RNA-Probe als scharfe Banden zu erkennen sein.

2.2.13 Reverse Transkription mit dem iScript cDNA Synthesis-Kit von Bio-Rad

Der iScript cDNA Synthesis-Kit von Bio-Rad verwendet eine modifizierte MMLV-Reverse Transkriptase und eine Mischung aus oligo (dT)- und Zufallshexamer-Primern für die reverse Transkription. In einem Zwei-Schritt-Protokoll wird aus einer RNA-Vorlage cDNA synthetisiert.

Auf Eis wurde hierzu in einem 0,2 ml-Reaktionsgefäß 1 µg Gesamt-RNA (siehe Kapitel 2.2.12) mit RNase-freiem Wasser auf 15 µl aufgefüllt. Anschließend wurden 4 µl 5x iScript Reaktionsmix und 1 µl iScript Reverse Transkriptase zugegeben und die Komponenten gemischt. In einem Thermocycler erfolgte dann die Inkubation nach folgendem Protokoll:

- 5 min bei 25°C
- 30 min bei 42°C
- 5 min bei 85°C.

Die fertigen cDNA-Proben wurden bei -20°C gelagert.

Als Kontrolle wurde für jede Probenreihe auch eine sog. Minus-RT-Probe, d.h. eine Probe, bei der das Enzym Reverse Transkriptase durch Wasser ersetzt wird, angefertigt. Mit Hilfe einer Minus-RT-Probe kann bei der quantitativen PCR eine Verunreinigung der cDNA-Probe mit chromosomaler DNA detektiert werden.

2.2.14 Echtzeit-PCR

Die Methode der Echtzeit-PCR wurde angewendet, um den Anteil einer bestimmten mRNA in einer Gesamt-RNA-Probe semiquantitativ zu erfassen. Dazu wurden die aus der Gesamt-RNA hergestellten cDNA-Proben (Kapitel 2.2.13) für die PCR-Reaktion eingesetzt.

Für die Echtzeit-PCR wird zunächst die zu untersuchende mRNA in einer reversen Transkription in die entsprechende cDNA umgeschrieben. Diese wird dann in einer Polymerasekettenreaktion amplifiziert. Die Besonderheit bei der hier angewendeten Form der Echtzeit-PCR besteht in der Verwendung eines fluoreszierenden Farbstoffes, SYBR Green, der an doppelsträngige DNA bindet. Ungebundener Farbstoff zeigt in Lösung keine nennenswerte Fluoreszenz. Diese wird erst bei der Bindung des Farbstoffs an DNA-Doppelstränge emittiert [Bustin, 2000]. Mit steigender Zahl der Amplifikationszyklen und damit von neu gebildeten Doppelsträngen erhöht sich auch die Fluoreszenz der gemessenen Probe. Je höher die Zahl der in der Ausgangsprobe bereits vorhandenen Doppelstränge ist, desto weniger Zyklen werden benötigt, bis die Fluoreszenz einen Schwellenwert erreicht, der signifikant über dem Hintergrund liegt [Gibson et al., 1996]. Dieser sog. CT-Wert („cycle-threshold“) für den betreffenden Amplifikationszyklus tritt immer während der exponentiellen Phase der Amplifikation auf [Bustin, 2000].

Es gibt zwei Quantifizierungsstrategien für die Echtzeit-PCR. Die absolute Quantifizierung wird anhand einer gegebenen Kalibrierkurve durchgeführt, für die eine Verdünnungsreihe von RT-PCR-Produkten benötigt wird [Pfaffl und Hageleit, 2001]. Bei der für die hier gezeigten Versuche angewendeten relativen Quantifizierung wird die Expression eines Zielgens auf ein nicht reguliertes Haushaltsgen bezogen. Man nennt dies auch Normalisierung der Expressionsergebnisse [Rasmussen, 2001].

Durchführung

Da es sich bei der Echtzeit-PCR um eine äußerst sensitive und damit für Kontaminationen anfällige Methode handelt, wurden diverse Vorkehrungen getroffen, die eine Kontamination verhindern sollten. Es wurde an einem gesonderten Arbeitsplatz mit einem separaten

Pipettensatz gearbeitet, außerdem wurden ausschließlich sterile Pipettenspitzen mit Filtereinsatz, autoklavierte Reaktionsgefäße und autoklaviertes Wasser verwendet.

Zunächst wurden die benötigten Mengen aller Reagenzien sorgfältig berechnet. Für jede Reaktion wurde ein Duplikat geplant. Aus 10x PCR-Puffer, dNTPs und Magnesiumchlorid wurde eine 2x Stocklösung hergestellt, die bei -20°C bis zum Gebrauch gelagert werden konnte. Dazu wurden pro PCR-Reaktion folgende Mengen zu einem Endvolumen von 9,67 µl gemischt:

Tabelle 11: 2x Stammlösung für die Echtzeit-PCR

	Volumen	Endkonzentration in 20 µl Reaktionsansatz
10x PCR-Puffer	2 µl	1x
25 mM MgCl ₂	0,8 µl	2,5 mM
25 mM dNTPs	0,16 µl	0,2 mM
H ₂ O	6,71 µl	

Zu dieser Mischung wurden dann unmittelbar vor Gebrauch die entsprechenden Volumina der Heißstart-Taq-DNA-Polymerase und des Fluorophors SYBR Green gegeben, und zwar zu einem Endvolumen von 10 µl pro Reaktion:

Tabelle 12: Zugabe von Heißstart-Taq-Polymerase und SYBR Green zur 2x Stammlösung

	Volumen	Endkonzentration in 20µl Reaktionsansatz
2x Stammlösung	9,67 µl	
5 U/µl Heißstart-Taq-DNA-Polymerase	0,08 µl	0,4 U/Reaktion
1:500.000 SYBR Green	0,25 µl	1:40.000.000

Im nächsten Schritt wurden für jede cDNA-Probe in einem autoklavierten Reaktionsgefäß die fertige 2x Stammlösung, Wasser und cDNA zu einem Endvolumen von 15 µl pro Reaktion gemischt. Die Zugabe der Primermischung erfolgte aus Gründen der Probenhandhabung erst später (siehe unten).

Tabelle 13: Reaktionsansatz für die Echtzeit-PCR

	Volumen	Endkonzentration in 20µl Reaktionsansatz
2x Stammlösung mit Polymerase und SYBR Green	10 µl	1x
H ₂ O	4,8 µl	
1 µg RNA/20 µl äquivalente cDNA	0,2 µl	10 ng/Reaktion
1,6 µM Vorwärts- und Rückwärts-Primer	5 µl	400 nM

Ein speziell für diesen Zweck hergestellter Aluminiumblock wurde auf Eis gekühlt und die benötigte Zahl von 0,2 ml-Reaktionsgefäßen oder 0,1 ml-Röhrchen in ihre Halterungen gestellt. Je 15 µl Reaktionsansatz ohne Primer wurden in die Gefäße pipettiert, dann wurden 5 µl der Mischung aus 1,6 µM Vorwärts-Primer und 1,6 µM Rückwärts-Primer zugegeben. Danach wurden die das Gesamtvolumen von 20 µl enthaltenden Gefäße verschlossen und in den Rotor des Echtzeit-Thermocyclers positioniert. Folgendes Protokoll wurde gestartet:

Tabelle 14: Protokoll für die Echtzeit-PCR

	Wiederholungen	Temperatur	Zeit	Messung der Fluoreszenz
Aktivierung Heißstart- Taq-DNA-Polymerase		95°C	15 min	nein
Amplifikation	40	95°C 60°C	15 s 1 min	nein ja
Schmelzkurve		60-95°C in 0,5°C-Schritten	je 5 s	ja

Auswertung

Nach Ablauf des Programms konnten die Proben zur Kontrolle der Größe des Amplikons auf ein Agarosegel aufgetragen werden (siehe Kapitel 2.2.1). Die vom Echtzeit-Thermocycler erfassten Rohdaten wurden mit der zugehörigen Rotor-Gene-Software analysiert. Die dabei für jede einzelne Reaktion bestimmten CT-Werte wurden für die weitere Auswertung mit einem Tabellenkalkulationsprogramm genutzt. Bei dieser wurde nach folgender Formel der relative Gehalt der Probe an einer bestimmten mRNA berechnet:

$$2^{(CTn-CTx)} * 10.000.$$

Dabei steht „CTn“ für den CT-Wert der Reaktion, bei der die cDNA-Probe zur Normalisierung mit einem Primerpaar für ein Haushaltsgen amplifiziert wurde. „CTx“ steht für den CT-Wert der Reaktion, bei der die Probe mit einem Primerpaar für das Zielgen amplifiziert wurde.

Die Zahl „2“ ergibt sich aus der theoretischen Verdopplung der Anzahl von cDNA-Molekülen in jedem Amplifikationszyklus. Sie kann jedoch auch durch einen Amplifikationswert, der sich ebenfalls für jede Reaktion mit Hilfe der Rotor-Gene-Software bestimmen lässt, ersetzt werden. Dieser Wert schwankt mit der Qualität der verwendeten Primerpaare und sinkt bei schlecht gewählten Primerpaaren ab [Pfaffl, 2001]. Da alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide sorgfältig ausgewählt und vor dem eigentlichen Versuch auf ihre Qualität getestet wurden, konnte mit der idealisierten „2“ gerechnet werden. Bei der Zahl „10.000“ handelt es sich um einen willkürlich gewählten Multiplikationsfaktor, der es ermöglichen sollte, den berechneten relativen mRNA-Gehalt in den meisten Fällen in Werten größer 1 auszudrücken.

Um die Auswertung abzuschließen, wurden noch die Mittelwerte und Standardabweichungen der doppelt angesetzten Reaktionen berechnet und in einem Diagramm graphisch dargestellt.

2.2.15 RNase-Protection-Assay

Beim RNase-Protection-Assay wird eine Gesamt-RNA-Probe mit einer radioaktiv markierten RNA-Sonde, die komplementär zu einer zu untersuchenden mRNA ist, hybridisiert. Bei einem anschließenden Verdau mit RNasen werden alle RNA-Einzelstränge degradiert, ausschließlich die durch Hybridisierung mit der komplementären Sonde entstandenen Doppelstränge bleiben erhalten und können nach Auftrennung auf einem Acrylamid-Sequenziergel und Exposition eines Röntgenfilms detektiert werden. Dabei ist die Schwärzung des Films ein Maß für die Menge der mRNA.

Herstellung der Sonden-DNA

Bei der *in vitro*-Transkription werden unter Einsatz von RNA-Polymerasen DNA-Sonden in RNA transkribiert. Es kann, angepasst an den der Sonden-Sequenz im Plasmid benachbarten Promotor, T3- oder T7-RNA-Polymerase verwendet werden. Das Ende der DNA-Sonde ist durch eine Restriktionsstelle festgelegt, an der das Plasmid zuvor geschnitten wurde, und bei deren Erreichen die RNA-Polymerase somit abfällt.

Zunächst wurden die Plasmide mit den DNA-Inserts für die Sonden mit dem entsprechenden Restriktionsenzym verdaut. Anschließend erfolgte eine Inaktivierung des Enzyms mit Proteinase K und deren Extraktion mit Phenol/Chloroform. Dann wurde die DNA mit Ethanol präzipitiert und die Pellets in RNase-freiem Wasser in einer Konzentration von 0,5 µg/µl gelöst.

In vitro-Transkription

Die folgenden Arbeiten wurden wegen des Einsatzes von α -³²P-UTP ausschließlich im Isotopenlabor durchgeführt. Das für verschiedene Arbeitsschritte benötigte Wasser war zuvor autoklaviert worden, um Nukleasen zu denaturieren.

Unten gezeigter Ansatz wurde für die *in vitro*-Transkription zu einem Gesamtvolumen von 25 µl gemischt:

Tabelle 15: Reaktionsansatz für *in vitro*-Transkription

	Volumen	Endkonzentration
10x T3/T7-Puffer	2,5 µl	1x
2,5 mM (ACG)TP	10 µl	1 mM
50 µM UTP	1,25 µl	2,5 µM
40 U/µl RNasin	1 µl	1,6 U/µl
α - ³² P-UTP	5 µl	
0,5 µg/µl Sonden-DNA	2 µl	40 ng/l
20 U/µl RNA-Polymerase	2 µl	1,6 U/µl
H ₂ O	1,25 µl	

Abweichend von obigem Reaktionsansatz wurden für die rRNA-Sonde 1,25 µl von 2 mM UTP eingesetzt, was einer Endkonzentration von 0,1 mM entspricht.

Der fertige Reaktionsansatz wurde 2 h bei 37°C auf dem Heizblock inkubiert. Dann wurden dem Ansatz 20 U DNase I zugefügt und für weitere 15 min bei 37°C inkubiert, um die nach der Transkription nicht mehr benötigte DNA zu degradieren. Nach Ablauf der Zeit wurde mit Nuklease-freiem Wasser auf 75 bis 100 µl aufgefüllt. 1 µl des Ansatzes wurde zurückbehalten, der Rest wurde über ein Mikro-Säulchen zentrifugiert. Dafür wurde das Säulenmaterial zunächst aufgeschüttelt und dann 1 min bei 2.700 rpm abzentrifugiert. Dann wurde die Sonde auf das Säulenmaterial pipettiert, es folgte eine Zentrifugation für 2 min bei 2.700 rpm. Die zurückbehaltene unzentrifugierte Sonde und 1 µl der zentrifugierten Sonde wurden jeweils in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß pipettiert. Diese wurde dann in ein Szintillationsröhrchen gesteckt. Die radioaktive Strahlung der beiden Proben wurde dann für 1 min an einem Szintillationszähler bestimmt. Nun wurden die zentrifugierten Sonden mit Hybridisierungspuffer auf $1,5 \times 10^4$ cpm/µl eingestellt.

Hybridisierung

In Vorbereitung auf die Hybridisierung wurden von jeder Gesamt-RNA-Probe 5 µg pro Sonde durch Vakuumzentrifugation lyophilisiert. Eine Ausnahme bildeten Proben, die mit einer 18S rRNA-Sonde hybridisiert werden sollten. Von diesen wurden nur 50 ng lyophilisiert.

Auch später als Kontrolle eingesetzte tRNA (je Sonde 2 Ansätze) wurde auf die gleiche Weise eingetrocknet.

Die lyophilisierten Gesamt-RNA-Proben und tRNAs wurden nun in je 30 µl verdünnter Sonden-RNA gelöst und für 5 min bei 85°C auf dem Heizblock denaturiert. Dann wurde über Nacht bei 45°C hybridisiert.

RNase-Verdau

Am nächsten Tag wurden 350 µl RNase-Puffer zu den hybridisierten Proben gegeben. Je ein tRNA-Ansatz pro Sonde erhielt RNase-Puffer ohne RNasen. Für den Verdau wurde 45 min bei 30°C auf dem Heizblock inkubiert. Anschließend wurden die RNasen durch Zugabe einer Mischung aus 10 µl 20%-igen SDS und 5 µl 10 mg/ml Proteinase K und 15-minütige Inkubation bei 37°C auf dem Heizblock wieder inaktiviert.

Fällung

Zur Reinigung der RNA wurden anschließend 800 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) zugegeben. Dann wurde durch Vortexen gemischt und 10 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. 350 µl der wässrigen Phase wurden in eine Mischung aus 1 ml Ethanol, 35 µl 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 1 µl Hefe-tRNA gegeben und zur Fällung gemischt. Es folgte eine Zentrifugation bei 14.000 rpm für 45 min. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und das Pellet an der Luft getrocknet.

Gelelektrophorese

Vor dem Zusammensetzen der Elektrophorese-Apparatur mussten die verwendeten Glasplatten sorgfältig gereinigt und anschließend silanisiert werden, damit sich beim Gießen des Gels keine Luftblasen bilden. Dazu wurden 2 ml Silan auf einer Glasplatte verrieben und für 15 min an der Luft getrocknet. Dann wurde die Apparatur zusammengebaut und das

4%ige Acrylamid-Sequenziergel absolut luftblasenfrei gegossen. Die Pufferkammer der Apparatur wurde mit 1x TBE befüllt.

Die luftgetrockneten RNA-Pellets wurden in 20 µl RNA-Ladepuffer gelöst und 5 min zur Denaturierung bei 85°C auf einem Heizblock inkubiert. Je 3 bis 5 µl je Probe wurden dann auf das Gel aufgetragen und bei 2.500 V für 1,5 h aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel auf Whatman-Papier gelegt, mit Haushaltsfolie abgedeckt und 3 h unter Vakuum getrocknet. Dann wurde über Nacht ein Röntgenfilm aufgelegt, der am nächsten Tag entwickelt wurde (siehe Kapitel 2.2.11).

Auswertung

Der Röntgenfilm wurde eingescannt. Anschließend wurde mit Hilfe eines Computerprogramms die Schwärzung der entsprechenden Banden quantifiziert und verglichen.

3. Ergebnisse

3.1 Nähere Charakterisierung des wachstumsinhibierenden Effekts von LMX1B

Die Synthese von LMX1B übt einen wachstumsinhibierenden Effekt auf die entsprechende Zelle aus. So zeigen induzierte HtTA-1/myc-LMX1B-Zellen, die LMX1B überexprimiert produzieren, ein gegenüber nicht induzierten Zellen vermindertes Wachstum. Dies konnte in einem Laktatdehydrogenase-Aktivitätstest gezeigt werden [Prestel, 2003]. Das Wachstum von Zellen wird zum einen durch ihre Zellteilungsrate, zum anderen durch ihre Absterberate bestimmt. Aufgrund ausnahmslos negativer Ergebnisse aus FACS-Analyse, Hoechst-Färbung und DNA-Leiter [Prestel, 2003] sowie TUNEL/FITC-Färbung und immunzytochemischem Nachweis von Caspase-3 [Kastner, 2004] kann eine erhöhte Apoptoserate als Ursache des verminderten Wachstums mittlerweile ausgeschlossen werden. Eine mittels FACS-Analyse bei den induzierten, LMX1B-produzierenden HtTA-1-Zellen ermittelte Verschiebung des Zellzyklus hin zur G_0/G_1 -Phase [Prestel, 2003] spricht dafür, dass LMX1B den Zellzyklus beeinflusst. Dies wird auch durch die Resultate einer Genexpressionsanalyse gestützt, in der induzierte mit nicht induzierten HtTA-1/myc-LMX1B-Zellen verglichen wurden. Hier zeigte sich u.a., dass LMX1B die Expression von Genen beeinflusst, deren Produkte eine Rolle bei der Regulation von Zellzyklus und Zellwachstum spielen. So war die Synthese von mRNA für den Cdk-Inhibitor 1A (p21/Cip1) erhöht, die von mRNA für Cyclin B1 und für das an der Verdopplung des Zentrosoms während des Zellzyklus beteiligte Nucleophosmin vermindert [Prestel, 2003]. Keinen oder nur einen äußerst geringen Effekt auf das Wachstum von HtTA-1-Zellen besitzen, wie der Laktatdehydrogenase-Aktivitätstest zeigte, ein LMX1B-Protein mit einer Punktmutation in der LIM2-Domäne (C95F) [Kastner, 2004] und ein LMX1B-Protein, dem beide LIM-Domänen fehlen (Δ LIM1+2) [Prestel, 2003]. Letzteres verursachte auch keine Verschiebung des Zellzyklus. Dies bedeutet erstens, dass es sich bei der Wachstumsinhibition nicht um einen generell durch Überexpression eines Gens ausgelösten, unspezifischen Effekt handelt. Zweitens weisen diese Daten den für die Interaktion mit anderen Proteinen wichtigen LIM-Domänen, speziell der LIM2-Domäne, eine wichtige Rolle bei der Beeinflussung des Zellzyklus durch LMX1B zu.

3.1.1 Im Gegensatz zur LIM2-Domäne ist die LIM1-Domäne nicht essentiell für den wachstumsinhibierenden Effekt von LMX1B

Nun sollte getestet werden, ob auch die LIM1-Domäne essentiell für die Vermittlung des wachstumsinhibierenden Effekts von LMX1B ist. Dazu wurde ein Laktatdehydrogenase-Aktivitätstest mit HtTA-1/myc-LMX1B (Δ LIM1)-Zellen durchgeführt, deren Produktion des mutierten Proteins durch Doxyzyklin im Medium gesteuert wurde. Um einen klonalen Effekt ausschließen zu können, wurden zwei Klone dieser Mutante für das Experiment verwendet. Als Negativkontrolle dienen HtTA-1-Zellen, als Positivkontrolle der Wildtyp-Klon HtTA-1/myc-LMX1B #12, für den die Wachstumsinhibition bereits gezeigt worden war [Prestel, 2003]. Das Experiment wurde zweimal jeweils mit Dreifachbestimmungen durchgeführt. Für die Darstellung in Abbildung 2 wurde der Mittelwert beider Experimente ($n = 6$) verwendet.

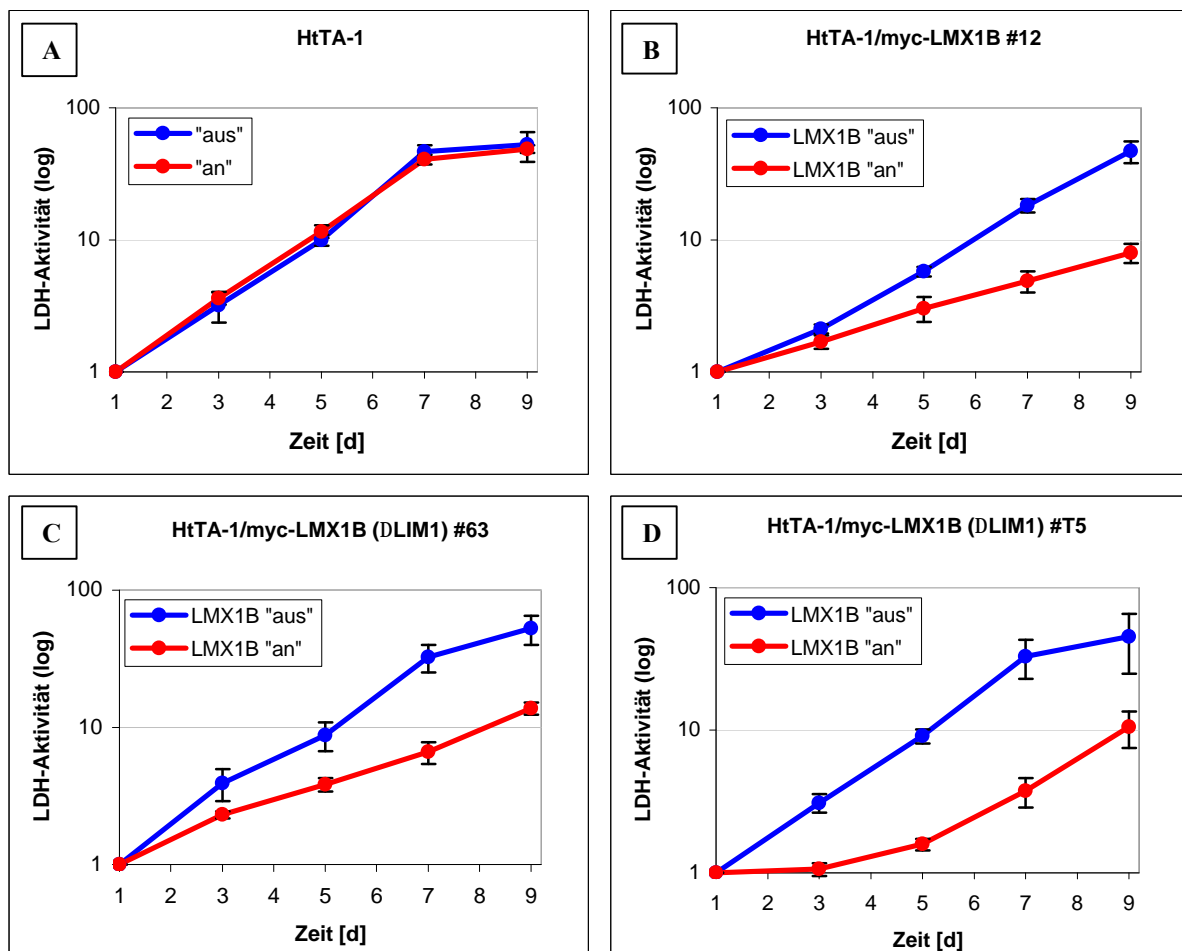


Abbildung 2: Darstellung des mit Hilfe eines Laktatdehydrogenase-Aktivitätstests ermittelten Wachstumsverhaltens verschiedener HtTA-1-Klone. HtTA-1- (A), HtTA-1/myc-LMX1B- (B) und zwei

Klone von HtTA-1/myc-LMX1B (Δ LIM1)-Zellen (C und D) wurden zunächst drei Tage lang mit 100 ng/ml Doxyzyklin (LMX1B „aus“) oder ohne Doxyzyklin (LMX1B „an“) kultiviert, dann abgelöst und mit 18.000 Zellen/Schale mit oder ohne Doxyzyklin im Medium ausgesät (Tag 0). Dort wuchsen sie für die angegebene Zeitdauer (1 bis 9 Tage) und wurden anschließend lysiert. Für den Laktatdehydrogenase-Aktivitätstest wurden 20 μ l Lysat mit 200 μ l Arbeitslösung gemischt und die Absorption bei 340 nm nach 20 min und 45 min gemessen. Die Differenz dieser beiden Werte ist der LDH-Aktivität direkt proportional, welche wiederum der Zellzahl direkt proportional ist. Gezeigt sind die Mittelwerte zweier Experimente, d.h. sechs gleich behandelte Schalen. Sowohl die den LMX1B-Wildtyp als auch die die Deletionsmutante produzierenden Zellen zeigten verlangsamtes Wachstum.

HtTA-1-Zellen wurden ausschließlich mit dem tetrazyklin-kontrollierten Transaktivator (tTA) transfiziert. Ihnen fehlen der Tetrazyklin-Operator (tetO) als zweite Komponente des Tet-off-Systems und der Minimalpromotor mit dahinter fusionierter LMX1B-cDNA. Ihr Wachstum zeigte sich daher unbeeinflusst von der Verwendung von Doxyzyklin.

Bei den mit allen Komponenten stabil transfizierten HtTA-1/myc-LMX1B-Zellen wuchsen diejenigen langsamer, die in Medium ohne Doxyzyklin gezogen wurden und somit das LMX1B-Wildtyp-Protein synthetisierten. Dies ist der bereits gezeigte wachstumshemmende Effekt von LMX1B [Prestel, 2003]. Er zeigte sich auch bei den beiden Klonen der HtTA-1/myc-LMX1B (Δ LIM1)-Mutante. Sowohl die Zellen von Klon #63 als auch die von Klon #T5 wuchsen in Abwesenheit von Doxyzyklin, wenn sie das LMX1B (Δ LIM1)-Protein synthetisierten, deutlich langsamer, als wenn die Synthese durch Doxyzyklin unterdrückt wurde. Die LIM1-Domäne von LMX1B scheint demnach im Gegensatz zur LIM2-Domäne für den wachstumshemmenden Effekt des Proteins nicht von wesentlicher Bedeutung zu sein.

Um die LMX1B-Synthese der für den Laktatdehydrogenase-Aktivitätstest verwendeten Klone miteinander zu vergleichen, wurden Lysate der HtTA-1-, HtTA-1/myc-LMX1B #12-, HtTA-1/myc-LMX1B (Δ LIM1) #63- und HtTA-1/myc-LMX1B (Δ LIM1) #T5-Zellen in einer SDS-PAGE aufgetrennt und c-Myc-LMX1B mit einer Western-Blot-Analyse nachgewiesen.

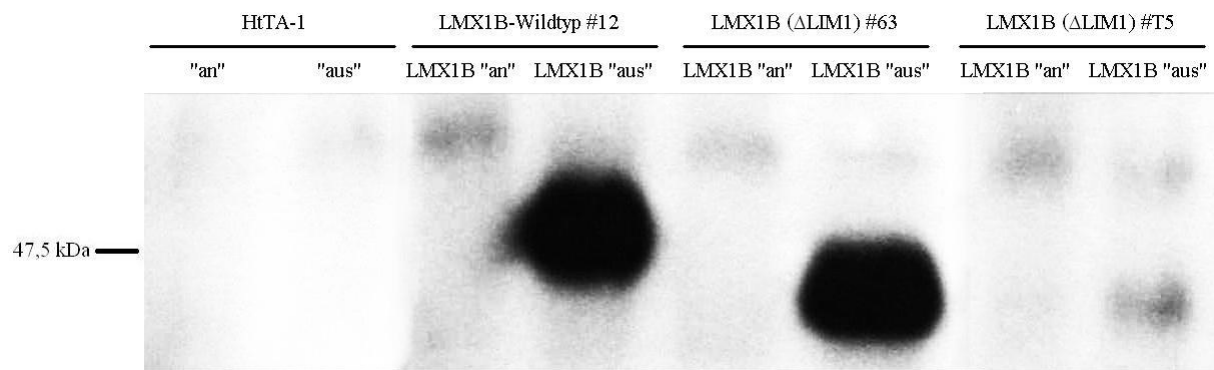


Abbildung 3: Expression des LMX1B-Proteins (Wildtyp bzw. Δ LIM1-Mutante) der für den Laktatdehydrogenase-Aktivitätstest verwendeten Zellen. HtTA-1-, HtTA-1/myc-LMX1B- (Klon #12) und HtTA-1/myc-LMX1B (Δ LIM1)-Zellen (Klon #63 und #T5) wuchsen fünf Tage in Medium mit (LMX1B „aus“) oder ohne 100 ng/ml Doxzyklin (LMX1B „an“). Dann wurden sie mit einem Zellschaber abgelöst und mit RIPA-Puffer lysiert. Je 25 μ g Protein wurden auf einem 8%-igen SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. In der anschließenden Western-Blot-Analyse wurde LMX1B mit dem 9E10- und einem HRP-gekoppelten Anti-Maus-IgG-Antikörper detektiert. Der Wildtyp- und ein Deletionsmutanten-Klon produzierten vergleichbare Mengen des LMX1B-Proteins, der zweite Mutanten-Klon eine geringere Menge.

Der Röntgenfilm in Abbildung 3 dokumentiert die Stärke der LMX1B-Produktion der verschiedenen Zellklone. HtTA-1-Zellen produzierten naturgemäß kein c-Myc-LMX1B-Protein, das sich durch den 9E10-Antikörper nachweisen ließe. Das c-Myc-LMX1B-Wildtyp-Protein, das von den HtTA-1/myc-LMX1B-Zellen synthetisiert wurde, besitzt eine errechnete Masse von 45 kDa. Die von den beiden HtTA-1/myc-LMX1B (Δ LIM1)-Klonen produzierte mutierte Form von LMX1B, der die LIM1-Domäne fehlt, hat eine errechnete Masse von 38 kDa. Der Wildtyp-Klon und Klon #63 der Mutante wiesen eine vergleichbare Synthese des LMX1B-Proteins auf. Klon #T5 der Mutante zeigte, auch wenn die Proteinmenge deutlich geringer war als bei Klon #63, ebenfalls eine signifikante Produktion. Diese schien für die wachstumshemmende Wirkung des Proteins jedoch stets ausreichend zu sein.

Die Expression des Klons #T5 war immer schwächer als die des Klons #63 oder des Wildtyp-Klons. Leider ist es auch nach wiederholten Versuchen nicht gelungen, einen Klon mit vergleichbarer stabiler Expression von LMX1B (Δ LIM1) herzustellen. Dabei handelt es sich um ein generelles Problem bei der stabilen Transfektion von HtTA-1-Zellen mit verschiedenen LMX1B-Konstrukten. Es scheint ebenfalls auf den wachstumshemmenden Effekt von LMX1B zurückzugehen, der für den Teil der Zellen, die das Konstrukt bei der Transfektion integriert haben, in der Gesamtpopulation einen Selektionsnachteil darstellen muss.

3.1.2 Bei LMX1B-produzierenden Zellen befindet sich ein geringerer Anteil in der S-Phase des Zellzyklus

Mit Hilfe einer FACS-Analyse wurden bereits Veränderungen im Zellzyklus von induzierten, also das LMX1B-Protein überexprimiert synthetisierenden, HtTA-1/myc-LMX1B-Zellen dokumentiert [Prestel, 2003]. Dabei wurde festgestellt, dass sich gegenüber den nicht induzierten Zellen ein geringerer Anteil der gemessenen Population in der S- und der G₂/M-Phase, dafür aber ein signifikant größerer Anteil in der G₀/G₁-Phase des Zellzyklus befand.

Bei der G₀-Phase (englisch „gap“ = Lücke) handelt es sich um ein Ruhestadium der Zelle, in dem sie den Zyklus für unbestimmte Zeit stoppt. In der G₁-Phase zwischen M-Phase (Mitose-Phase) und DNA-Synthese (S-Phase) mit anschließender G₂-Phase prüft die Zelle ihre Umgebung und ihre eigene Größe, bevor sie zu geeigneter Zeit den Teilungszyklus fortsetzt [Übersicht bei Alberts et al., 1995]. Die Verschiebung des Zellzyklus hin zu den Pausenphasen G₀ und G₁ gibt somit Hinweise auf die möglichen Ursachen der durch LMX1B verursachten Wachstumsinhibition.

Um den oben genannten Befund durch eine zweite Methode abzusichern, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Inkorporation des Thymidin-Analogs Bromodesoxyuridin (BrdU) während der S-Phase zur Bestimmung der Teilungsrate verwendet. In einer immunzytochemischen Analyse kann das BrdU spezifisch durch Antikörper nachgewiesen und mit einem fluoreszierenden Sekundärantikörper sichtbar gemacht werden. Sollten sich die Ergebnisse der FACS-Analyse [Prestel, 2003] bestätigen und sich von den LMX1B-produzierenden, induzierten Zellen eine geringere Anzahl in der S-Phase befinden als von den nicht induzierten Zellen, müsste das Resultat dieses Versuchs eine geringere Anzahl BrdU-positiver Zellen sein.

Für das Experiment wurden HtTA-1- und HtTA-1/myc-LMX1B-Zellen (Klon #34) vier Tage lang kultiviert und dann einem 30-minütigen BrdU-Puls ausgesetzt. Nach der anschließenden Immunzytochemie und Kernfärbung wurde der Anteil der sich zum Zeitpunkt der Inkubation mit BrdU in der S-Phase befindenden Zellen bestimmt. Für jede Bedingung wurden mindestens 1.000 Zellkerne betrachtet, das Experiment wurde zweimal wiederholt.

Abbildung 4 zeigt exemplarisch digitale Fotografien von HtTA-1-Zellen, die mit BrdU inkubiert und dann dessen immunzytochemischem Nachweis und einer Kernfärbung mit Hoechst 33258 unterzogen worden waren.

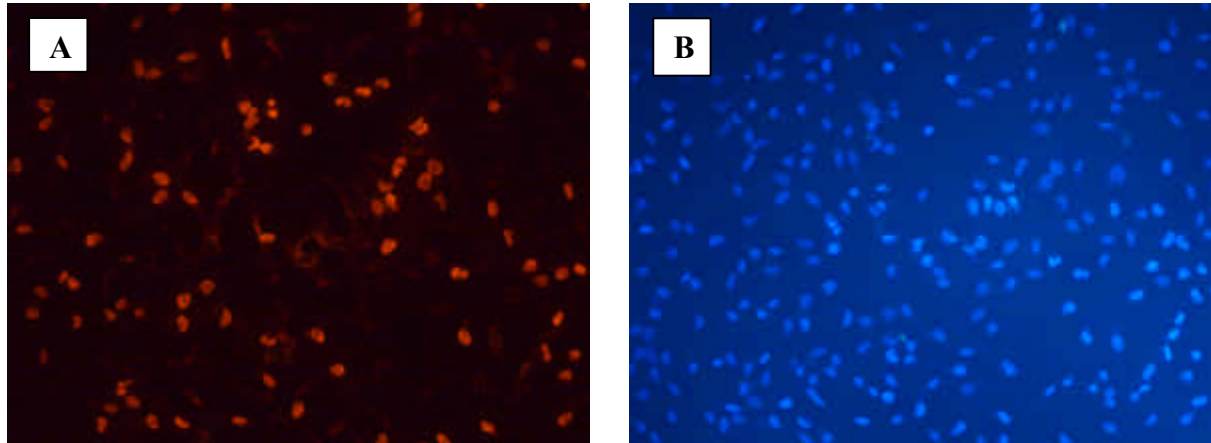


Abbildung 4: Anti-BrdU-Färbung von Zellen in der S-Phase und Kernfärbung mit Hoechst 33258. HtTA-1-Zellen wuchsen 4 Tage auf Glasplättchen in Kulturmedium mit 100 ng/ml Doxyzyklin. Unmittelbar vor der Immunzytochemie wurde dem Medium 3 mg/ml Bromodesoxyuridin zugegeben und für 30 min inkubiert. (A) Das von Zellen in der S-Phase in die DNA eingebaute BrdU wurde mit einem Anti-BrdU-Antikörper und einem Cy3-gekoppelten Anti-Maus-IgG-Sekundärantikörper detektiert. (B) Durch die anschließende Kernfärbung mit Hoechst 33258 wurden alle Zellkerne dargestellt

Während alle Zellkerne dieses Bildausschnitts mit der blau fluoreszierenden Substanz Hoechst 33258 angefärbt wurden, weist nur ein kleinerer Teil der Kerne auch eine rote Fluoreszenz durch den BrdU-Nachweis auf. Lediglich diese BrdU-positiven Zellen befanden sich zum Zeitpunkt des Pulses in der S-Phase des Zellzyklus und konnten das Thymidin-Analog in ihre neu synthetisierte DNA einbauen. Die BrdU-negativen Zellen befanden sich in einer der anderen Phasen des Zyklus.

In Tabelle 16 sind die Ergebnisse der drei zur Bromodesoxyuridin-Inkorporation durchgeführten Experimente gezeigt. Es sind jeweils die Gesamtzellzahl (Hoechst 33258-gefärbte Kerne), die absolute Zahl der BrdU-positiven Zellen unter diesen, der prozentuale Anteil der BrdU-positiven Zellen und das Verhältnis von BrdU-Anteil bei induzierten Zellen zu BrdU-Anteil bei nicht induzierten Zellen angegeben.

A Experiment 1	HtTA-1 „aus“	HtTA-1 „an“	LMX1B „aus“	LMX1B „an“
Zellen gesamt	1395	1322	1375	1343
BrdU-positive Zellen	473	469	494	351
Anteil BrdU-positiver Zellen [%]	33,9	35,5	35,9	26,1
Verhältnis „an“/„aus“	1,05		0,73	

B Experiment 2	HtTA-1 „aus“	HtTA-1 „an“	LMX1B „aus“	LMX1B „an“
Zellen gesamt	1506	1523	1676	1261
BrdU-positive Zellen	541	594	784	516
Anteil BrdU-positiver Zellen [%]	35,9	39,0	46,8	40,9
Verhältnis „an“/„aus“	1,09		0,87	

C Experiment 3	HtTA-1 „aus“	HtTA-1 „an“	LMX1B „aus“	LMX1B „an“
Zellen gesamt	1012	1003	1002	1001
BrdU-positive Zellen	291	291	343	311
Anteil BrdU-positiver Zellen [%]	28,8	29,0	34,2	31,1
Verhältnis „an“/„aus“	1,01		0,91	

Tabelle 16: Einzelexperimente zur Bestimmung des Anteils BrdU-positiver Zellen an Populationen von HtTA-1- und HtTA-1/myc-LMX1B-Zellen. HtTA-1-Zellen und ein stabil mit der cDNA für den LMX1B-Wildtyp transfizierter Klon wurden 4 Tage auf Glasplättchen in Medium mit 100 ng/ml Doxyzyklin („aus“) und Medium ohne Doxyzyklin („an“) kultiviert. Nach abschließender 30-minütiger Inkubation mit 3 mg/ml Bromodesoxyuridin wurden eine Immunzytochemie mit Anti-BrdU-Antikörper und Cy3-gekoppeltem Sekundärantikörper sowie eine Kernfärbung mit Hoechst 33258 durchgeführt. Am Fluoreszenzmikroskop wurden jeweils mindestens 1.000 Hoechst 33258-gefärbte Kerne und die BrdU-positiven Kerne unter diesen gezählt. Das Experiment wurde dreimal durchgeführt (A, B und C). Bei den LMX1B-produzierenden Zellen war der Anteil BrdU-positiver Kerne in allen drei Einzelexperimenten geringer als bei denen mit abgeschalteter LMX1B-Produktion.

Bei den HtTA-1-Zellen, die als Kontrolle für Zählungenauigkeiten und etwaige Nebeneffekte von Doxyzyklin mitgeführt wurden, lag der Anteil BrdU-positiver Zellen bei den mit und ohne Doxyzyklin gewachsenen Proben relativ eng beieinander. Die ohne Doxyzyklin gewachsenen Zellen zeigten dabei mit dem 1,05- 1,09- und 1,01-fachen stets den höheren Anteil. Bei den HtTA-1/myc-LMX1B-Zellen verhielt sich die Tendenz entgegengesetzt der bei HtTA-1-Zellen. Die ohne Doxyzyklin gewachsenen Zellen hatten hier mit dem 0,73-, 0,87- und 0,91-fachen den geringeren Anteil BrdU in ihre DNA eingebaut. Dieser hier beobachtete Unterschied fiel damit auch größer aus als der bei den HtTA-1-Zellen bestimmte.

Abschließend wurden die drei Einzelerperimente zusammengefasst, indem die Mittelwerte der Verhältnisse von BrdU-Anteil bei Zellen ohne Doxyzyklin zu BrdU-Anteil bei Zellen mit Doxyzyklin berechnet wurden. Hierbei ergaben sich der Faktor 1,05 bei den HtTA-1-Zellen und der Faktor 0,82 bei den HtTA-1/myc-LMX1B-Zellen. Abbildung 5 zeigt eine graphische Darstellung der Verhältnisse.

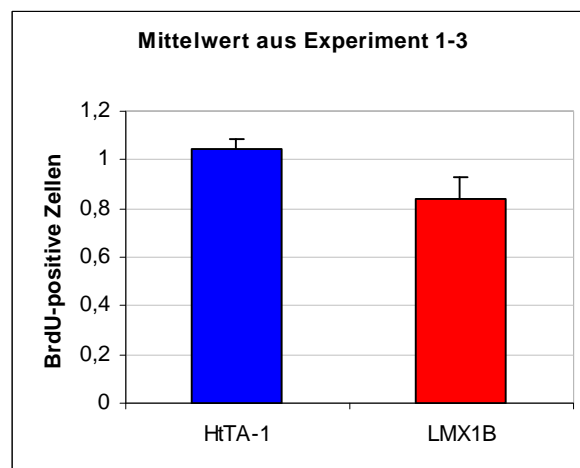


Abbildung 5: Zusammenfassung der Ergebnisse aus Experiment 1 bis 3. Es wurden die Mittelwerte der jeweils berechneten Verhältnisse von BrdU-Anteil bei induzierten Zellen zu BrdU-Anteil bei nicht induzierten Zellen bestimmt. Auch die Gesamtauswertung zeigte den Unterschied zwischen Zellen mit aus- und angeschalteter LMX1B-Produktion.

Zum Zeitpunkt des BrdU-Pulses befanden sich demnach 18% weniger Zellen in der S-Phase des Zellzyklus, wenn die Zellen LMX1B überexprimiert produzierten, als wenn diese Produktion abgeschaltet war. Dies lässt auf eine geringere Teilungsrate der betreffenden Zellen schließen. Dieser Unterschied ist vielleicht umso stärker zu bewerten, als dass der bei der Kontrolle (HtTA-1-Zellen) festgestellte geringe Unterschied von 5% in die entgegengesetzte Richtung verläuft.

Das Ergebnis dieses Versuchs bestätigt somit die von Jürgen Prestel mittels FACS-Analyse festgestellten Veränderungen im Zellzyklus von LMX1B-produzierenden Zellen, auf die der wachstumshemmende Effekt von LMX1B wahrscheinlich zurückzuführen ist. Ein noch deutlicheres Ergebnis ließe sich vielleicht durch eine vorangehende Synchronisierung der Zellen z.B. durch Serumentzug und -puls vor der Inkubation mit BrdU erzielen. In den hier verwendeten, im Bezug auf ihre Zellzyklusphase gemischten Zellpopulationen befanden sich im Durchschnitt nur ca. 35% der Zellen zum Zeitpunkt des BrdU-Pulses in der S-Phase. Dieser Anteil könnte durch eine Synchronisierung deutlich erhöht und Unterschiede zwischen den verschiedenen Proben dadurch verstärkt sichtbar werden.

3.2 Analyse des Einflusses von LMX1B auf die differentielle Genexpression

Wie von Jürgen Prestel in seiner Dissertation beschrieben, wurde im Rahmen einer Kooperation mit dem Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) in Heidelberg bei *LMX1B*-überexprimierenden HtTA-1-Zellen eine Genexpressionsanalyse durchgeführt. Damit sollte untersucht werden, ob LMX1B seiner Definition als LIM-Homöodomäne-Transkriptionsfaktor gemäß [Hobert und Westphal, 2000] in diesen Zellen einen Einfluss auf die Expression anderer Gene nimmt.

Für die Analyse wurden HtTA-1/myc-LMXB-Zellen (Klon #12) 10 Tage lang in Medium mit 100 ng/ml Doxyzyklin oder zur Induktion der LMX1B-Synthese in Medium ohne Doxyzyklin kultiviert [genaues Protokoll siehe Prestel, 2003]. Aus den zum Zeitpunkt der Ernte maximal subkonfluenten Zellen wurde anschließend Gesamt-RNA isoliert und an das DKFZ weitergegeben, um dort zur Genexpressionsanalyse mittels cDNA-Array eingesetzt zu werden. Für die Arrays wurde zunächst die mRNA mit Oligo-dT-Primern und reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Diese wurde gleichzeitig mit α -³³P-dCTP radioaktiv markiert. Die markierten cDNA-Moleküle wurden dann mit Filtern, die insgesamt 75.000 verschiedene humane cDNAs – jede davon zweimal an verschiedenen Stellen – enthielten, hybridisiert. Für ein genaueres Ergebnis wurden die Hybridisierung und deren Auswertung wiederholt und beide Auswertungen für das Endergebnis gleichermaßen berücksichtigt.

Jürgen Prestel analysierte für seine Dissertation die Expression von Genen, deren Produkte eine wichtige Rolle bei der Regulation von Zellzyklus und Zellwachstum spielen. So zeigten die am DKFZ durchgeführten cDNA-Arrays eine Erhöhung der mRNA-Synthese des Cdk-Inhibitors p21 und eine Verminderung der mRNA-Synthese von Cyclin B1 und Nucleophosmin.

3.2.1 Die Expression von *p21* und mehreren Interferon-induzierten Genen ist in LMX1B-produzierenden Zellen erhöht

Für die vorliegende Arbeit wurden die Ergebnisse der Arrays erneut komplett gesichtet, um weitere potentielle Zielgene von LMX1B zu finden. Es wurden die Mittelwerte der durch

doppeltes Vorhandensein auf dem Filter und Wiederholung der Hybridisierung zustande gekommenen Vierfachwerte gebildet. Aus den Mittelwerten wurde dann die Rate der Erhöhung bzw. Verminderung der mRNA-Menge in den induzierten gegenüber den nicht induzierten Zellen berechnet und nach der Höhe der Werte sortiert. Zusätzlich wurden die untersuchten Gene, soweit möglich, in die Funktion oder Struktur betreffende Gruppen eingeteilt.

Dabei fiel bei den Genen mit erhöhter Expression neben dem bereits erwähnten *p21* vor allem eine Gruppe von neun Genen auf, die alle zu den sog. Interferon-stimulierten Genen (ISGs) gezählt werden. Ihre Expression war in LMX1B-synthetisierenden HtTA-1-Zellen zwischen 3,1- und 67,8-fach erhöht. In Tabelle 17 sind diese neun Gene und *p21* nach der Erhöhung ihrer Expressionsrate sortiert aufgelistet.

Gen	kodiertes Protein	Erhöhung [Faktor]
<i>GIP3</i>	Interferon-alpha-induzierbares Protein (Klon IFI-6-16)	67,8
<i>ISG15</i>	Interferon-stimuliertes Protein, 15 kDa	13,9
<i>IFIT1</i>	Interferon-induziertes Protein mit Tetratrikopeptid-Wiederholungen 1	9,7
<i>IFI44</i>	Interferon-induziertes Protein 44	8,4
<i>IFITM1</i>	Interferon-induziertes Transmembranprotein 1 (9-27)	8,3
<i>p21</i>	Cdk-Inhibitor p21	8,0
<i>IFITM3</i>	Interferon-induziertes Transmembranprotein 3 (1-8U)	4,8
<i>IFI16</i>	Interferon-gamma-induzierbares Protein 16	3,7
<i>IFITM2</i>	Interferon-induziertes Transmembranprotein 2 (1-8D)	3,1

Tabelle 17: *p21* und Interferon-stimulierte Gene, deren Expression in LMX1B-synthetisierenden Zellen erhöht war. HTtA1/myc-LMX1B-Zellen wuchsen 10 Tage in Medium ohne oder mit 100 ng/ml Doxozyklin. Aus ihnen wurde Gesamt-RNA isoliert, deren mRNA-Anteil danach in cDNA umgeschrieben und dabei gleichzeitig mit α -³³P-dCTP radioaktiv markiert wurde. Dann erfolgte eine Hybridisierung mit insgesamt 75.000 humanen cDNAs (jede doppelt) auf Filtern. Die Hybridisierung wurde einmal wiederholt. Mit den so erhaltenen Vierfachwerten wurde ein Verhältnis von induzierten zu nicht induzierten Zellen berechnet. Die Expression von neun Interferon-stimulierten Genen war in den LMX1B-überexprimierenden Zellen zwischen 3,1- und 67,8-fach, die des Gens für p21 8-fach erhöht.

Der Cdk-Inhibitor p21 wird hauptsächlich als negativer Regulator des Zellzyklus beschrieben [Sherr und Roberts, 1999]. Er kann sowohl an die Cyclin-abhängigen Kinasen Cdk2, Cdk3, Cdk4 und Cdk6 [Harper et al., 1995] als auch direkt an Cycline [Lin et al., 1996] binden und

die Cyclin-Cdk-Komplexe inhibieren. Da die Transkription seines Gens in LMX1B-synthetisierenden Zellen erhöht ist, könnte es sich bei ihm um einen Vermittler des wachstumsinhibierenden Effekts von LMX1B handeln.

Interessanterweise wird vielen Produkten von Interferon-stimulierten Genen ebenfalls ein negativer Einfluss auf das Zellwachstum zugeschrieben [de Veer et al., 2001]. So bindet IFI16 an p53 und beeinflusst dadurch die Expression von dessen an der Regulation des Zellzyklus beteiligten Zielgenen wie z.B. *p21* [Kwak et al., 2003]. Sein Verlust kann zur Entwicklung von Brustkrebs führen [Fujiuchi et al., 2004]. Möglicherweise wurden hier mit den in LMX1B-produzierenden Zellen induzierten ISGs weitere Vermittler der durch LMX1B ausgelösten Wachstumsinhibition gefunden.

3.2.2 Die Methode der RT-qPCR

Zunächst sollten die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse mit Hilfe einer zweiten Methode überprüft werden. Dafür standen der in diesem Labor seit langem etablierte RNase-Protection-Assay [siehe z.B. Rohr et al., 2002] und die neu eingeführte Methode der RT-qPCR zur Auswahl, mit denen die relative mRNA-Menge eines Gens in einer Gesamt-RNA-Probe durch reverse Transkription und darauf folgende Echtzeit-PCR bestimmt werden kann. Die RT-qPCR ist heute eine der gebräuchlichsten Methoden zur Quantifizierung von Genexpression. Sie ist über einen großen Bereich äußerst sensitiv und sequenzspezifisch und ermöglicht einen hohen Probendurchsatz [Wong und Medrano, 2005].

In Abbildung 6 ist exemplarisch die während der Amplifikationsphase aufgezeichnete Fluoreszenz einer Echtzeit-PCR gezeigt, mit der der relative Gehalt an LMX1B-mRNA in HtTA-1-Zellen mit ab- bzw. angeschalteter LMX1B-Produktion bestimmt worden war.

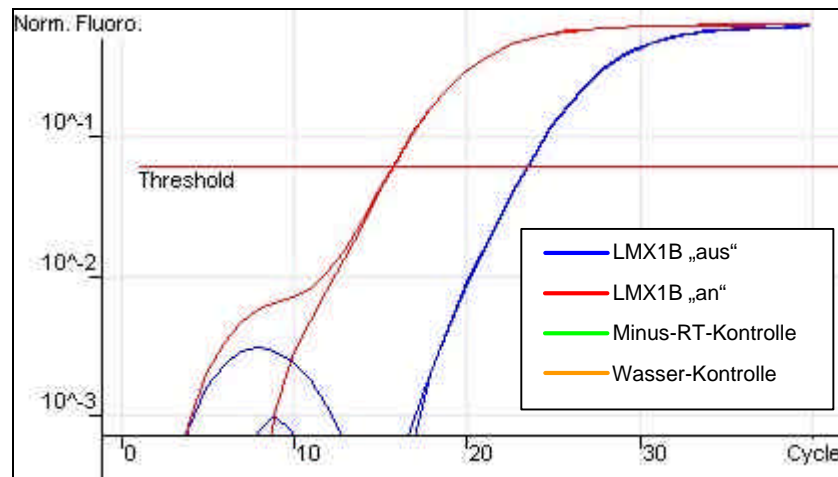


Abbildung 6: Aufzeichnung der Fluoreszenz während der Amplifikationsphase einer Echtzeit-PCR. Eine 10 ng RNA äquivalente Menge cDNA von 4 Tage lang kultivierten und dabei nicht induzierten (LMX1B „aus“) bzw. induzierten (LMX1B „an“) HtTA-1/myc-LMX1B-Zellen des Klons #34 wurde in einer Echtzeit-PCR mit dem Primerpaar hLMX1B F8/R8 amplifiziert. Dafür wurden die Reaktionen doppelt angelegt und zusätzlich eine Minus-RT- und eine Wasser-Kontrolle angefertigt. Die aufgezeichnete Fluoreszenz erreichte bei den induzierten Zellen den Schwellenwert („Threshold“) nach einer wesentlich geringeren Anzahl von Amplifikationszyklen („Cycles“) als bei den nicht induzierten Zellen. Dabei stimmten die Doppelwerte jeweils überein. In den Kontrollen konnte keine Fluoreszenz detektiert werden.

Die in dieser Echtzeit-PCR bestimmten, für die Auswertung herangezogenen CT („cycle-threshold“)-Werte lagen bei 15,92 und 15,94 für die *LMX1B*-überexprimierenden Zellen, sowie bei 23,66 und 23,68 für die Zellen mit abgeschalteter *LMX1B*-Überexpression. Demnach stimmten die Doppelwerte bis auf einen geringfügigen Unterschied in der zweiten Hinterkommastelle überein, was die Reproduzierbarkeit der Echtzeit-PCR-Daten verdeutlicht. Der wesentlich geringere CT-Wert bei den induzierten Zellen zeigt eine höhere Ausgangsmenge an *LMX1B*-cDNA an, aus der mit einer geringeren Zahl von Amplifikationszyklen eine entsprechende Anzahl SYBR-Green- und damit fluoreszenzmarkierter DNA-Doppelstränge entstehen konnte.

Bei der Minus-RT- und der Wasser-Kontrolle konnte keine Fluoreszenz detektiert werden. Diese beiden Kontrollen wurden bei allen RT-qPCR-Analysen für jedes Primerpaar angesetzt. Bei der Minus-RT-Kontrolle handelt es sich um eine bei der reversen Transkription der Gesamt-RNA ohne Enzym angesetzte Probe. Sie gibt Aufschluss über eine Verunreinigung der gleichzeitig synthetisierten cDNAs mit chromosomaler DNA oder z.B. über Pipetten verschleppte cDNA. Für die Wasserkontrolle wurde die cDNA in der Echtzeit-PCR-Reaktion durch Wasser ersetzt. Diese Kontrolle zeigt unerwünschte Dimere oder Sekundärstrukturen

der Primerpaare an. In diesem Fall waren die Proben also nicht verunreinigt und das Primerpaar gut gewählt.

Letzteres lässt sich auch genau erkennen, wenn man die Schmelzkurven der Proben betrachtet. Für die Aufzeichnung dieser Kurven nach Beendigung der Amplifikationsphase und damit der eigentlichen PCR werden die Proben langsam von 60°C auf 95°C erhitzt und die Veränderung der Fluoreszenz dabei aufgenommen. Die Temperatur, bei der diese Veränderung am stärksten und als Gipfel der Schmelzkurve zu erkennen ist, ist die Schmelztemperatur des PCR-Produkts. Da SYBR-Green nur an einen Doppelstrang angelagert Fluoreszenz emittiert, nimmt bei Aufschmelzen des PCR-Produkts die Fluoreszenz der Probe schlagartig ab, was als starke Veränderung der Fluoreszenz aufgezeichnet wird. Gibt es wie im Fall der in Abbildung 7 gezeigten Minus-RT- und Wasser-Kontrolle keinen DNA-Doppelstrang, der bei erhöhter Temperatur aufschmelzen könnte, kann auch keine Veränderung der Fluoreszenz detektiert werden.

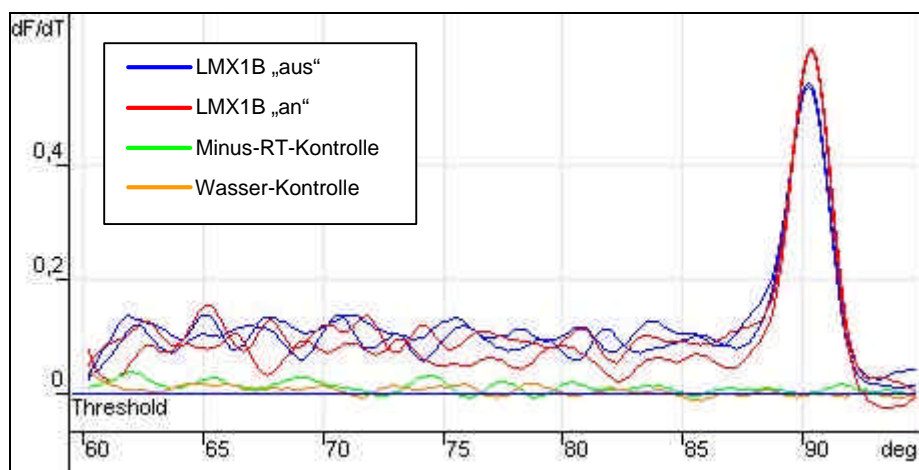


Abbildung 7: Schmelzkurven der Echtzeit-PCR. Nach Beendigung der in Abbildung 6 dokumentierten Amplifikationsphase der Echtzeit-PCR wurden Schmelzkurven aufgenommen. Dazu wurde die Temperatur der Proben kontinuierlich von 60°C auf 95°C erhöht und die Veränderung der Fluoreszenz dabei aufgenommen. Der Gipfel bei den Kurven der cDNA-Proben zeigt ein einziges PCR-Produkt mit einer Schmelztemperatur von ca. 90°C an. Die Kontrollen lassen Kontaminationen ausschließen.

Bei den Schmelzkurven der Proben von Zellen mit ab- bzw. ausgeschalteter *LMX1B*-Überexpression ist jeweils nur ein einzelner Gipfel zu erkennen. Dies bedeutet, dass hier auch nur ein einziges PCR-Produkt amplifiziert wurde. Verschiedene Produkte mit unterschiedlicher Länge oder Basenzusammensetzung hätten auch unterschiedliche

Schmelzpunkte. Der Schmelzpunkt des LMX1B-PCR-Produkts wurde bei den nicht induzierten Zellen zweimal mit $90,25^{\circ}\text{C}$, bei den induzierten Zellen mit $90,35^{\circ}\text{C}$ bestimmt.

Es gibt zwei Quantifizierungsstrategien für die Echtzeit-PCR. Die absolute Quantifizierung wird anhand einer gegebenen Kalibrierkurve durchgeführt, für die eine Verdünnungsreihe von RT-PCR-Produkten benötigt wird [Pfaffl und Hageleit, 2001]. Bei der für die hier gezeigten Versuche angewendeten relativen Quantifizierung wird die Expression eines Zielgens auf ein nicht reguliertes Haushaltsgen bezogen. Man nennt dies auch Normalisierung der Expressionsergebnisse [Rasmussen, 2001].

Als Haushaltsgene wurden für die in dieser Arbeit gezeigten RT-qPCR-Analysen die Gene für das strukturelle Protein Lamin A/C und das ribosomale Protein S9 ausgewählt. Deren Expression war bei einem Zelltyp immer gleich und unabhängig von seiner weiteren Differenzierung. Dies demonstriert Abbildung 8, in deren Graph die CT-Werte verschiedener HtTA-1-Proben bei Amplifikation mit einem Primerpaar für Lamin A/C und insgesamt drei anderen Primerpaaren aufgetragen sind. Dabei handelt es sich um drei verschiedene Echtzeit-PCR-Läufe an zwei verschiedenen Tagen.

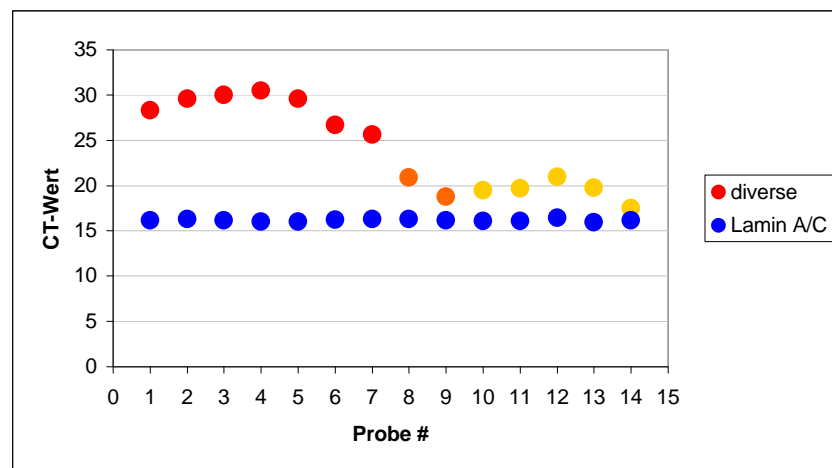


Abbildung 8: CT-Werte von mit einem Primerpaar für Lamin A/C bzw. drei anderen Primerpaaren amplifizierten Proben. Verschiedene cDNA-Proben von HtTA-1/myc-LMX1B-Zellen wurden an zwei unterschiedlichen Tagen in insgesamt drei Echtzeit-PCR-Läufen mit dem Primerpaar LamA/C F/R bzw. drei anderen Primerpaaren amplifiziert (rot, orange, gelb). Unabhängig von der Expression anderer Gene und durchgeführtem Lauf blieb der CT-Wert für die mit LamA/C F/R amplifizierten Proben konstant.

Der CT-Wert für Lamin A/C lag bei allen Reaktionen etwas über 16 und war unabhängig vom Tag des Versuchs und durchgeführten Lauf sowie vom Expressionsprofil der unterschiedlich behandelten HtTA-1/myc-LMX1B-Zellen. Dies qualifizierte das Lamin A/C-Gen als Haushaltsgen für die Normalisierung. Das gleiche galt für *S9* [Daten nicht gezeigt], das als Haushaltsgen bei der RT-qPCR-Analyse der Mausgewebe- und Urothelzell-Proben eingesetzt wurde.

Die Normalisierung ist für die Auswertung der Daten wichtig, da z.B. durch Pipettierungenauigkeiten verursachte Unterschiede in der eingesetzten cDNA-Menge Schwankungen der CT-Werte zur Folge haben. Durch Normalisierung der CT-Werte für andere Gene mit den CT-Werten für das Lamin A/C-Gen können diese herausgerechnet werden.

Bei allen im Folgenden gezeigten RT-qPCR-Analysen wurden Duplikate jeder Reaktion angefertigt und gemessen. Aus deren normalisierten CT-Werten wurden anschließend Mittelwert und Standardabweichung gebildet. Diese sind in den gezeigten Diagrammen graphisch dargestellt. Die für jedes Primerpaar angelegten Minus-RT- und Wasserkontrollen mussten unauffällig sein, damit die Ergebnisse des Experiments verwertet werden konnten. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde v.a. bei Kurvendiagrammen auf die Darstellung der (unauffälligen) Kontrollen verzichtet, Balkendiagramme wurden mit der Minus-RT-Kontrolle versehen.

3.2.3 RT-qPCR und RNase-Protection-Assay liefern vergleichbare Ergebnisse

Da die RT-qPCR in diesem Labor gerade erst etabliert worden war, sollte ihr Funktionieren durch Vergleich mit der Methode des RNase-Protection-Assays überprüft werden.

Für diesen Vergleich wurde RNA benötigt, die in beide Experimente eingesetzt werden konnte. Dazu wurden in Medium ohne Doxyzyklin gewachsene HtTA-1- und HtTA-1/myc-LMX1B-Zellen (Klon #34) verwendet, also Kontroll-Zellen und Zellen, die LMX1B überexprimiert produzierten. Die Verwendung von HtTA-1-Zellen ist eine Möglichkeit der Kontrolle neben der im nächsten Kapitel gezeigten, bei der parallel zu den induzierten Zellen eines Klons auch die nicht induzierten Zellen getestet wurden. Die für die

Proben benötigten Zellen beider Klone wuchsen für 2 und 4 Tage in Medium ohne Doxzyklin. Aus ihnen wurde die sowohl für den RNase-Protection-Assay als auch für die RT-qPCR verwendete Gesamt-RNA isoliert.

Zum Vergleich der beiden Methoden wurden LMX1B und das in der Genexpressionsanalyse induzierte ISG15 ausgewählt. Die 18S-rRNA diente in diesem Versuch als Kontrolle für gleichmäßige Probenbeladung.

Zur Herstellung der RNA-Sonden für den RNase-Protection-Assay wurden zunächst die benötigten Plasmide mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten, um ein Abfallen der RNA-Polymerase zu ermöglichen. Dann wurde mit der vom Plasmid vorgegebenen RNA-Polymerase (T3 oder T7) *in vitro* transkribiert und durch Einsatz von α -³²P-UTP gleichzeitig radioaktiv markiert. Auf diese Weise entstanden die als spezifische Sonden eingesetzten RNA-Stücke. Deren Länge und die für ihre Herstellung benötigten Enzyme sind in Tabelle 18 gezeigt.

Plasmid	Restriktionsenzym	RNA-Polymerase	Länge Sonde [b]
pTRI RNA 18S	bereits linearisiert	T3	80
pCRII topo/hLMX1B	<i>Nco</i> I (2 Fragmente)	T7	360
pBS-ISG15	<i>Hind</i> III (linearisiert)	T3	205

Tabelle 18: Herstellung der RNA-Sonden. Plasmide, die die als Sonde benötigte Sequenz enthielten, wurden zunächst geschnitten. Dann wurde die Sequenz mit einer RNA-Polymerase transkribiert.

Die zum Ende der Versuchsdurchführung über Nacht auf die Gele aufgelegten Röntgenfilme sind in Abbildung 9 zu sehen.

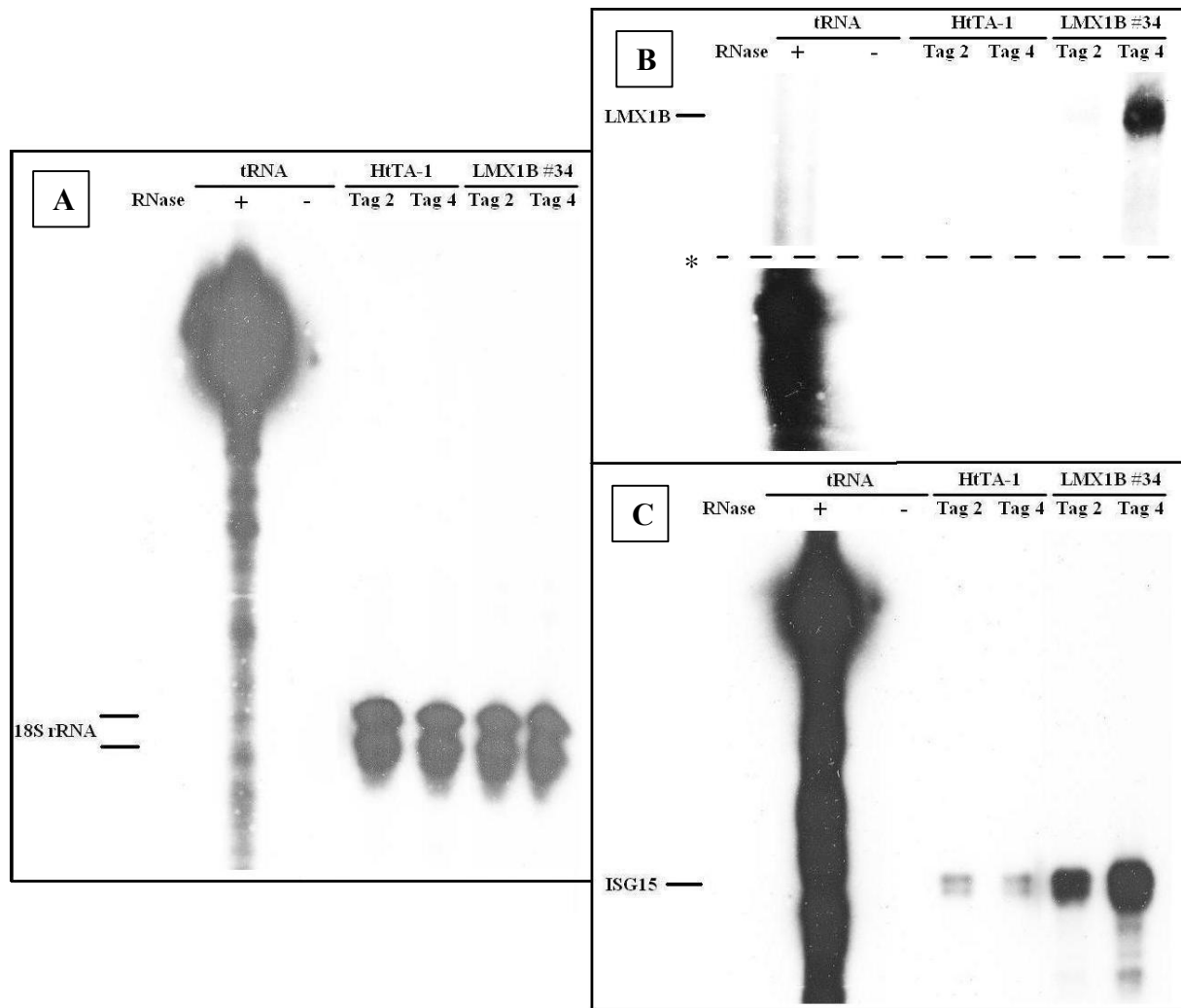


Abbildung 9: RNase-Protection-Assay mit Gesamt-RNA von HtTA-1- und LMX1B-synthetisierenden HtTA-1-Zellen. Je 50 ng (für 18S rRNA) bzw. 5 µg (für LMX1B und ISG15) Gesamt-RNA aus 2 und 4 Tage in Medium ohne Doxyzyklin gewachsenen HtTA-1- und HtTA-1/myc-LMX1B-Zellen (Klon #34) sowie tRNA als Kontrolle wurden mit zuvor durch *in vitro*-Transkription hergestellten RNA-Sonden hybridisiert. Durch Behandlung mit RNase wurde nicht-hybridisierte RNA verdaut. (Je eine tRNA-Probe wurde mit RNase behandelt („+“), die andere nicht („-“).) Die gewünschte doppelsträngige RNA wurde gereinigt, gefällt und auf Acrylamid-Sequenziergelen aufgetrennt, auf denen anschließend über Nacht Röntgenfilme exponiert wurden. Die verwendeten Sonden waren spezifisch für 18S-rRNA (A), LMX1B- (B) und ISG15-mRNA (C). Die 18S-rRNA-Kontrolle zeigte eine annähernd gleiche Beladung der Taschen mit hybridisierter RNA. LMX1B-mRNA war in den HtTA-1-Proben gar nicht, bei dem 2 Tage lang induzierten LMX1B-Klon schwach und bei dem 4 Tage lang induzierten Klon vergleichsweise stark zu detektieren. ISG15-mRNA war auch in den HtTA-1-Zellen vorhanden, zeigte aber ebenfalls einen deutlichen Anstieg in den LMX1B-synthetisierenden Zellen. (* Mittelteil des Röntgenfilms zwecks Übersichtlichkeit gekürzt)

An der Kontrolle mit 18S rRNA lässt sich erkennen, dass von allen Proben annähernd gleiche Mengen im Experiment aufgearbeitet und auf das Gel geladen worden waren.

LMX1B-mRNA war mittels RNase-Protection-Assay in den aus den HtTA-1-Zellen stammenden Proben nicht zu detektieren. Die induzierten HtTA-1/myc-LMX1B-Zellen zeigten nach zwei Tagen eine schwache Transkription von *LMX1B*, nach 4 Tagen eine deutlich stärkere. Die verwendete Sonde erscheint separat aufgetragen zwar degradiert, konnte ihre Funktion jedoch offensichtlich dennoch erfüllen.

Bereits die HtTA-1-Zellen synthetisierten eine geringe Menge ISG15-mRNA. Diese war jedoch in den 2 Tage lang induzierten LMX1B-produzierenden Zellen wesentlich höher. Nach 4 Tagen Induktion war auch hier wie bei der LMX1B-mRNA noch einmal eine Steigerung zu erkennen.

Nun sollte die gleiche Gesamt-RNA, die für diesen RNase-Protection-Assay verwendet wurde, auch in einer RT-qPCR auf *LMX1B*- und *ISG15*-Expression überprüft werden, um die beiden Methoden direkt miteinander vergleichen zu können. Dazu wurde aus der Gesamt-RNA die für die Echtzeit-PCR benötigte cDNA synthetisiert.

Um den direkten Vergleich von RT-qPCR und RNase-Protection-Assay möglich zu machen, wurden die Röntgenfilme des RNase-Protection-Assays eingescannt. Mit Hilfe eines Computerprogramms wurde die Schwärzung der einzelnen Banden quantifiziert. Diese ist ein Maß für die in der Probe vorhandene mRNA-Menge des untersuchten Gens. Für die Normalisierung wurden die Werte der 18S rRNA verwendet. Nun konnten die Ergebnisse beider Methoden in den in Abbildung 10 gezeigten Balkendiagrammen graphisch dargestellt werden.

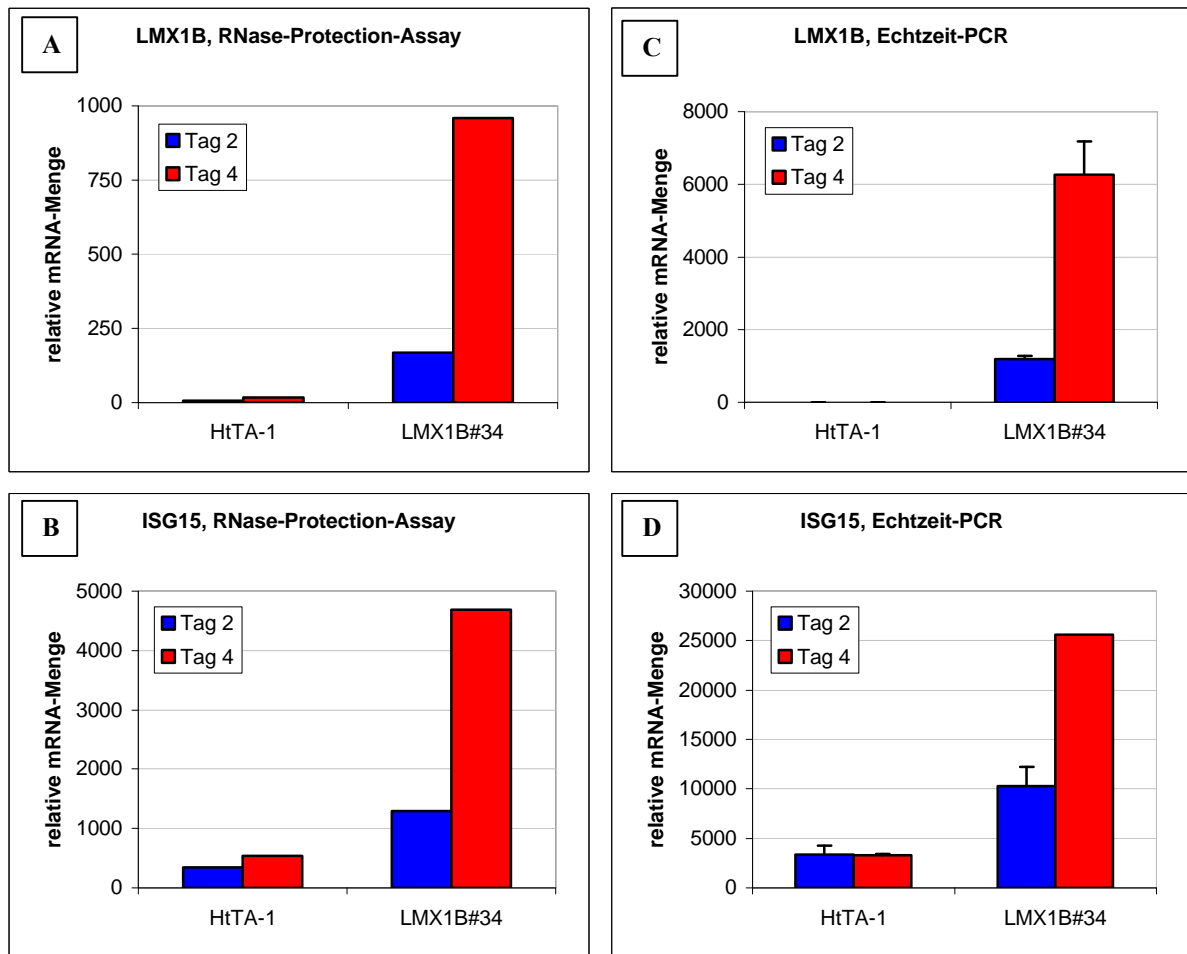


Abbildung 10: Vergleich von RNase-Protection-Assay und RT-qPCR. Für die Darstellung der RNase-Protection-Assay-Ergebnisse (A und B) wurden die in Abbildung 9 gezeigten Röntgenfilme eingescannt. Mit Hilfe eines Computerprogramms wurde die Schwärzung der Banden quantifiziert, welche der mRNA-Menge des untersuchten Gens in den Proben proportional ist. Normalisiert wurde mit den Werten der 18S-rRNA. Von den gleichen Gesamt-RNA-Proben, die für den Protection-Assay verwendet worden waren, wurde ein anderer Teil in cDNA umgeschrieben. Eine 10 ng RNA äquivalente Menge dieser cDNA wurde in eine Echtzeit-PCR-Reaktion eingesetzt. Mit den Primerpaaren m/hLMX1B F1/R1 (C) und hISG15 F1/R1 (D) wurde auf diese Weise die Synthese von LMX1B- und ISG15-mRNA untersucht. Reaktionen mit dem Primerpaar hLama/C F/R dienten zur Normalisierung. Die beiden Methoden lieferten vergleichbare Ergebnisse.

Auch die RT-qPCR zeigte keine detektierbare LMX1B-mRNA-Menge in den HtTA-1-Zellen, eine erhöhte Menge nach 2 Tagen Induktion bei den HtTA-1/myc-LMX1B-Zellen und eine nochmals deutlich größere Menge bei diesen Zellen nach 4 Tagen Induktion.

Ebenso gleichen sich die Ergebnisse bezüglich der ISG15-mRNA. Es wurden eine basale Transkription des Gens bei den HtTA-1-Zellen und deren Anstieg bei den LMX1B-

synthetisierenden Zellen gemessen, wobei sich auch hier nach 4 Tagen Induktion eine signifikant größere mRNA-Menge fand als nach 2 Tagen.

Die Zahlenwerte der beiden Methoden sind selbstverständlich nicht direkt miteinander zu vergleichen. Bei den Werten der RT-qPCR handelt es sich um Angaben zur relativen mRNA-Menge, die durch Normalisierung mit dem Gen für Lamin A/C zustande kamen. Es wurden keine Standards zur Bestimmung der absoluten Menge verwendet. Das gleiche gilt für den RNase-Protection-Assay. Die Angaben hier vergleichen lediglich die Schwärzung des Films und sind mit 18S-rRNA normalisiert.

Die beiden verglichenen Methoden lieferten dieselben Ergebnisse. Für die Untersuchung aller weiteren Fragestellungen, die eine Quantifizierung spezifischer mRNAs erforderten, wurde im Laufe der vorliegenden Arbeit nur noch die RT-qPCR verwendet, da sie gegenüber dem RNase-Protection-Assay einige Vorteile aufweist: Sie ist nicht-radioaktiv und in wesentlich kürzerer Zeit durchzuführen. Dabei besitzt sie eine höhere Sensitivität und Genauigkeit. Es werden kleinere RNA-Mengen und damit weniger Zellen als Ausgangsmaterial benötigt, und es können größere Anzahlen von Proben und Genen gleichzeitig gemessen werden. Bei entsprechender Normalisierung können auch Proben verschiedener Messungen miteinander verglichen werden.

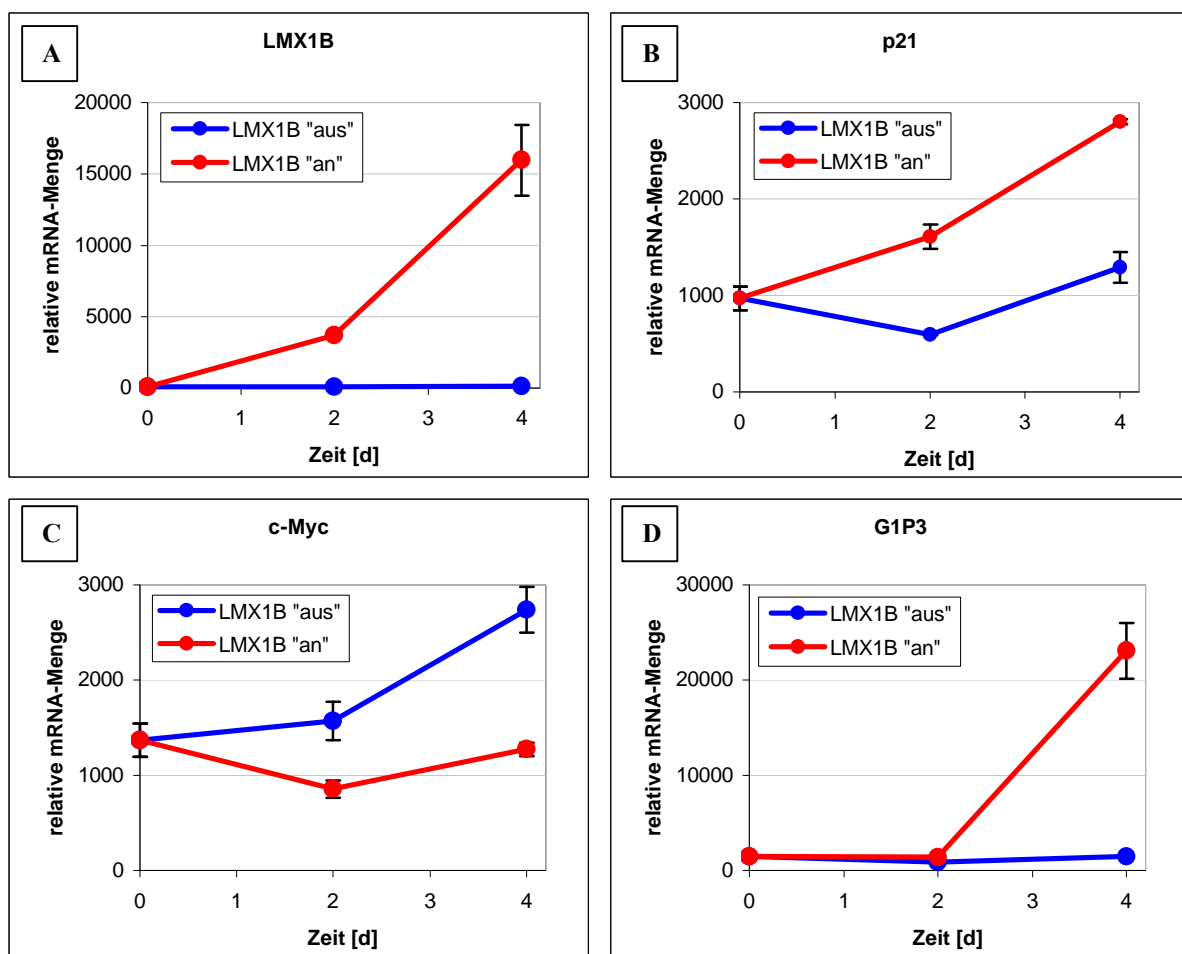
3.2.4 Die RT-qPCR-Analyse bestätigt die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse

Die im Folgenden beschriebenen Proben wurden nicht nur für die in diesem Kapitel gezeigte Echtzeit-PCR, sondern auch für Analysen aus den Kapiteln 3.3.1 bis 3.3.4 und 3.3.7 verwendet. Genauer gesagt wurde aus den geernteten Zellen einmal Gesamt-RNA isoliert, die dann bei -80°C gelagert wurde. Waren die daraus synthetisierten cDNA-Proben aufgebraucht, wurde eine weitere reverse Transkription durchgeführt, um frische Proben zu erhalten. Um mehrfache Wiederholung der Beschreibung zu vermeiden, wird im Text der oben genannten Kapitel lediglich auf Kapitel 3.2.4 verwiesen werden. Die Bildunterschriften werden die Probengewinnung jedoch noch einmal kurz zusammenfassen.

HtTA-1/myc-LMX1B-Zellen (Klon #34) wuchsen zunächst mehrere Tage in Medium mit Doxyzyklin, dann wurden sie abgelöst. Ein Teil von ihnen wurde für die „Tag 0“-Probe

verwendet, vom anderen Teil wurden Zellen für die späteren Zeitpunkte in Medium mit 100 ng/ml Doxyzyklin für abgeschaltete LMX1B-Synthese oder ohne Doxyzyklin für angeschaltete LMX1B-Synthese ausgesät. Aus den nach der zwei bzw. vier Tage später folgenden Ernte schockgefrorenen Zellpellets wurde Gesamt-RNA isoliert, aus der wiederum cDNA für die Echtzeit-PCR hergestellt wurde.

Um nun die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse zu überprüfen, wurden in diesem Experiment das Gen für p21 und die drei in der Genexpressionsanalyse am stärksten betroffenen Gene *G1P3*, *ISG15* und *IFIT1* getestet. Ferner wurde die Expression von *c-Myc* überprüft, weil dessen Produkt negativ regulierend auf *p21* wirkt [Mitchell und El-Deiry, 1999; McNeil und Musgrove, 2006]. Um die LMX1B-Expression des Klons in den für diesen Versuch hergestellten Proben zu kontrollieren und eine Möglichkeit zum Vergleich des zeitlichen Ablaufs der Expression zu haben, wurde ebenfalls LMX1B-cDNA amplifiziert. Als Kontrollen wurden die NF- κ B-Komponenten p50 und p65 ausgewählt, da dieser Transkriptionsfaktor in fast allen menschlichen Zelltypen exprimiert wird.



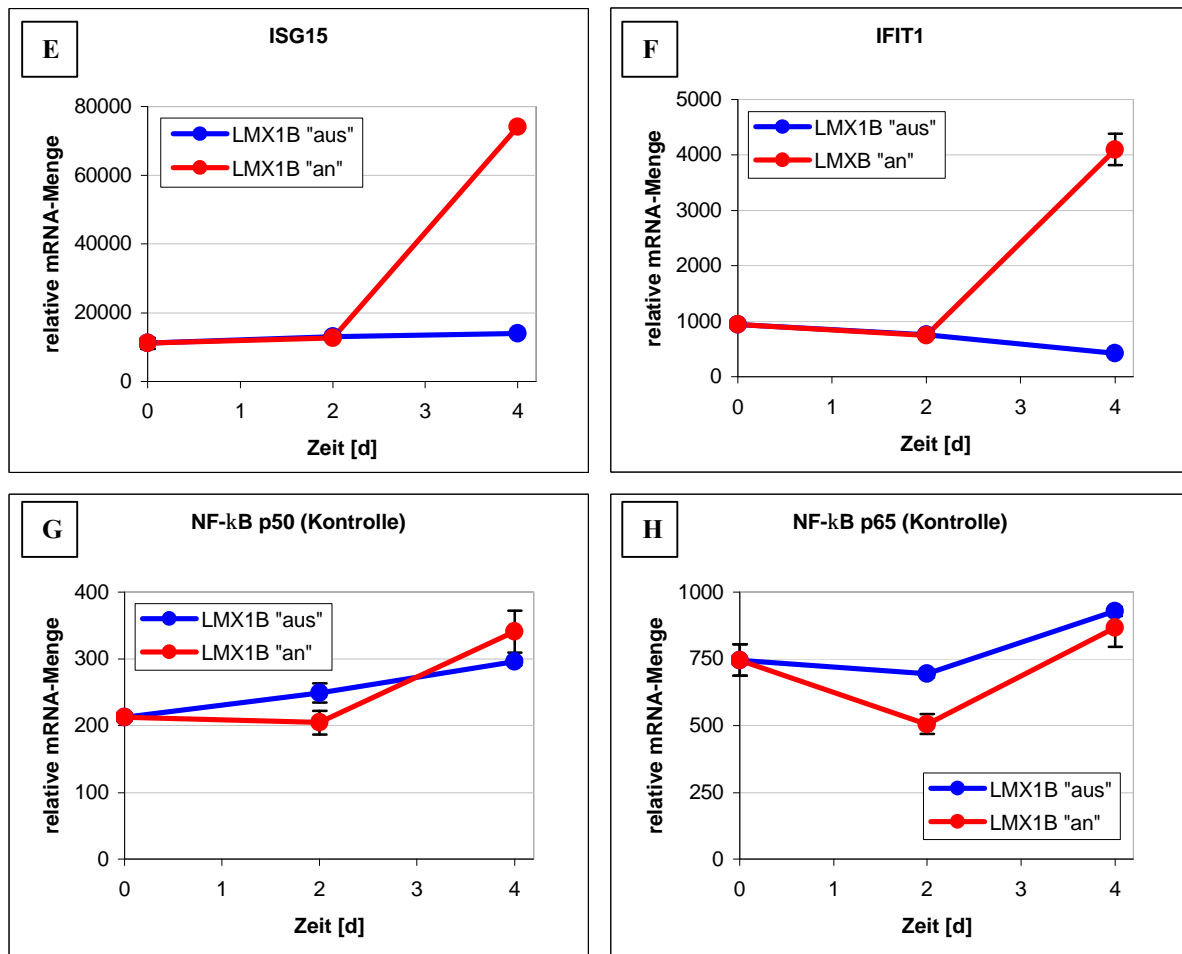


Abbildung 11: RT-qPCR-Analyse der Expression von *LMX1B*, *p21*, *c-Myc*, *GIP3*, *ISG15*, *IFIT1*, *NF-κB p50* und *NF-κB p65* in *LMX1B*-produzierenden HtTA-1-Zellen. HtTA-1/myc-*LMX1B*-Zellen wuchsen mehrere Tage in Medium mit 100 ng/ml Doxyzyklin, wurden gesplittet und dann für 2 und 4 Tage in Medium mit 100 ng/ml (*LMX1B* „aus“) oder ohne (*LMX1B* „an“) Doxyzyklin in Gewebekulturschalen ausgesät. Aus den geernteten Zellen wurde Gesamt-RNA isoliert, aus 1 µg Gesamt-RNA wurde cDNA synthetisiert. Eine 10 ng RNA äquivalente Menge cDNA wurde dann pro Reaktion in die Echtzeit-PCR eingesetzt. Für die Amplifikation wurden die Primerpaare m/h*LMX1B* F1/R1 (A), hp21 F1/R1 (B), hc-*Myc* F1/R1 (C), h*GIP3* F1/R1 (D), h*ISG15* F1/R1 (E), h*IFIT1* up/low (F), h*NF-κB p50* F1/R1 (G), *NF-κB p65* F1/R1 (H) und h*LamA/C* F/R verwendet, letzteres diente der Normalisierung. Die Expression von *LMX1B* und allen in der Genexpressionsanalyse induzierten Genen war in den *LMX1B*-produzierenden Zellen erhöht, die von *c-Myc* erniedrigt. Bei den Kontrollen (*NF-κB p50* und *NF-κB p65*) war kein Unterschied festzustellen.

Die Kontrollen zeigen, dass die *NF-κB*-Komponenten *p50* und *p65* wie erwartet in den getesteten Zellen exprimiert wurden. Die Transkription der beiden kodierenden Gene erhöhte sich leicht während der 4-tägigen Kulturperiode, unterschied sich in den *LMX1B*-produzierenden Zellen jedoch nicht von der in den Zellen mit unterdrückter *LMX1B*-Produktion.

Die LMX1B-Expression stieg wie beabsichtigt in den induzierten Zellen über die Zeit kontinuierlich an. Zwei Tage nach Beginn der Induktion war ein 50-facher Anstieg der relativen LMX1B-mRNA-Menge in den induzierten Zellen zu beobachten. Sie erhöhte sich bis Tag 4 auf das 120-fache, während die nicht induzierten Zellen keine detektierbare Menge von LMX1B-mRNA synthetisierten. Hier blieb die Expression zuverlässig abgeschaltet.

Im Vergleich dazu wurde *p21* von allen untersuchten Zellen exprimiert. Die Werte der Proben von Zellen mit ausgeschalteter LMX1B-Produktion pendelten um den Ausgangswert. Der Wert von Tag 2 lag etwas niedriger, der von Tag 4 etwas höher als dieser. Im Gegensatz dazu stieg die relative *p21*-mRNA-Menge in den Zellen mit angeschalteter LMX1B-Produktion kontinuierlich an. An Tag 2 erreichte sie das 2,7-fache, an Tag 4 das 2,2-fache der Menge in den ausgeschalteten Zellen.

Auch *c-Myc* wurde in allen untersuchten Zellen transkribiert. Die beiden Probenreihen verhielten sich hier jedoch im Vergleich zu *p21* genau entgegengesetzt. So waren es hier die Zellen mit abgeschalteter LMX1B-Produktion, deren *c-Myc*-mRNA-Menge über das 1,1-fache an Tag 2 auf das 2,0-fache an Tag 4 stieg. Dafür sank bei den LMX1B-produzierenden Zellen die mRNA-Menge auf das 0,6-fache an Tag 2 und näherte sich an Tag 4 mit dem 0,9-fachen fast wieder dem Ausgangswert. Da *c-Myc* die *p21*-Expression inhibiert [Mitchell und El-Deiry, 1999; McNeil und Musgrove, 2006] könnte die verminderte *c-Myc*-Produktion an der erhöhten *p21*-Transkription in LMX1B-synthetisierenden Zellen ursächlich beteiligt sein.

Die Interferon-induzierten Gene zeigten ebenfalls eine erkennbare Transkription bereits in den Zellen mit abgeschalteter LMX1B-Synthese. Außerdem wiesen sie wie im Fall von *ISG15* und *IFIT1* an Tag 2 keinen oder wie im Fall von *GIP3* nur einen geringen Anstieg ihrer Transkription in den LMX1B-produzierenden Zellen auf. Die *GIP3*-Transkription erhöhte sich über das 1,6-fache an Tag 2 auf das 15-fache an Tag 4. Die relative Menge von *ISG15*-mRNA in LMX1B-synthetisierenden Zellen betrug nach 4 Tagen das 5-fache der in den Kontrollzellen detektierten Menge, bei der *IFIT1*-mRNA belief sich dieser Wert auf das 10-fache. Mit *IFI16* wurde ein weiteres im cDNA-Array auffälliges ISG getestet. Dessen basale Transkription war in induzierten Zellen an Tag 4 auf das doppelte erhöht (Daten nicht gezeigt).

Die Ergebnisse aus diesem Versuch bestätigen somit die Ergebnisse der cDNA-Arrays. Die Gene für p21, G1P3, ISG15, IFIT1 und IFI16 zeigten in beiden Testsystemen eine Steigerung ihrer Transkription in Zellen, die LMX1B überexprimiert produzieren. *G1P3* war dabei bei beiden am stärksten betroffen.

Für die beiden Testsysteme wurden unterschiedliche Klone der HtTA-1/myc-LMX1B-Zellen verwendet: für die cDNA-Arrays Klon #12, für die RT-qPCR Klon #34. Da mit beiden Klonen ein Anstieg der Expression von Interferon-induzierten Genen festgestellt werden konnte, handelt es sich hierbei nicht um einen klonalen Effekt.

3.2.5 Die C95F-Mutante von LMX1B zeigt keine erhöhte Expression von ISGs

Bei der C95F-Mutante von LMX1B wurde an Position 95 die Aminosäure Cystein gegen die Aminosäure Phenylalanin ausgetauscht. Da das Cystein Bestandteil eines Zinkfinger-Motivs in der LIM2-Domäne von LMX1B und essentiell für dessen Stabilität ist, führt dieser Aminosäureaustausch zu einer Zerstörung der Zinkfinger-Struktur und damit wahrscheinlich zu einem Verlust der Fähigkeit zur Interaktion mit anderen Proteinen [Bongers et al., 2002]. Die C95F-Mutation wurde bei Patienten mit Nagel-Patella-Syndrom identifiziert und aus diesem Grund für Untersuchungen an stabil transfizierten, das Protein induzierbar synthetisierenden HtTA-1-Zellen ausgewählt [Kastner, 2004]. Jürgen Kastner konnte zeigen, dass der wachstumshemmende Effekt, den LMX1B auf die HtTA-1-Zellen ausübt, durch die Mutation verhindert wird, und dass somit die LIM2-Domäne unverzichtbar für diesen Effekt ist.

Nun sollte überprüft werden, ob auch die bei den LMX1B-synthetisierenden Zellen erhöhte Expression verschiedener Gene von der korrekten Struktur der LIM2-Domäne abhängig ist. Postuliert man einen kausalen Zusammenhang zwischen der Expression von Interferon-stimulierten Genen und der beobachteten Wachstumshemmung, wäre dies zu erwarten. Zusätzlich könnte mit dieser Mutante eine Kontrolle für die Spezifität des Effekts, den das Wildtyp-LMX1B auf die Genexpression der Zellen ausübt, vorliegen.

Für diesen Versuch wurden HtTA-1-Zellen, HtTA-1/myc-LMX1B (C95F)-Zellen des Klons #351 und HtTA-1/myc-LMX1B-Wildtyp-Zellen des Klons #34 parallel für die angegebene

Zeitdauer in Medium mit bzw. ohne Doxyzyklin kultiviert. An den vorgesehenen Tagen wurden Zellen für die RNA-Extraktion, von den LMX1B-Klonen auch für die Protein-Extraktion geerntet.

Zunächst wurde der für die Proteinextraktion bestimmte Teil der Zellen lysiert. Dann wurden eine SDS-PAGE und danach eine Western-Blot-Analyse durchgeführt, mit der die Produktion des LMX1B-Wildtyp- bzw. LMX1B (C95F)-Proteins zu den getesteten Zeitpunkten überprüft werden sollte. Der zugehörige Röntgenfilm ist in Abbildung 12 zu sehen.

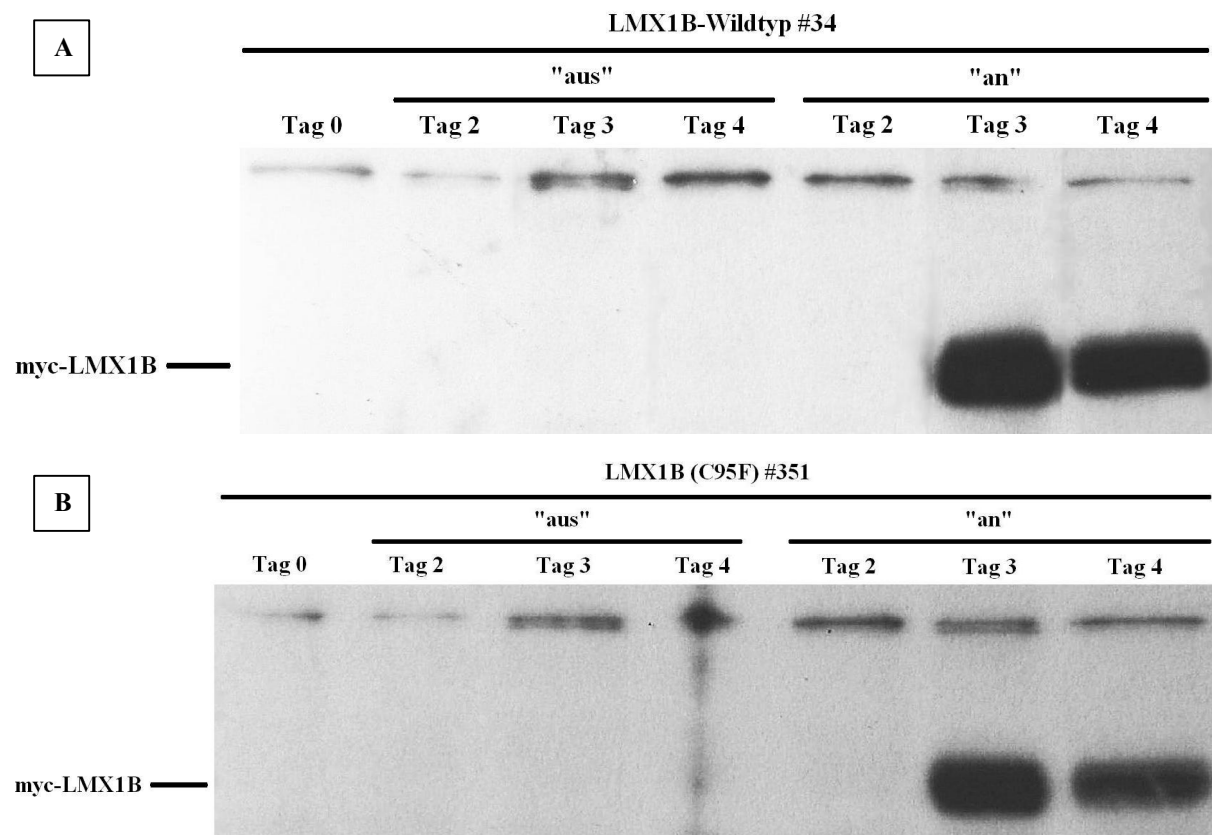


Abbildung 12: Vergleichende Western-Blot-Analyse der induzierbaren Synthese von LMX1B-Wildtyp und -C95F-Protein in stabil transfizierten HtTA-Zellen. HtTA-1/myc-LMX1B-Zellen (Klon #34) (A) und HtTA-1/myc-LMX1B (C95F)-Zellen (Klon #351) (B) wuchsen bis zu 4 Tage in Medium mit („aus“) oder ohne („an“) 100 ng/ml Doxyzyklin. Die an Tag 0, 2, 3 und 4 geernteten Zellen wurden lysiert, um Protein zu erhalten. Je 40 µg Gesamt-Protein wurden auf einem 10%-igen SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und durch Western-Blot auf eine PVDF-Membran übertragen. Das LMX1B-Protein wurde mit dem monoklonalen Anti-LMX1B-Antikörper #193-67 und einem HRP-gekoppelten Anti-Maus-IgG-Sekundäntikörper detektiert. Der 2 h auf der Membran exponierte Röntgenfilm zeigt eine vergleichbare Synthese des Wildtyp- und des Mutanten-Proteins.

Erst nach drei Tagen Kultivierung in Medium ohne Doxyzyklin synthetisierten sowohl der Wildtyp- als auch der C95F-Klon das LMX1B-Protein detektierbar. Dabei war die

Proteinmenge bei Wildtyp- und C95F-Klon vergleichbar und nahm von Tag 3 zu Tag 4 etwas ab. Durch die vergleichbare LMX1B-Synthese war die Voraussetzung für eine vergleichende Betrachtung der Transkription von mutmaßlich durch LMX1B beeinflussten Genen gegeben.

Dafür wurde nun aus dem zweiten Teil der Zellproben von Tag 4 Gesamt-RNA isoliert und diese für die Echtzeit-PCR in cDNA umgeschrieben. Es wurden die Expression des Interferon-stimulierten Gens *GIP3* und des NF- κ B-Zielgens *IL-8* (Details zur Transkription dieses Gens in LMX1B-produzierenden Zellen siehe Kapitel 3.3.7), sowie als Kontrollen die von *LMX1B* und *NF- κ B p50* untersucht. Abbildung 13 zeigt die Ergebnisse.

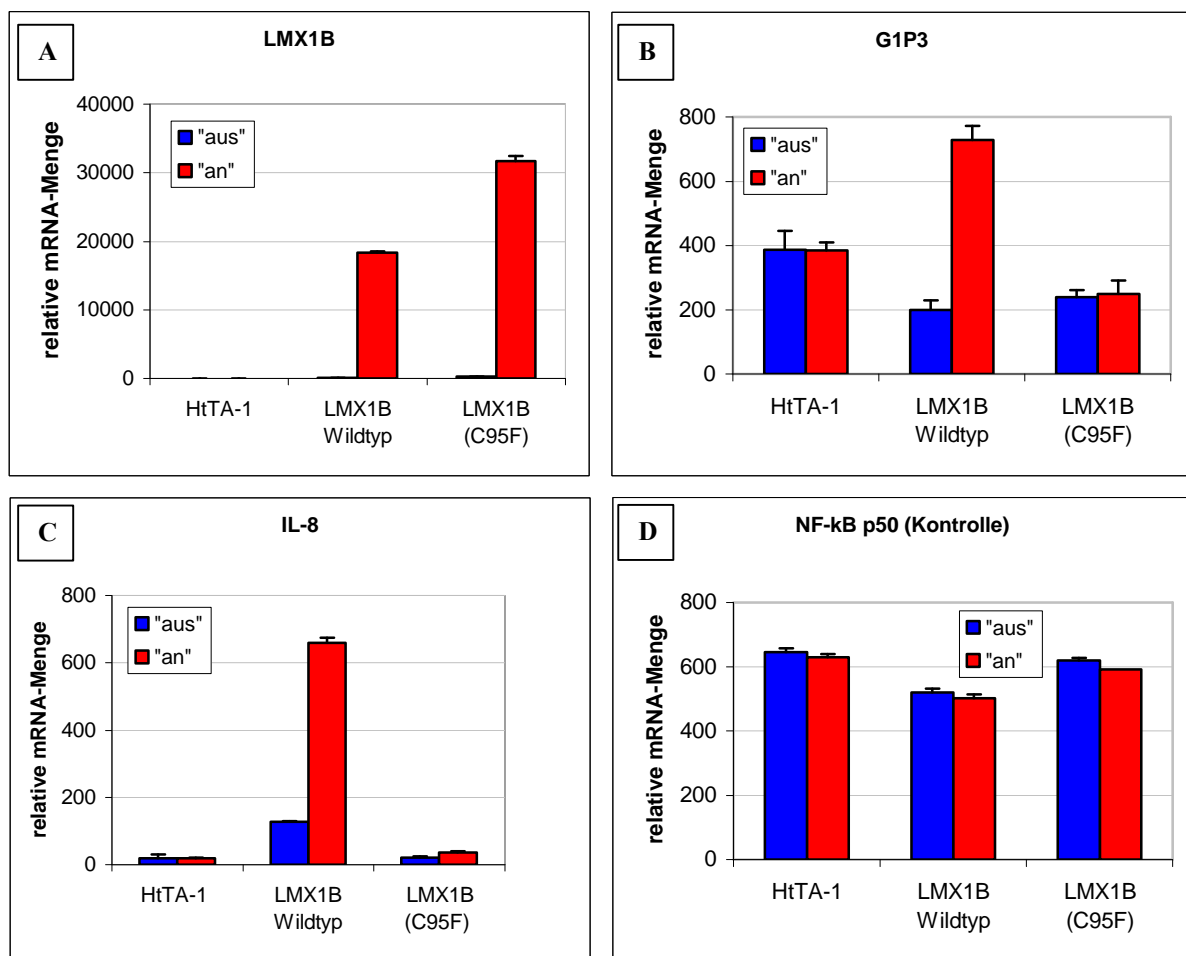


Abbildung 13: RT-qPCR-Analyse der Genexpression von HtTA-1- und das LMX1B-Wildtyp- bzw. LMX1B (C95F)-Protein synthetisierenden Zellen. Aus 4 Tage in Medium mit („aus“) oder ohne („an“) 100 ng/ml Doxzyklin kultivierten HtTA-1-, HtTA-1/myc-LMX1B- und HtTA-1/myc-LMX1B (C95F)-Zellen wurde Gesamt-RNA isoliert, welche dann in cDNA umgeschrieben wurde. Eine 10 ng RNA äquivalente Menge cDNA wurde zusammen mit einem der Primerpaare hLMX1B F8/R8 (A), hGIP3 F1/R1 (B), hIL-8 F1/R1 (C), hNF- κ B p50 F1/R1 (D) oder hLama/C F/R (zur Normalisierung) in jede Echtzeit-PCR-Reaktion eingesetzt. Nur die das Wildtyp-LMX1B produzierenden HtTA-1-Zellen zeigten eine erhöhte Expression von *GIP3* und *IL-8*.

Die Kontrolle der Transkription von LMX1B zeigte hohe mRNA-Mengen sowohl bei den den Wildtyp exprimierenden, als auch bei den die Mutante exprimierenden Zellen. Dabei lag die relative LMX1B-mRNA-Menge der C95F-Form ungefähr bei dem 1,5-fachen der Wildtyp-Form. Dies scheint jedoch, betrachtet man die Proteinkonzentration in den Zellen, durch posttranskriptionale Ereignisse ausgeglichen zu werden.

Die als Negativkontrolle überwachte Expression des Gens für die NF- κ B-Komponente p50 war bei allen drei Klonen annähernd gleich hoch. Auch gab es keinen Unterschied zwischen mit und ohne Doxyzyklin behandelten Zellen. Dagegen war nur bei den Zellen des Wildtyp-Klons eine Erhöhung der *GIP3*-Expression durch Induktion zu beobachten. Weder der HtTA-1- noch der LMX1B (C95F)-Klon zeigten eine Steigerung der Expression durch Auswaschen von Doxyzyklin. Ähnliches gilt für *IL-8*. Auch hier war die relative mRNA-Menge in induzierten Wildtyp-Zellen deutlich erhöht (5,1-fach), während bei den HtTA-1-Zellen kein Unterschied, bei den LMX1B (C95F)-Zellen lediglich eine geringfügige Erhöhung (1,7-fach) zu erkennen war.

So scheint die LIM2-Domäne von LMX1B in der Tat essentiell für die erhöhte Expression verschiedener Gene in den transfizierten HtTA1-Zellen zu sein, was wiederum auf die Unerlässlichkeit der Bindung mindestens eines anderen Proteins an diese Protein-Interaktions-Domäne hinweist. Gleichzeitig bestätigt dieses Experiment mit der mutierten Form von LMX1B die Spezifität der in den das Wildtyp-Protein synthetisierenden Zellen beobachteten Ereignisse. Wie schon in Kapitel 3.2.3 gesehen ist nicht die An- bzw. Abwesenheit von Doxyzyklin im Medium Auslöser der erhöhten Genexpression. Auch ein unspezifischer Effekt der Überexpression eines Proteins mit der Größe von LMX1B kann nun als Ursache ausgeschlossen werden.

3.3 Aufklärung der Rolle von LMX1B im Interferon- α/β -System

Da es sich bei der beobachteten Erhöhung der Expression von Interferon-stimulierten Genen nachweislich um einen spezifischen Effekt von Wildtyp-LMX1B handelt, und viele dieser Gene an der Regulation des Zellwachstums beteiligt sind, sollte im weiteren Verlauf dieser Arbeit der Mechanismus hinter dieser Induktion näher charakterisiert werden. Die Aufklärung der Frage, auf welchem Weg LMX1B die Transkription der ISGs erhöht, ob es z.B. als Transkriptionsfaktor direkt an der Initiation der Transkription beteiligt ist oder ob ein indirekter Effekt vorliegt, sollte dabei im Vordergrund stehen.

Interferon-stimulierte Gene (ISGs) wurden als erstes im Zusammenhang mit der Bekämpfung von Virusinfektionen bei eukaryotischen Zellen beschrieben. Sie werden von diesen als Reaktion transkriptionell aktiviert [Sen, 2001]. Bei einer Infektion induzieren virale Genprodukte, v.a. doppelsträngige RNA (dsRNA), in der Wirtszelle die Synthese von Interferonen. Diese werden sezerniert und binden an spezifische Oberflächenrezeptoren derselben und benachbarter Zellen, was über Aktivierung des JAK/STAT-Signalwegs die Bildung des ISGF3 („interferon-stimulated gene factor 3“-Komplexes auslöst. Dieser bindet an eine spezifische DNA-Sequenz in der Promotorregion, das sog. ISRE („interferon-stimulated response element“), von Interferon-stimulierten Genen und aktiviert deren Transkription [Stark et al., 1998]. Die Produkte der ISGs sind in der Lage, verschiedene Stadien der Virus-Replikation zu inhibieren und so die Virusinfektion einzudämmen. Wie man heute weiß, spielen ISGs aber nicht nur bei der Bekämpfung von Virusinfektionen eine Rolle, sondern besitzen auch z.B. immunmodulatorische oder besagte antiproliferative Funktionen [de Veer et al., 2001].

3.3.1 Die Expression von *IFN β* , nicht aber die von *IFN α* oder *IFN γ* ist in LMX1B-synthetisierenden Zellen erhöht

Die z.B. nach Virusinfektion einer Zelle erhöhte Transkription von Interferon-induzierten Genen in der infizierten Zelle und in benachbarten Zellen wird, wie oben bereits erwähnt, durch die Synthese und Sekretion von Interferonen ausgelöst [Malmgaard, 2004]. Bei den Interferonen unterscheidet man zwei Typen, die strukturell nicht miteinander verwandt sind

und an verschiedene Oberflächenrezeptoren binden [Sen, 2001]. Die Typ I- oder IFN α/β -Superfamilie wird in die strukturell verwandten Familien von IFN α , IFN β , IFN ϵ , IFN κ , IFN ω , IFN δ und IFN τ eingeteilt [Pestka et al., 2004]. Dabei sind IFN α und IFN β die mit Abstand am besten erforschten Mitglieder dieser Gruppe und werden oft exemplarisch untersucht, eingesetzt und genannt. IFN γ dagegen ist das einzige Mitglied der Typ II-Familie. In der Regel induzieren alle Typ I-Interferone dieselben Gene, es gibt jedoch auch einige IFN β -spezifische Gene [Rani et al., 1999]. IFN γ induziert einen anderen Satz von Genen, der jedoch teilweise mit dem von Typ I-Interferonen induzierten überlappt.

In Tabelle 19 sind die Interferon-induzierten Gene, deren Expression sich in LMX1B-produzierenden HfTA-1-Zellen als erhöht erwiesen hatte (siehe Tabelle 17), und der Typ Interferon, für den ihre Induktion gezeigt wurde, aufgeführt.

ISG	alternative Namen für Gen und Protein	Interferon	Referenz
<i>GIP3</i>	Gen 6-16, IFI-6-16	Typ I	Porter et al., 1988 Ackrill et al., 1991 Der et al., 1998
<i>ISG15</i>	UCRP, NCF	Typ I (Typ II)	Der et al., 1998 Zhao et al., 2005
<i>IFIT1</i>	IFI56, ISG56K, Gen 561	Typ I	Der et al., 1998 Kato et al., 2003
<i>IFITM1</i>	Gen 9-27, LEU13	Typ I Typ II	Evans et al., 1993 Der et al., 1998 Kita et al., 2003
<i>IFITM3</i>	Gen 1-8U	Typ I Typ II	Lewin et al., 1991 Brem et al., 2003
<i>IFI16</i>		Typ I Typ II	Dawson und Trapani, 1995 Der et al., 1998 Ludlow et al., 2005
<i>IFITM2</i>		Typ I Typ II	

Tabelle 19: Interferon-stimulierte Gene und Typ des sie stimulierenden Interferons. *ISG15* wird durch Typ II-Interferon nur äußerst gering induziert. Für *IFITM2* gibt es keine gesicherte Quelle, es verhält sich jedoch generell wie die anderen Mitglieder der *IFITM*-Familie.

Hier fällt auf, dass alle in LMX1B-synthetisierenden Zellen induzierten ISGs durch Interferon vom Typ I stimuliert werden können, jedoch nur ein Teil durch Typ II-Interferon.

Für die Klärung der Frage, ob im speziellen Fall der induzierten HtTA-1/myc-LMX1B-Zellen LMX1B als Transkriptionsfaktor direkt oder über den Umweg der Synthese von Interferonen die Expression der ISGs induziert, sollte die Transkription von *IFN α* , *IFN β* und *IFN γ* studiert werden. Dies könnte, falls die Expression eines oder mehrerer dieser Gene erhöht wäre, auch Aufschluss über den Typ des induzierenden Interferons geben.

Um die Expression der Interferon-Gene mit einer Echtzeit-PCR zu untersuchen, wurden die in Kapitel 3.2.4 beschriebenen Proben verwendet. Abbildung 14 zeigt das Ergebnis der Analyse.

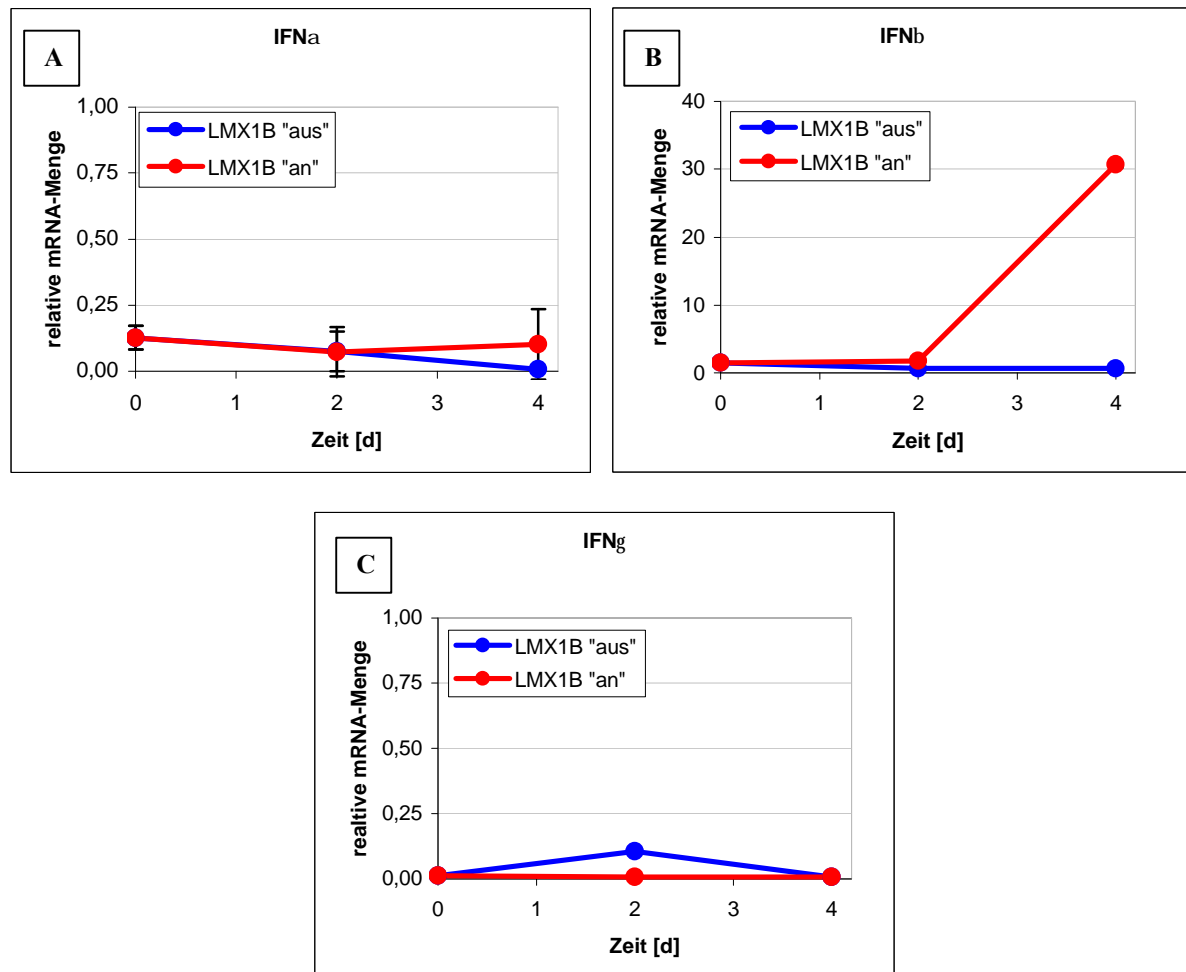


Abbildung 14: RT-qPCR-Analyse der Expression von Interferon-Genen bei LMX1B-synthetisierenden HtTA-1-Zellen. Aus 0, 2 und 4 Tage in Medium mit 100 ng/ml (LMX1B „aus“) oder ohne Doxyzyklin (LMX1B „an“) gewachsenen HtTA-1/myc-LMX1B-Zellen wurde Gesamt-RNA isoliert und aus dieser cDNA synthetisiert. Eine 10 ng RNA entsprechende Menge cDNA wurde pro Echtzeit-PCR-Reaktion eingesetzt. Zur Untersuchung der Gene für Interferone wurden die Primerpaare hIFN α F1/R1 (A), hIFN β F1/R1 (B) und hIFN γ F2/R2 (C) verwendet, zur Normalisierung hLamA/C F/R. Die Gene für Interferon-alpha und -gamma wurden in den LMX1B-produzierenden Zellen nicht induziert, dagegen war die *IFN β* -mRNA-Menge an Tag 4 stark erhöht.

Das *IFN α* -Gen und das *IFN γ* -Gen wurden weder in den nicht induzierten Zellen noch in den induzierten, also LMX1B-synthetisierenden Zellen exprimiert, ihre relative mRNA-Menge ging gegen Null. Im Gegensatz dazu fand sich in den vier Tage lang induzierten Zellen eine deutliche Menge an IFN β -mRNA. Diese betrug das 44-fache der fast vernachlässigbaren mRNA-Menge in den nicht induzierten Zellen. Bereits an Tag 2 war ein 2,8-facher Unterschied feststellbar. Damit folgte die Transkription des *IFN β* -Gens der von *LMX1B*. Dies geschah allerdings zeitlich etwas versetzt. Bei einem 120-fachen Unterschied der *LMX1B*-Transkription an Tag 4 betrug dieser an Tag 2 bereits das 50-fache.

Nachdem nun auf mRNA-Ebene gezeigt worden war, dass das *IFN α* - und das *IFN γ* -Gen weder in nicht induzierten noch in induzierten HtTA-1/myc-LMX1B-Zellen transkribiert werden, wurde die nahe liegende Schlussfolgerung, dass das IFN α - und das IFN γ -Protein nicht synthetisiert und sezerniert wird, mit Hilfe von ELISAs (“enzyme linked immunosorbent assays”) überprüft. Bei diesen wurde die Konzentration des jeweiligen Zytokins im Medium von bis zu 11 Tagen induzierten Zellen gemessen. Dabei konnten weder IFN α noch IFN γ detektiert werden [Daten nicht gezeigt]. Die Ergebnisse dieser ELISAs unterstützen also diejenigen der RT-qPCR. Interferon-alpha und Interferon-gamma können somit keine Rolle bei der Induktion der Interferon-induzierten Gene und damit dem Anstieg von deren mRNA-Menge nach dieser Zeitspanne spielen. Eine Synthese von IFN γ in HeLa-Zellen wäre grundsätzlich unwahrscheinlich gewesen, da dieses im Gegensatz zu Interferon vom Typ I soweit bekannt ausschließlich von den T-Zellen, zytotoxischen Lymphozyten und NK-Zellen des Immunsystems produziert wird [Schroder et al., 2004]. Ein ELISA für humanes Interferon- β stand zum Zeitpunkt der Untersuchungen leider nicht zur Verfügung. Dass Interferon- β gebildet und sezerniert wird, wurde in einem späteren Versuch (siehe Kapitel 3.3.6) indirekt mit einem Neutralisierungsantikörper nachgewiesen.

Es ist also denkbar, dass die Transkription der Interferon-induzierten Gene wie *GIP3* in den HtTA-1/myc-LMX1B-Zellen nicht mehr oder weniger direkt durch den Transkriptionsfaktor LMX1B, sondern durch neu synthetisiertes Interferon- β induziert wird, also dem anerkannten Modell gehorcht. Dies sollte mit den nachfolgenden Experimenten abgesichert werden. Obwohl IFN α als weiteres Mitglied der Typ I-Interferon-Familie in verschiedenen Zelllinien in der Lage ist, die Expression der in dieser Arbeit untersuchten ISGs zu induzieren, scheint es keine Rolle bei der Induktion der ISGs in den LMX1B-produzierenden HtTA-1-Zellen zu spielen. So sollte im weiteren Verlauf dieser Arbeit aufgeklärt werden, auf welche Weise die Transkription des *IFN β* -Gens durch das LMX1B-Protein induziert wird.

3.3.2 Beide Untereinheiten des IFN α / β -Rezeptors werden in HeLa-Zellen exprimiert

Die verstärkte Expression von Interferon-induzierten Genen in LMX1B-synthetisierenden Zellen scheint auf eine ebenso verstärkte Expression von *IFN β* zurückzuführen zu sein. Voraussetzung für diese Wirkung von IFN β ist jedoch das Vorhandensein des IFN α / β -Rezeptors in den verwendeten HeLa-Zellen. Erst die Interaktion von Zytokin und Rezeptor löst über einen Signaltransduktionsweg die Induktion der ISGs aus. Ist dies gegeben, könnte auch eine erhöhte Expression der Gene für die Rezeptorkomponenten durch die daraus folgende erhöhte Verfügbarkeit des Rezeptors für seinen Liganden ebenfalls einen Teil zur verstärkten Expression der ISGs beitragen.

Alle Typ I-Interferone binden an den gleichen Rezeptor, den IFN α / β -Rezeptor. Interferon- γ besitzt einen eigenen Rezeptor. Beide Rezeptortypen jedoch setzen sich aus zwei Untereinheiten zusammen. Im Fall des IFN α / β -Rezeptors sind das IFNAR1 (Interferon- α / β -Rezeptor 1) und IFNAR2c (Interferon- α / β -Rezeptor 2c). Bei letzterem handelt es sich um das weitaus häufigere von zwei verschiedenen gespleißten Produkten des *IFNAR2*-Gens [Platanias und Fish, 1999].

Durch die Bestimmung ihres Gehalts an IFNAR-mRNA sollte bei den LMX1B-produzierenden Zellen beleuchtet werden, ob *IFNAR1* und *IFNAR2* exprimiert werden, und ob es gegebenenfalls Veränderung bei dieser Expression gibt. Dazu wurden die in Kapitel 3.2.4 beschriebenen Proben für eine Echtzeit-PCR verwendet. In Abbildung 15 sind die Ergebnisse graphisch dargestellt.

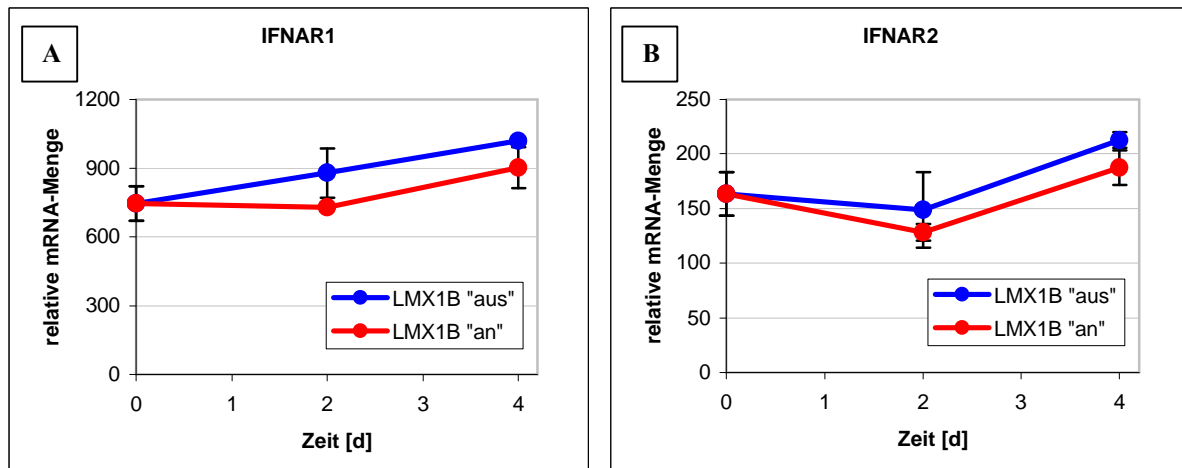


Abbildung 15: RT-qPCR-Analyse der Synthese von IFNAR1- und IFNAR2-mRNA in LMX1B-produzierenden HtTA-1-Zellen. Von 0, 2 und 4 Tagen mit 100 ng/ml (LMX1B „aus“) bzw. ohne (LMX1B „an“) Doxyzyklin gewachsenen HtTA-1/myc-LMX1B-Zellen wurde Gesamt-RNA isoliert, aus der wiederum cDNA synthetisiert wurde. Eine 10 ng RNA äquivalente Menge cDNA wurde pro Reaktion in einer Echtzeit-PCR mit den Primerpaaren hIFNAR1 F1/R1 (A), hIFNAR2 F1/R1 (B) oder hLamA/C F/R (zur Normalisierung) amplifiziert. Sowohl *IFNAR1* als auch *IFNAR2* wurden in den HeLa-Zellen exprimiert, waren in den LMX1B-produzierenden Zellen jedoch nicht erhöht.

Die Gene für die beiden Untereinheiten des IFN α/β -Rezeptors wurden in den HeLa-Zellen exprimiert. Während der 4-tägigen Kultur stieg sowohl bei den induzierten als auch bei den nicht induzierten Zellen die relative mRNA-Menge beider Gene etwas an. Dies bedeutet, dass der Rezeptor an der Oberfläche der HeLa-Zellen exprimiert wird. Die verstärkte IFN β -Synthese bei LMX1B-produzierenden Zellen könnte demnach durch Sekretion des Zytokins und anschließende Bindung an Rezeptoren der gleichen und benachbarter Zellen für die Induktion der Interferon-stimulierten Gene verantwortlich sein.

Im Gegensatz zu der ihres Liganden IFN β war die Transkription der Gene für IFNAR1 und IFNAR2c bei LMX1B-synthetisierenden HtTA-1-Zellen nicht erhöht. Somit ist es unwahrscheinlich, dass eine erhöhte Verfügbarkeit des Interferon- α/β -Rezeptors zu der verstärkten Transkription der Interferon-stimulierten Gene beiträgt. Dies wiederum bedeutet, dass die Anzahl der verfügbaren Rezeptoren pro HtTA-1-Zelle groß genug sein muss, um auch eine erhöhte Anzahl von IFN β -Molekülen binden und dieses Signal in die Zelle weitergeben zu können, in der dann eine Induktion der ISGs bewirkt wird.

3.3.3 Die Expression vieler am Interferon- β -Signalweg beteiligter Gene ist in LMX1B-synthetisierenden Zellen erhöht

Eine weitere Komponente der am weitesten verbreiteten Signaltransduktionswege, die zur Induktion der Interferon-stimulierten Gene führen, sind STATs („signal transducer and activator of transcription“). Am häufigsten wird nach Bindung von IFN β an den IFN α/β -Rezeptor die Bildung eines Heterodimers aus STAT1 und STAT2 ausgelöst [Parmar und Platanias, 2003]. Der STAT1/2-Heterokomplex wandert in den Zellkern und bildet dort zusammen mit IRF-9 („interferon regulatory factor 9“) den Komplex ISGF3 („interferon-stimulated gene factor 3“). Dieser Transkriptionsfaktor induziert die Transkription von ISGs [Stark et al., 1998]. Andere IFN β -induzierte Komplexe enthalten Homo- oder Heterodimere von STAT1, STAT3, STAT5a oder STAT5b [Parmar und Platanias, 2003].

Da die STATs, vor allem STAT1 und STAT2, eine wichtige Rolle bei der Induktion der ISGs spielen, wäre denkbar, dass eine Verstärkung der Expression ihrer Gene auch Bestandteil der Maschinerie ist, die in LMX1B-synthetisierenden HtTA-1-Zellen zur erhöhten Transkription der ISGs führt. Auch dies sollte mit Hilfe einer RT-qPCR überprüft werden.

Dazu wurde für eine RT-qPCR-Analyse der *STAT1*-, *STAT2*- und *STAT5a*-Expression erneut auf die in Kapitel 3.2.4 beschriebenen Proben zurückgegriffen. Um Material zu sparen, wurden dieses Mal jedoch nur die Proben von Tag 4 miteinander verglichen. Abbildung 16 zeigt das Ergebnis dieses Versuchs.

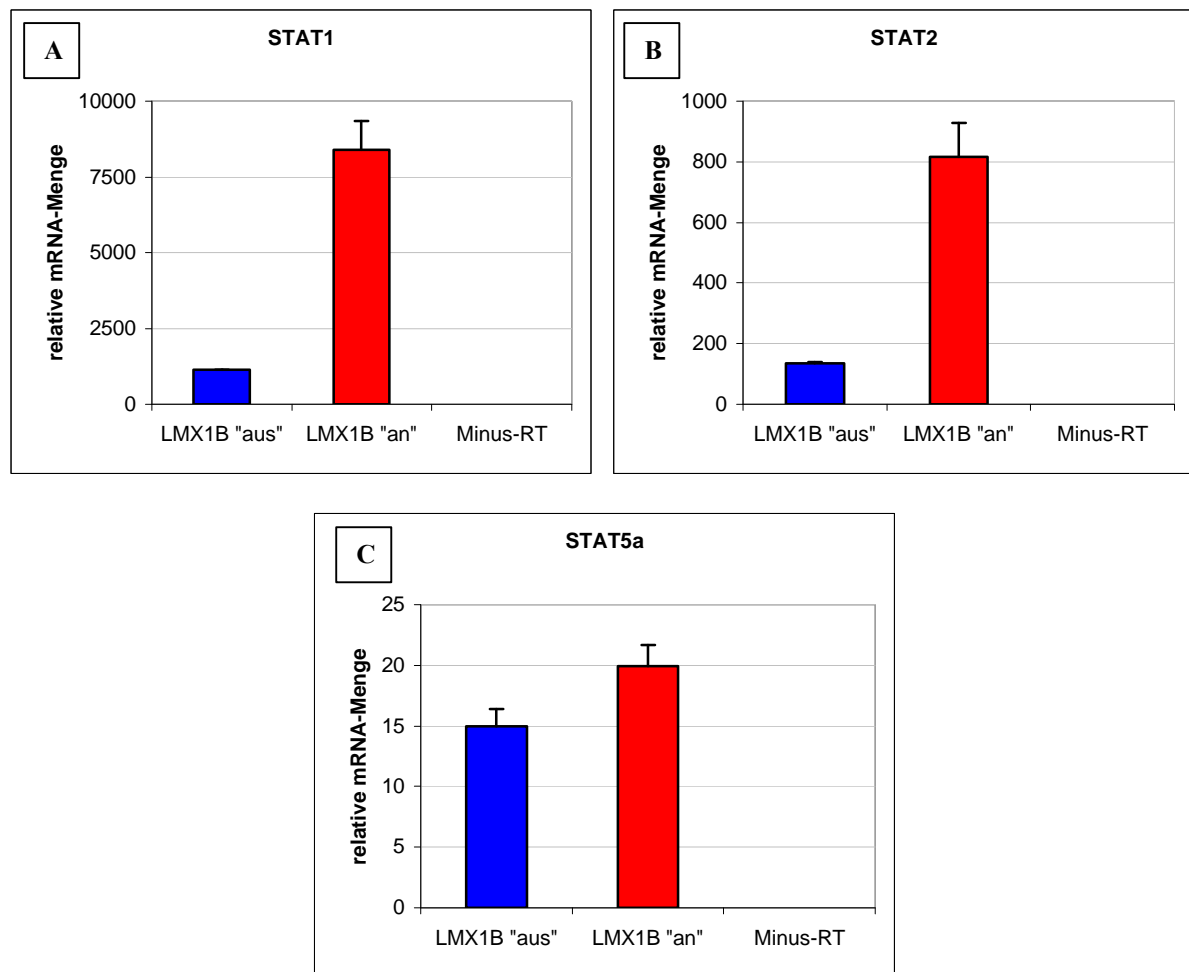


Abbildung 16: RT-qPCR-Analyse der Expression von *STAT1*, *STAT2* und *STAT5a* nach 4-tägiger Kultur von LMX1B-produzierenden HtTA-1-Zellen. Eine 10 ng RNA entsprechende Menge cDNA von HtTA-1-Zellen, die 4 Tage mit (LMX1B „aus“) oder ohne (LMX1B „an“) 100 ng/ml Doxyzyklin gewachsen waren, wurde pro Echtzeit-PCR-Reaktion eingesetzt, bei der für die Amplifikation die Primerpaare hSTAT1 F1/R1 (A), hSTAT2 F1/R1 (B), hSTAT5a F/R (C) oder hLamA/C F/R (zur Normalisierung) verwendet wurden. Die relative Menge von STAT1-mRNA war in LMX1B-produzierenden Zellen auf das 7,4-fache, die von STAT2-mRNA auf das 6,0-fache und die von STAT5a-mRNA auf das 1,3-fache erhöht.

Der Vergleich der nicht induzierten und induzierten Zellen zeigte, dass die Transkription der getesteten *STAT*-Gene bei den induzierten Zellen schwach bis deutlich erhöht war. So wiesen die LMX1B-produzierenden HtTA-1-Zellen die 7,4-fache Menge von STAT1-mRNA auf, die relative STAT2-mRNA-Menge betrug das 6-fache. Die Transkription von *STAT5a* dagegen war nur äußerst schwach auf das 1,3-fache erhöht.

Somit scheint eine verstärkte Expression von *STAT1* und *STAT2*, deren Produkte am wichtigsten Signaltransduktionsweg von Typ I-Interferon beteiligt sind, mit zur erhöhten

Expression der ISGs beizutragen. Eine erhöhte Zahl von STAT1- und STAT2-Molekülen könnte das verstärkte, am IFN α/β -Rezeptor eintreffende Signal entsprechend weiterleiten.

Auch eine Familie von Transkriptionsfaktoren, die IRFs („interferon regulatory factors“), spielt v.a. nach einer Virusinfektion eine wichtige Rolle bei der Expression von Interferon-stimulierten Genen und der IFN α/β -Gene selbst. Im Zusammenhang mit STAT1 und STAT2 wurde bereits IRF-9 erwähnt, welches als Komponente von ISGF3 die Transkription von ISGs durch Bindung an deren ISREs aktiviert. *IRF-9* selbst ist durch Interferon induzierbar [Takaoka und Taniguchi, 2003].

Da die Expression von *STAT1* und *STAT2*, mit deren Produkten IRF-9 den Komplex ISGF3 bildet, in LMX1B-synthetisierenden HtTA-1-Zellen deutlich erhöht ist, liegt die Vermutung nahe, dass auch *IRF-9* stärker exprimiert wird. *IRF-1*, *IRF-2* und *IRF-7* sind wie die bereits getesteten ISGs *GIP3* oder *ISG15* durch IFN α/β induzierbar, daher könnte man auch bei ihnen eine erhöhte Transkription erwarten. Aus diesem Grund sollte die Expression dieser drei Gene sowie die des Gens für IRF-3, welches eine bedeutende Rolle bei der Induktion von *IFN β* spielt, mit Hilfe der RT-qPCR überprüft werden. Für dieses Experiment wurden erneut die in Kapitel 3.2.4 beschriebenen Proben verwendet. In Abbildung 17 sind die Messergebnisse gezeigt.

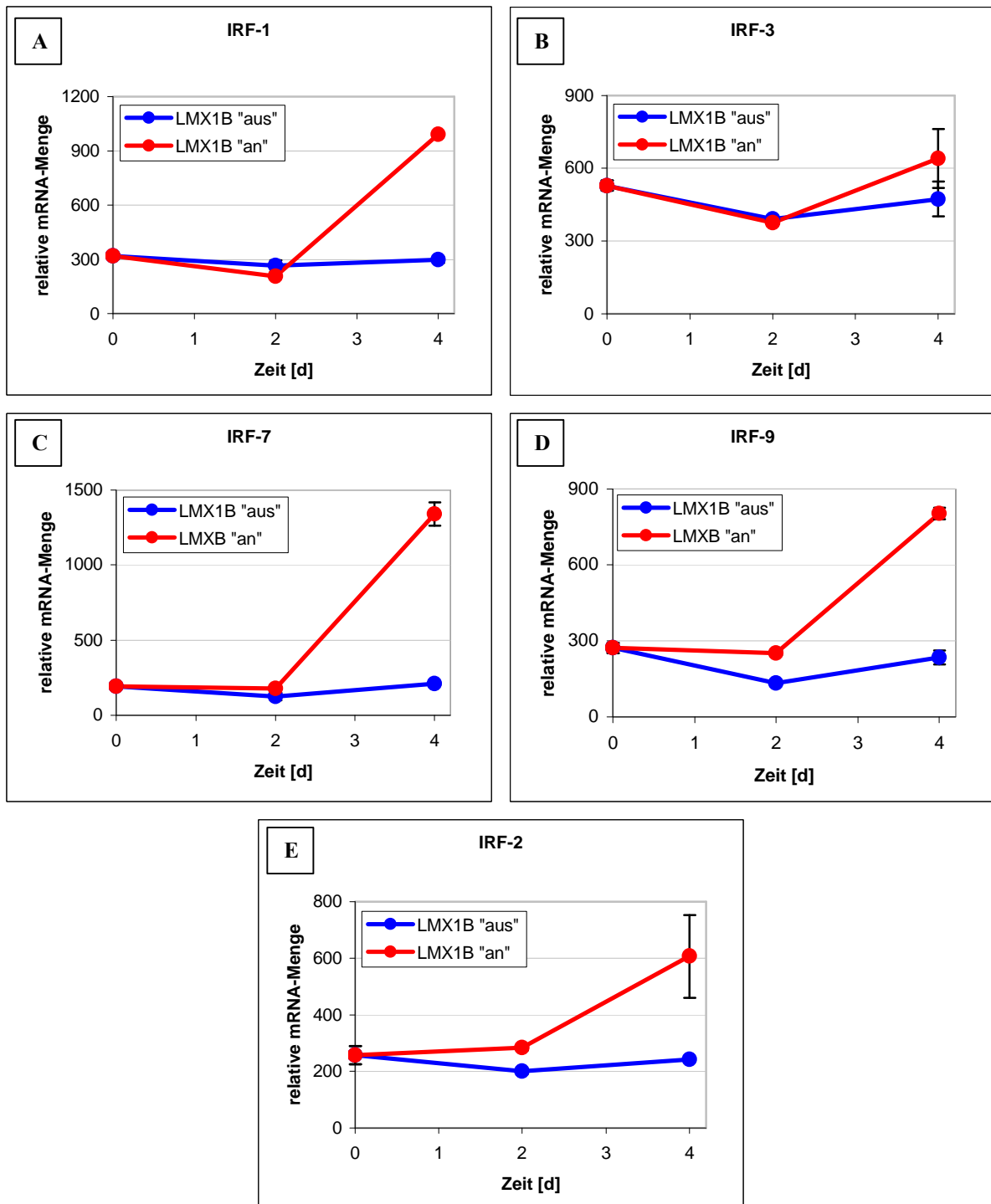


Abbildung 17: RT-qPCR-Analyse der Expression verschiedener Gene für IRFs bei LMX1B-synthetisierenden HtTA-1-Zellen. Aus 0, 2 und 4 Tage mit 100 ng/ml Doxyzyklin (LMX1B „aus“) bzw. ohne Doxyzyklin (LMX1B „an“) kultivierten HtTA-1/myc-LMX1B-Zellen wurde zunächst Gesamt-RNA isoliert, aus der dann cDNA synthetisiert wurde. Eine 10 ng RNA entsprechende Menge von dieser wurde in Echtzeit-PCR-Reaktionen mit den Primerpaaren hIRF1 F1/R1 (A), hIRF3 F1/R1 (B), hIRF7 F2/R2 (C), hIRF9 F2/R2 (D), hIRF2 F1/R1 (E) oder hLamA/C F/R zur Normalisierung eingesetzt. Die Expression von *IRF-1*, *IRF-7* und *IRF-9* war in LMX1B-produzierenden Zellen deutlich, die von *IRF-2* schwach, und die von *IRF-3* nicht erhöht.

Die Expression war bei der Mehrzahl der getesteten *IRF*-Gene deutlich erhöht. Die stärkste Erhöhung war bei *IRF-7* zu erkennen, dessen mRNA-Gehalt in LMX1B-produzierenden Zellen auf das 6,4-fache gesteigert war. Außerdem zeigten die LMX1B-produzierenden Zellen die 3,4-fache Menge an mRNA von *IRF-9*, des Gens, dessen Produkt an STAT1 und STAT2 bindet. Mit der 3,3-fachen Menge an mRNA verhielt sich *IRF-1* ähnlich, *IRF-2* lag mit einem Anstieg auf das 2,5-fache etwas darunter. Somit ist denkbar, dass diese IRFs zu den Prozessen beitragen, die angeschaltet sind, wenn das LMX1B-Protein in den HtTA-1-Zellen hergestellt wird, und in deren Verlauf die Expression von *IFN β* und verschiedenen ISGs angeschaltet bzw. gesteigert ist. Die IRF-3-mRNA-Menge blieb in LMX1B-synthetisierenden Zellen dagegen unverändert.

Die Proteinkinase PKR („dsRNA-dependent protein kinase“) ist eine wichtige Komponente der antiviralen und antiproliferativen Wirkung von Interferonen [Donzé et al., 2004]. Dies machte PKR interessant für die vorliegenden Studien an den LMX1B-produzierenden Zellen. Die Behandlung von Zellen mit Interferonen vom Typ I erhöht die Transkription von *PKR* [Meurs et al. 1990], weshalb auch häufig von der „interferon-inducible, dsRNA-dependent protein kinase“ gesprochen wird. Sie hilft bei der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B [Zamanian-Daryoush et al., 2000], der dann die Transkription weiterer z.B. am Zellzyklus beteiligter Gene induziert. Mit den bereits in Kapitel 3.2.4 eingesetzten cDNA-Proben wurde die Expression von *PKR* in LMX1B-produzierenden Zellen in einer Echtzeit-PCR überprüft. Abbildung 18 zeigt das Ergebnis dieses Versuchs.

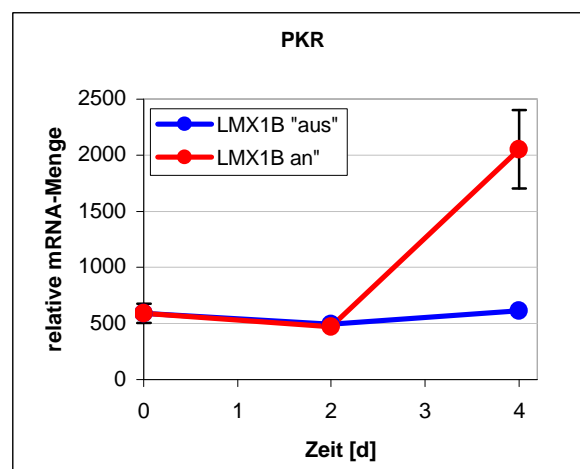


Abbildung 18: RT-qPCR-Analyse der Expression von *PKR* in LMX1B-produzierenden HtTA-1-Zellen. HtTA-1/myc-LMX1B-Zellen wurden mehrere Tage in Medium mit 100 ng/ml Doxyzyklin kultiviert, abgelöst und dann in Medium mit (LMX1B „aus“) oder ohne (LMX1B „an“) Doxyzyklin wieder

ausgesät (Tag 0). Wie später an Tag 2 und Tag 4 wurden Zellen schockgefroren, um zuerst Gesamt-RNA zu isolieren und anschließend aus 1 µg von dieser cDNA zu synthetisieren. Davon wurde eine 10 ng RNA äquivalente Menge in eine Echtzeit-PCR-Reaktion eingesetzt, für die entweder das Primerpaar hPKR F1/R1 oder das Primerpaar hLamA/C F/R (zur Normalisierung) verwendet wurde. Die Expression von *PKR* war in LMX1B-synthetisierenden Zellen auf das 3,3-fache erhöht.

Die Transkription von *PKR* war tatsächlich in induzierten, LMX1B-produzierenden Zellen im Vergleich zu nicht induzierten Zellen auf das 3,3-fache erhöht. Mit *PKR* scheint demnach eine weitere Komponente der durch LMX1B ausgelösten, über den IFN β -Signalweg vermittelten Ereignisse zu sein.

Ein weiterer Ansatzpunkt zur Untersuchung der von LMX1B ausgelösten Induktion von *IFN β* und anderen Genen ist die Familie der Toll-like Rezeptoren (TLRs). Das TLR-System spielt eine wichtige Rolle bei der schnellen Bekämpfung mikrobieller Infektionen im Rahmen der angeborenen Immunität, da Toll-like Rezeptoren wirtsfremde Strukturen erkennen und dies der Zelle signalisieren [Schnare et al., 2006]. TLR3 und TLR4 sind in der Lage, IRF3 und IRF7 zu aktivieren [Moynagh, 2005]. Beides kann zur Induktion von Typ I-Interferonen und darauf folgend zur Induktion von Interferon-stimulierten Genen führen. Des Weiteren gibt es Berichte über die Induzierbarkeit von TLRs durch Interferone vom Typ I [Miettinen et al., 2001]. Zurzeit sind 10 humane TLRs bekannt (TLR1 bis TLR10), die sich im Spektrum ihrer Liganden und ihrer Expression voneinander unterscheiden [Anders et al., 2004].

Anhand der in Kapitel 3.2.4 beschriebenen cDNA-Proben wurde die Expression von *TLR3*, *TLR4*, *TLR7*, *TLR8* und *TLR9* nach LMX1B-Produktion untersucht. Diese Gene wurden ausgewählt, da nach Aktivierung der von ihnen kodierten Rezeptoren eine Stimulation der IFN-Produktion nachgewiesen wurde [Hertzog et al., 2003; Mogensen und Paludan, 2005].

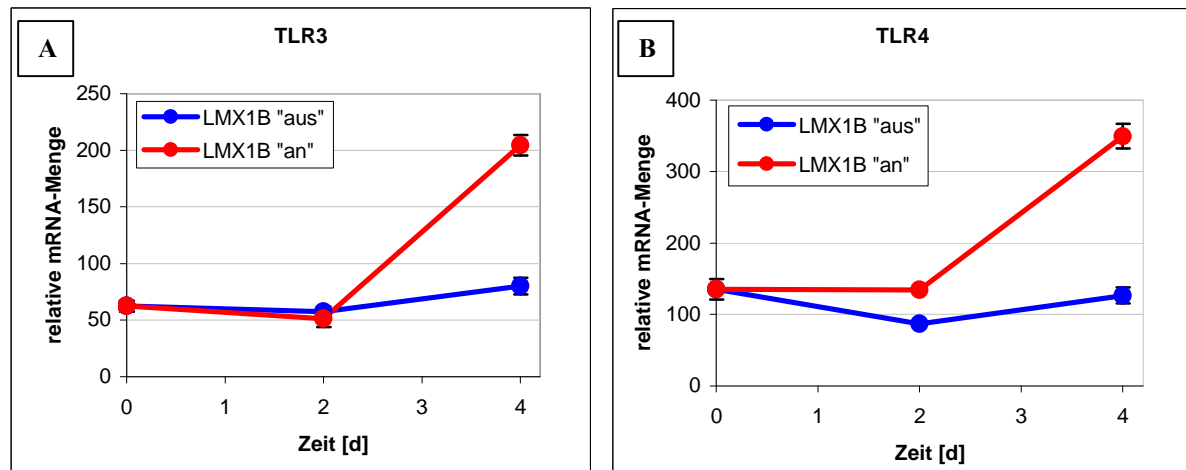


Abbildung 19: RT-qPCR-Analyse der Expression von *TLR3* und *TLR4* in LMX1B-synthetisierenden HtTA-1-Zellen. HtTA-1/myc-LMX1B-Zellen wurden nach mehrtägiger Kultur in Medium mit 100 ng/ml Doxozyklin zum einen Teil als Probe geerntet (Tag 0), zum anderen Teil wieder in Medium mit (LMX1B „aus“) oder ohne (LMX1B „an“) ausgesät. An Tag 2 und Tag 4 erfolgte erneut eine Probenentnahme. Aus allen Proben wurde Gesamt-RNA isoliert, diese wurde in cDNA umgeschrieben. Mit einer 10 ng RNA entsprechenden Menge cDNA pro Reaktion und den Primerpaaren hTLR3 F1/R1 (A), hTLR4 F1/R1 (B) oder hLamA/C F/R wurde eine Echtzeit-PCR durchgeführt. Sowohl die Expression von *TLR3* als auch die von *TLR4* war in den induzierten Zellen erhöht.

TLR7-, TLR8- und TLR9-mRNA konnte in den HtTA-1-Zellen nicht nachgewiesen werden, die entsprechenden Diagramme sind aus diesem Grund nicht gezeigt. Es ist davon auszugehen, dass diese Zellen keinen der drei Rezeptoren produzieren. *TLR3* und *TLR4* dagegen wurden exprimiert, wobei ein Unterschied zwischen den induzierten und nicht induzierten Zellen festgestellt werden konnte. Abbildung 19 zeigt die relativen TLR3- und TLR4-mRNA-Mengen, die in den Proben detektiert wurden. Die Expression von *TLR3* war in induzierten, also LMX1B-synthetisierenden Zellen gegenüber den nicht induzierten Zellen auf das 2,6-fache erhöht, die von *TLR4* auf das 2,8-fache. Damit scheinen auch diese beiden Rezeptoren Teil der in den LMX1B-produzierenden Zellen beobachteten Veränderungen zu sein.

3.3.4 Auch die Expression des Gens für Interleukin-6 ist in LMX1B-synthetisierenden Zellen erhöht

Interleukin-6 (IL-6) wurde zuerst als Interferon- β 2 beschrieben, dessen Expression in menschlichen Fibroblasten mit PolyI:C stimuliert werden konnte [Weissenbach et al., 1980]. Es wurde von anderen Gruppen unabhängig unter anderen Namen beschrieben, bevor man diesem multifunktionalen Protein seinen heutigen Namen gab. Es ist wie IFN β ein Zytokin und spielt eine wichtige Rolle u.a. bei Zellwachstum, Zelldifferenzierung und Apoptose z.B. im Immun- oder blutbildenden System oder bei der Tumorbildung [Kamimura et al., 2003]. Mit IFN β verbindet IL-6 nicht nur seine ursprüngliche Bezeichnung, seine Klassifizierung als Zytokin und seine Beteiligung an ähnlichen Prozessen, sondern auch die Signalweitergabe über JAKs und STATs [Kamimura et al., 2003], seine Zugehörigkeit zur Gruppe der NF- κ B-Zielgene [Pahl, 1999] und eine gewisse Beeinflussbarkeit seiner Expression durch IFN β [Mitani et al., 2001; Berger und Hawley, 1997]. Aus diesen Gründen war es interessant, auch die Expression von *IL-6* bei HfTA-1-Zellen, die LMX1B überexprimiert produzieren, zu untersuchen. Auch dieses Mal wurden die in Kapitel 3.2.4 beschriebenen Proben für die Echtzeit-PCR verwendet.

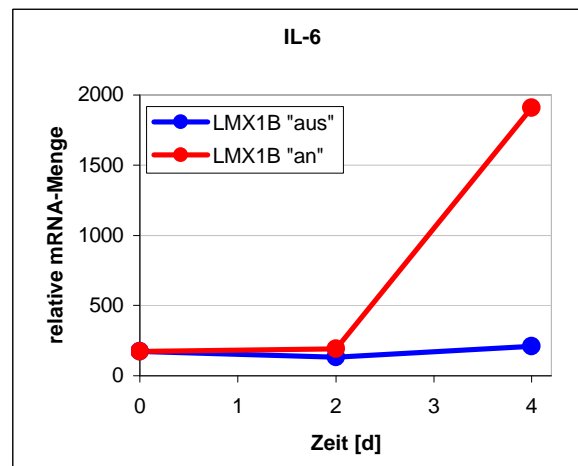


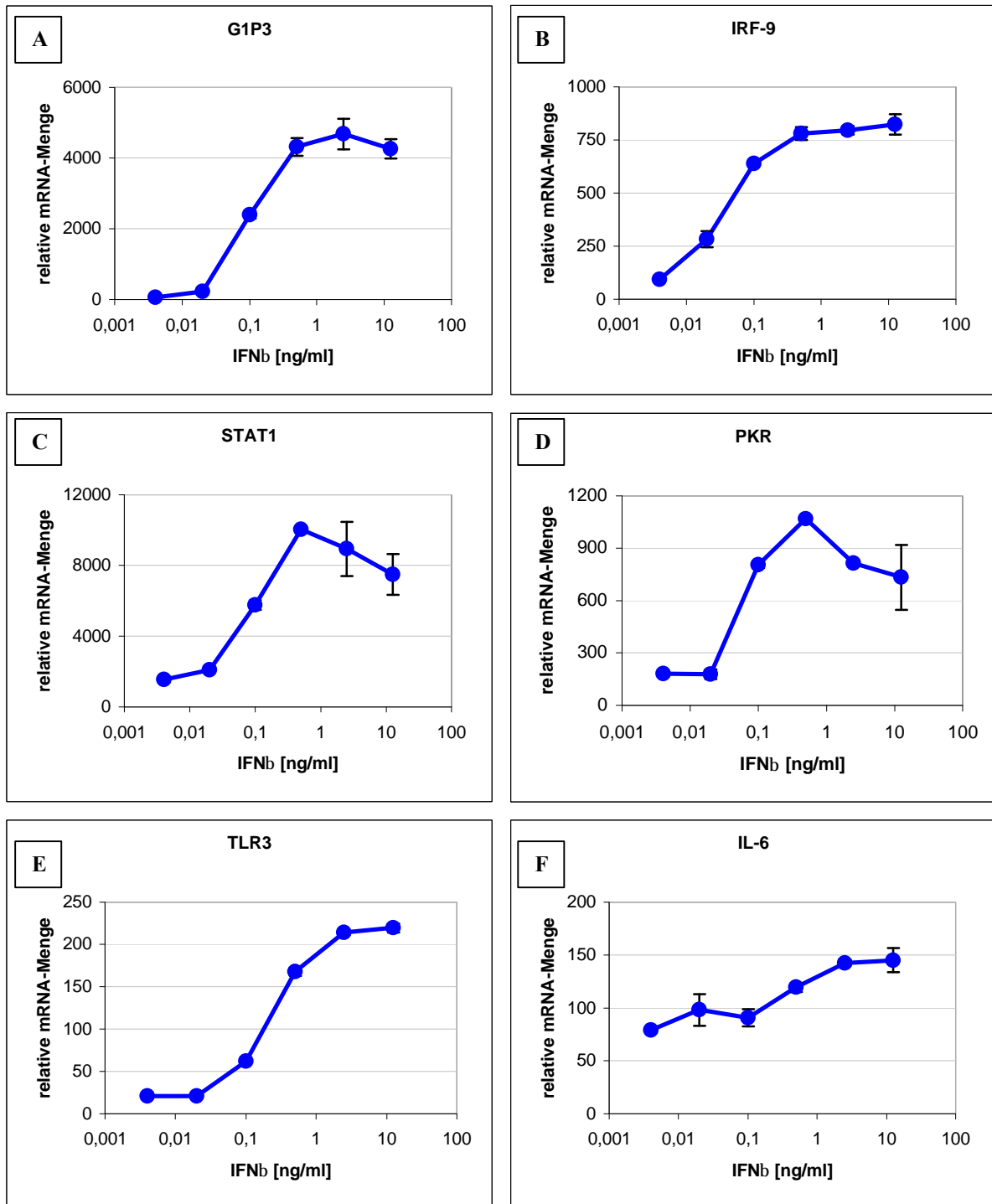
Abbildung 20: RT-qPCR-Analyse der Expression des Gens für IL-6 in LMX1B-produzierenden HfTA-1-Zellen. HfTA-1/myc-LMX1B-Zellen wurden entweder in Medium mit 100 ng/ml Doxyzyklin (LMX1B „aus“) oder in Medium ohne Doxyzyklin (LMX1B „an“) für 0, 2 und 4 Tage kultiviert. Aus den geernteten Zellen wurde Gesamt-RNA isoliert, die dann verwendet wurde, um cDNA zu synthetisieren. Eine 10 ng RNA äquivalente Menge von letzterer wurde in jede PCR-Reaktion eingesetzt. Zur Amplifizierung wurden die Primerpaare hIL-6 F1/R1 und hLamA/C F/R verwendet. Die relative IL-6-mRNA-Menge war in induzierten Zellen auf das 9,1-Fache erhöht.

Wie im Diagramm der Abbildung 20 zu erkennen, exprimierten die HtTA-1/myc-LMX1B-Zellen auch im nicht induzierten Zustand jederzeit in geringem Umfang *IL-6*. An Tag 2 war diese Expression in den induzierten Zellen schwach erhöht. Nach 4-tägiger Induktion betrug die relative mRNA-Menge von *IL-6* in induzierten Zellen dann das 9,1-fache der nicht induzierten Zellen. Damit folgte auch die Transkription von *IL-6* wie z.B. die von *IFN β* der LMX1B-Expression. Das Zusammenspiel aller Komponenten ist komplex und sollte in weiteren Versuchen näher analysiert werden.

3.3.5 Unter den in LMX1B-produzierenden Zellen induzierten Genen gibt es bezüglich ihrer Stimulierbarkeit durch IFN β zwei verschiedene Klassen

Wie in Kapitel 3.2.1 und 3.2.4 gezeigt, weisen induzierte HtTA-1-Zellen, die das LMX1B-Protein überexprimiert produzieren, eine erhöhte Expression von Interferon-induzierten Genen, und zwar solchen, die durch Interferon vom Typ I induziert werden (siehe Kapitel 3.3.1), auf. Auch Interferon- β , eines der Typ I-Interferone, wird verstärkt transkribiert. Das gleiche gilt für mehrere getestete STAT- und IRF-Proteine, Toll-like-Rezeptoren und PKR, die alle an der komplexen Regulation der Transkription von *IFN β* und ISGs beteiligt sind. *IFN β* kann nach seiner Synthese von der betreffenden Zelle sezerniert werden und in Form einer positiven Rückkopplung seine eigene Transkription in derselben und benachbarten Zellen steigern [Malmgaard, 2004]. Die Synthese von Interferonen und Interferon-induzierten Genen wird hauptsächlich durch eine Infektion der Zelle ausgelöst, *IFN α* und *IFN β* scheinen jedoch auch wachstums- und immunregulatorische Effekte zu besitzen und könnten ein wichtiges Bindeglied zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort sein [Biron, 2001]. Zu welchem Zweck, in welcher Form und an welcher Stelle LMX1B in die beschriebenen Regulationsmechanismen eingreift, sollte nun geklärt werden. Dazu erschien es sinnvoll, das postulierte *IFN β* -Regulationssystem in der verwendeten Zelllinie, den HtTA-1-Zellen, zu überprüfen und näher zu charakterisieren. Durch eine Stimulation mit Interferon- β sollte analysiert werden, welche der in LMX1B-synthetisierenden Zellen verstärkt transkribierten Gene in diesen Zellen *IFN β* -stimulierbar sind, und mit welcher Kinetik dies geschieht. Erhofft wurden davon Hinweise auf ein Gen, das möglicherweise nicht oder nur in geringem Maße durch *IFN β* stimulierbar und auf die Aktivität von LMX1B angewiesen ist.

Für diesen Versuch wurden für zwei Tage kultivierte HtTA-1-Zellen nach einem Mediumwechsel für 8 h mit 0, 0,02, 0,1, 0,5, 2,5 oder 12,5 ng/ml IFN β inkubiert. Aus den Zellproben wurde dann Gesamt-RNA isoliert, die dann für die Echtzeit-PCR in cDNA umgeschrieben wurde. Abbildung 21 zeigt die relative mRNA-Menge der untersuchten Gene.



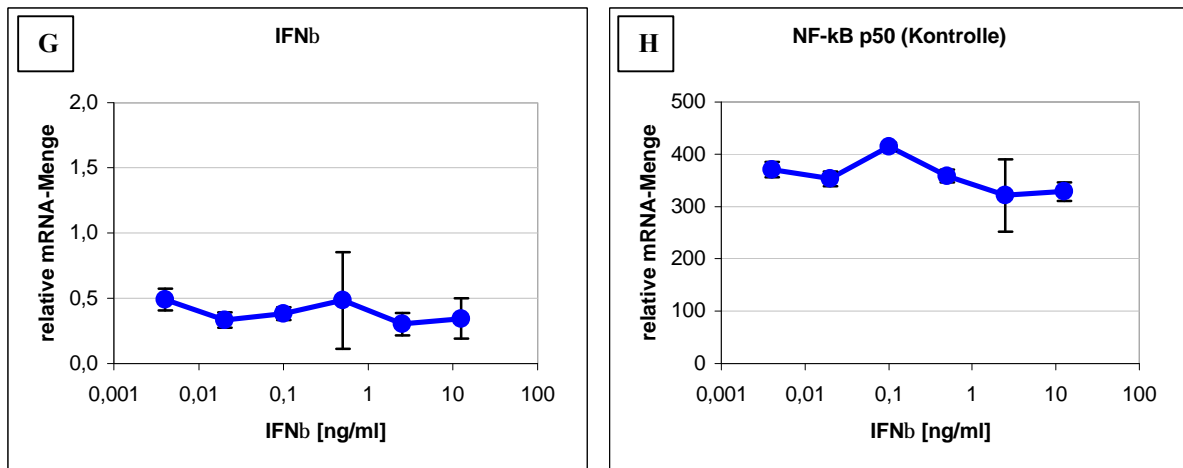


Abbildung 21: RT-qPCR-Analyse der Expression verschiedener am IFN β -System beteiligter Gene und *LMX1B* nach Inkubation mit IFN β . HtTA-1-Zellen wurden für 8 h mit 0, 0,02, 0,1, 0,5, 2,5 bzw. 12,5 ng/ml IFN β inkubiert und dann geerntet. Zunächst wurde Gesamt-RNA isoliert, dann aus je 1 μ g von dieser cDNA synthetisiert. Eine 10 ng RNA entsprechende Menge cDNA wurde anschließend in jede PCR-Reaktion eingesetzt. Zur Amplifikation wurden die Primerpaare hG1P3 F1/R1 (A), hIRF9 F2/R2 (B), hSTAT1 F1/R1 (C), hPKR F1/R1 (D), hTLR3 F1/R1 (E), hIL-6 F1/R1 (F), hIFN β F1/R1 (G), hNF- κ B p50 F1/R1(H), und hLamA/C F/R (zur Normalisierung) verwendet. Die Expression der Gene *GIP3*, *IRF-9*, *STAT1*, *PKR* und *TLR3* ließ sich bereits mit geringen IFN β -Konzentrationen stark stimulieren, die des Gens für Interleukin-6 auch mit hohen Konzentrationen nur sehr schwach. Die Transkription von *IFN β* und der Kontrolle *NF- κ B p50* war von den eingesetzten Konzentrationen des Zytokins unbeeinflusst.

Die fünf Gene *GIP3*, *IRF-9*, *STAT1*, *PKR* und *TLR3* zeigten die größte Stimulierung durch Interferon- β . Die Kurven von *GIP3*, *STAT1* und *PKR* weisen einen steilen Anstieg zwischen den Konzentrationen 0,02 und 0,5 ng/ml, die von *IRF-9* zwischen 0 und 0,5 ng/ml und die von *TLR3* zwischen 0,02 ng/ml und 2,5 ng/ml auf. Bei höheren IFN β -Konzentrationen erreichen sie ein Plateau. Auf diesem betrug die Erhöhung der Transkription bei *GIP3* das 74-fache, bei *IRF-9* das 8,7-fache, bei *STAT1* das 9,7-fache, bei *PKR* das 5,9-fache und bei *TLR3* das 10,4-fache. Die Expression des „klassischen“ Interferon-stimulierbaren Gens *GIP3* wurde durch den IFN β -Puls nicht nur am meisten gesteigert, sie reagierte auch am empfindlichsten auf eine niedrige Dosis des Zytokins. 0,02 ng/ml erhöhten sie bereits auf das 3,7-fache. Als ebenso sensibel auf die IFN β -Stimulierung reagierend und damit in diese Gruppe von Genen passend erwiesen sich auch *IRF-1*, *IRF-7* und *STAT2* (Daten nicht gezeigt).

Das für Interleukin-6 kodierende Gen war in diesem Versuch ebenfalls durch IFN β stimulierbar, jedoch in weit geringerem Maße als die zuvor beschriebenen Gene. Die Steigung der zugehörigen Kurve ist äußerst flach, und das Plateau wird erst mit 2,5 ng/ml erreicht. Der Maximalwert der Erhöhung lag gerade einmal beim 1,8-fachen des Basiswertes. Die Expression von *IFN β* dagegen konnte durch Inkubation mit den angegebenen Konzentrationen des von ihm kodierten Proteins nicht erhöht werden. Sie verblieb auf ihrem niedrigen Basisniveau. Das gleiche gilt für die Expression des Gens für NF- κ B p50. Der Transkriptionsfaktor NF- κ B kann zwar durch Interferon- α oder - β auf Proteinebene aktiviert werden [Yang et al., 2005], es gibt bisher jedoch keine Hinweise darauf, dass die Expression der Gene für seine Komponenten durch Interferon stimulierbar ist. Aus diesem Grund wurde bei diesem Versuch die Transkription des für die NF- κ B-Komponente p50 kodierenden Gens *NF- κ B1* als eine Negativkontrolle gemessen. Es scheint also unter den in LMX1B-synthetisierenden Zellen verstärkt exprimierten Genen zwei verschiedene Gruppen zu geben: durch IFN β induzierbare wie *GIP3*, *IRF-9*, *IRF-1*, *IRF-7*, *STAT1*, *STAT2*, *PKR* und *TLR3* und nicht oder nur schwach induzierbare wie *IFN β* und *IL-6*.

Nun stellte sich die Frage, ob die Expression von *IFN β* in HtTA-1-Zellen wirklich nicht durch die Stimulation mit dem IFN β -Protein erhöht werden kann. Das akzeptierte Modell der *IFN β* -Regulation postuliert diesen positiven Rückkopplungsmechanismus. Aufgrund dessen sollte überprüft werden, ob eine verlängerten Inkubationszeit bzw. eine Kombination aus verlängerter Inkubationszeit und höherer Konzentration des Zytokins eine Stimulierung bewirken könnte. Auch für das Interleukin-6-Gen, das im oben beschriebenen Experiment nur eine schwache Erhöhung seiner Expression gezeigt hatte, sollte dies getestet werden. Als Beispiel eines stark stimulierbaren Gens wurde auch *IRF-9* untersucht.

Für diesen modifizierten Versuch wurden HtTA-1-Zellen nach zwei Tagen mit frischem Kulturmedium versetzt. Diesem wurden dann 0, 12,5 oder 62,5 ng/ml Interferon- β zugesetzt. Die Inkubationszeit betrug hier 48 h. Das Ergebnis der mit aus den Zellproben hergestellten cDNA durchgeführten Echtzeit-PCR ist in Abbildung 22 gezeigt.

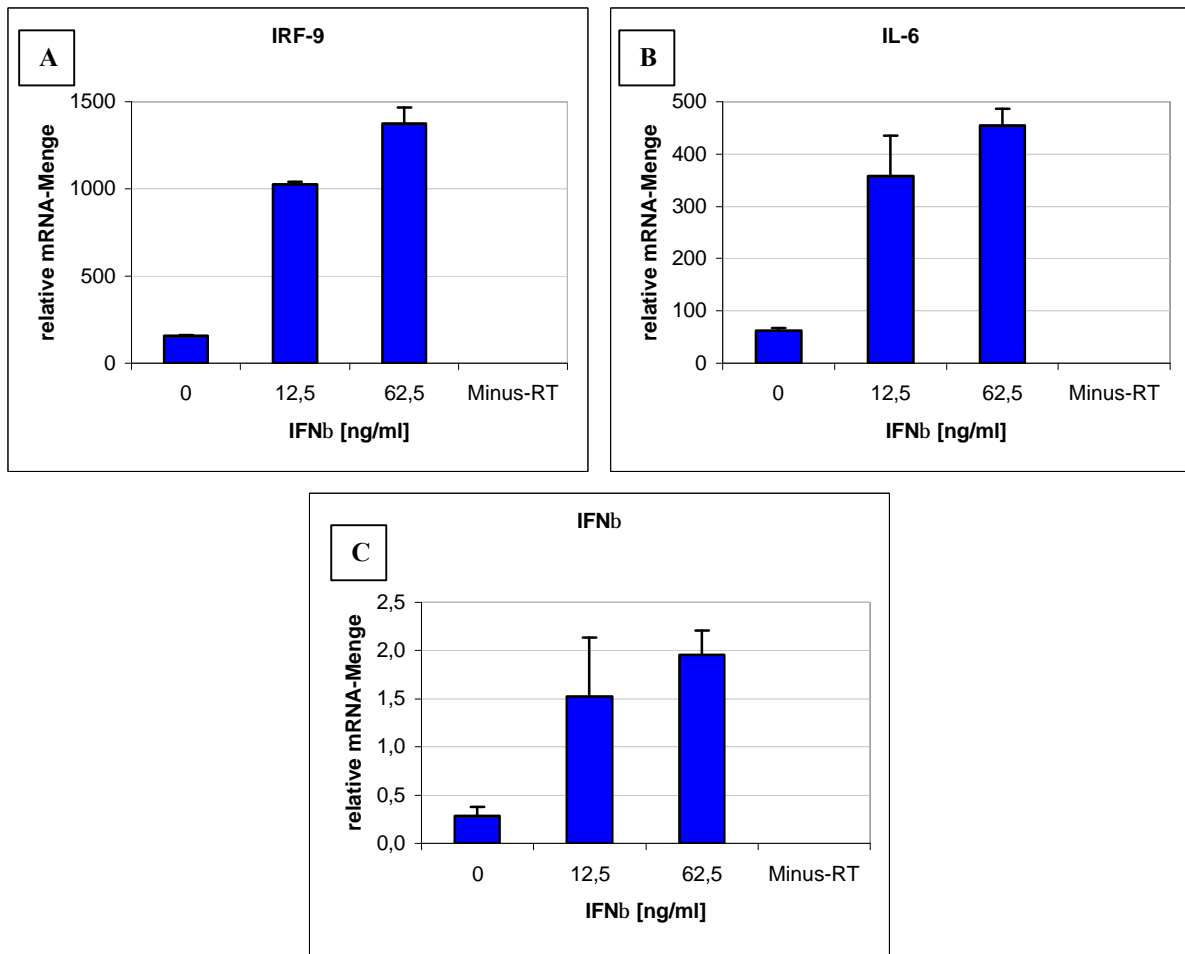


Abbildung 22: RT-qPCR-Analyse der Expression von *IRF-9*, *IL-6* und *IFNβ* nach längerer Inkubation mit höherer Dosis von IFNβ. HtTA-1-Zellen wurden für 48 h mit 0, 12,5 bzw. 62,5 ng/ml IFNβ inkubiert und dann geerntet. Aus je 1 µg der darauf folgend isolierten Gesamt-RNA wurde cDNA synthetisiert. In jede PCR-Reaktion wurde anschließend eine 10 ng RNA entsprechende Menge cDNA eingesetzt. Zur Amplifikation wurden die Primerpaare hIRF9 F2/R2 (A), hIFNβ2 F1/R1 (B), hIFNβ F1/R1 (C), und hLamA/C F/R (zur Normalisierung) verwendet. Die Expression aller drei Gene konnte nach 48-stündiger Inkubation mit IFNβ gesteigert werden. Eine Erhöhung der Zytokin-Konzentration bewirkte noch einen weiteren Steigerungseffekt.

Bei der Negativkontrolle ohne Interferon-β waren die relativen mRNA-Mengen aller drei Gene vergleichbar mit den Werten des vorausgegangenen Versuchs mit 8-stündiger Inkubationszeit. Die Expression von *IRF-9* wurde wie schon nach 8-stündiger auch nach 48-stündiger Inkubation mit 12,5 ng/ml IFNβ deutlich gesteigert und ließ sich mit der auf 62,5 ng/ml erhöhten Konzentration des Zytokins noch weiter steigern. Allerdings konnte auch hier nur eine Erhöhung auf das 8,7-fache erreicht werden, was dem im vorherigen Versuch erzielten Faktor entspricht. Während nach 8-stündiger Inkubation mit 12,5 ng/ml IFNβ die Transkription des Gens für Interleukin-6 nur auf das 1,8-fache erhöht werden konnte, wurde nach 48-stündiger Inkubation bereits das 5,8-fache erreicht, mit der höheren Konzentration

sogar das 7,3-fache. Bei *IFN β* war nach der kürzeren Inkubationszeit keinerlei Effekt auf die Expression zu beobachten gewesen. Dies ist nach 48 h deutlich anders. Hier ergaben sich eine Steigerung auf das 5,2-fache mit 12,5 ng/ml Interferon und eine Steigerung auf das 6,8-fache mit 62,5 ng/ml. Dies bestätigt nun die Möglichkeit eines positiven Rückkopplungsmechanismus für Interferon- β auch in HtTA-1-Zellen. Auffällig ist jedoch, dass die Expression des *IL-6*- und in stärkerem Maß die des *IFN β* -Gens wesentlich weniger sensibel auf die Einwirkung des Zytokins reagiert als die der untersuchten Gene für *IRF-9*, *STAT1* oder *GIP3*. Dies scheint umso bedeutungsvoller, wenn man die durch induzierte Synthese von LMX1B bewirkte Induktion der Gene betrachtet. Tabelle 20 zeigt einen Vergleich zwischen den auf diese beiden Arten erzielten Induktionen.

	LMX1B-Synthese	Tendenz	IFNβ-Stimulation
<i>GIP3</i>	15	<<<	74
<i>IRF-9</i>	3,4	<<	8,7
<i>STAT1</i>	7,4	<	9,7
<i>IL-6</i>	9,1	>	7,3
<i>IFNβ</i>	44	>>>	6,8

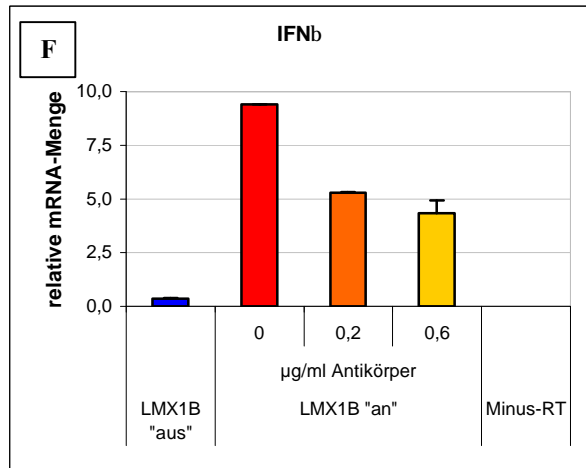
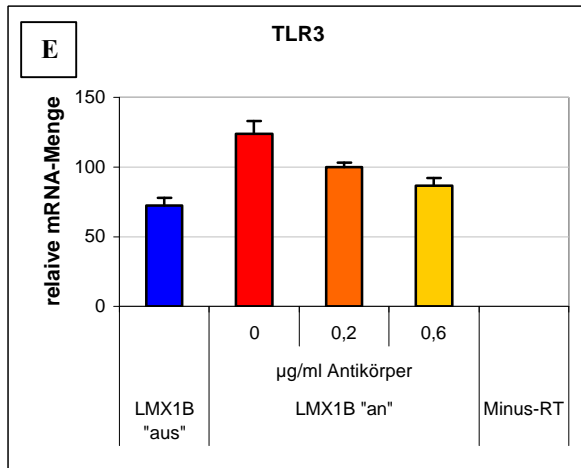
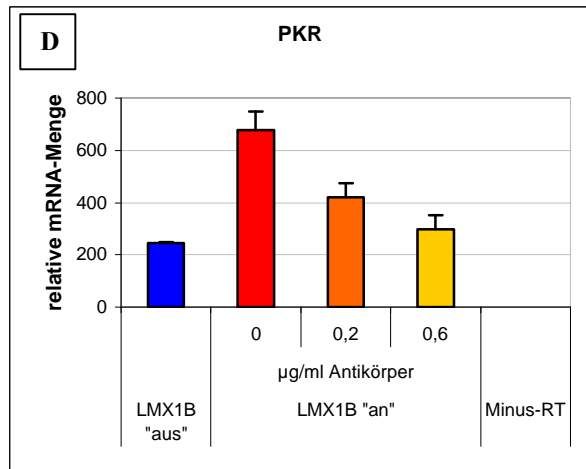
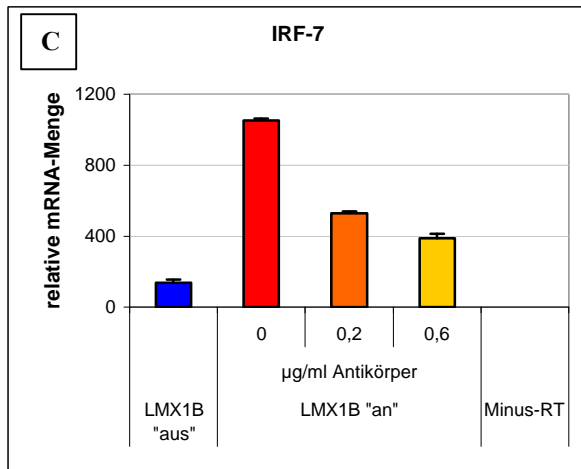
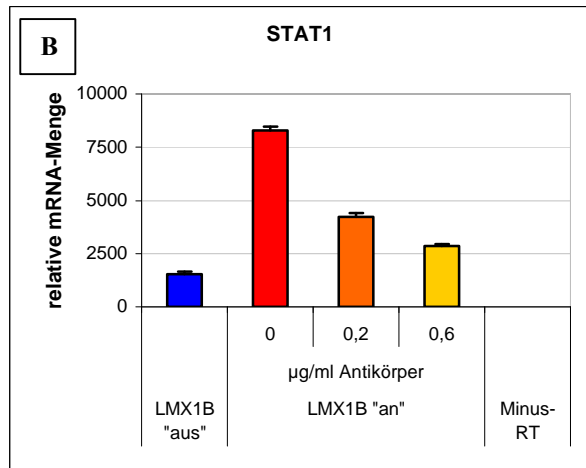
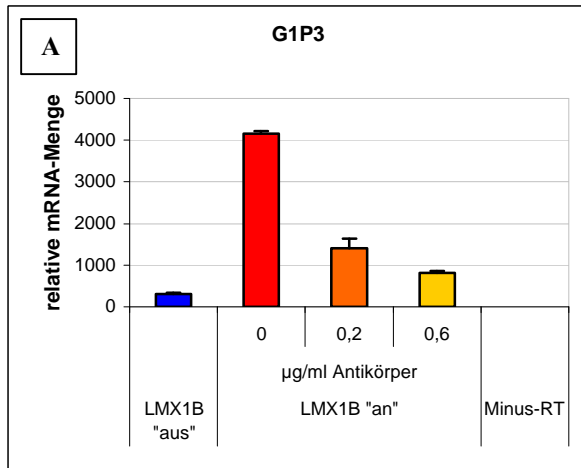
Tabelle 20: Vergleich der Induktion durch LMX1B-Synthese und IFN β -Stimulation. Bei den angegebenen Werten handelt es sich um das Vielfache, auf das die mRNA-Synthese durch LMX1B-Synthese oder Inkubation mit 12,5 ng/ml IFN β für 8 h (*GIP3* und *STAT1*) bzw. 62,5 ng/ml für 48 h (*IRF-9*, *IL-6* und *IFN β*) erhöht wurde.

Während *GIP3* bereits durch 8-stündige Inkubation mit 12,5 ng/ml IFN β ungefähr 5-mal so stark induziert wurde wie durch die Produktion von LMX1B, *STAT1* immerhin 1,3-mal so stark und *IRF-9* ungefähr 2,6-mal so stark mit 62,5 ng/ml für 48 h, ist das Verhältnis bei *IL-6* und *IFN β* entgegengesetzt. Ersteres wurde durch LMX1B-Synthese 1,2-mal so stark induziert wie durch IFN β -Stimulation, letzteres sogar 6,5-mal so stark. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass im System der LMX1B-produzierenden HtTA-1-Zellen das *IFN β* -Gen nicht ausschließlich durch den positiven Rückkopplungsmechanismus, sondern auch durch einen stromaufwärts gelegenen Mechanismus aktiviert wird, welcher direkter von LMX1B abhängig ist. Dies könnte in geringerem Maß auch für das Interleukin-6-Gen gelten. Von der Expression der anderen in den LMX1B-synthetisierenden Zellen aktivierten Gene, insbesondere der ISGs, wäre zu erwarten, dass sie als Folge der IFN β -Synthese erhöht wird.

3.3.6 Die in LMX1B-produzierenden Zellen erhöhte Expression von *IFN β* und *IL-6* ist nur partiell durch Neutralisierung von *IFN β* hemmbar

Um der Vermutung, dass die erhöhte Expression von *IFN β* und *IL-6* in induzierten HtTA-1/myc-LMX1B-Zellen zum größeren Teil durch eine mehr oder minder direkte Aktivierung durch LMX1B ausgelöst wird, nachzugehen, wurde ein weiterer Versuch mit diesen Zellen durchgeführt. In seinem Verlauf sollte der Kreislauf bzw. positive Rückkopplungsmechanismus der *IFN β* - und ISG-Aktivierung vor der Bindung von Interferon- β an seinen Rezeptor unterbrochen werden. Dies sollte Hinweise darauf liefern, welche Gene erst nach *IFN β* -Synthese, *IFN β* -Sekretion und Aktivierung des Rezeptors induziert werden, und welche bereits zuvor durch die Einwirkung von LMX1B induziert sind.

Ausgewählt wurde ein Antikörper gegen humanes Interferon- β der Firma R&D Systems, welcher speziell zum Zweck der Neutralisierung der Bioaktivität des Zytokins entwickelt und bereits von anderen Gruppen erfolgreich eingesetzt worden war [Agrawal et al., 2002; Tliba et al., 2004]. Er bindet extrazellulär an *IFN β* und verhindert so dessen Interaktion mit seinem Rezeptor. Induzierte HtTA-1/myc-LMX1B-Zellen des Klons #34 wurden vier Tage mit 0,2 bzw. 0,6 $\mu\text{g/ml}$ neutralisierendem Antikörper kultiviert. Die aus ihnen isolierte Gesamt-RNA wurde für die Echtzeit-PCR in cDNA umgeschrieben. Abbildung 23 zeigt die Ergebnisse der Reaktionen.



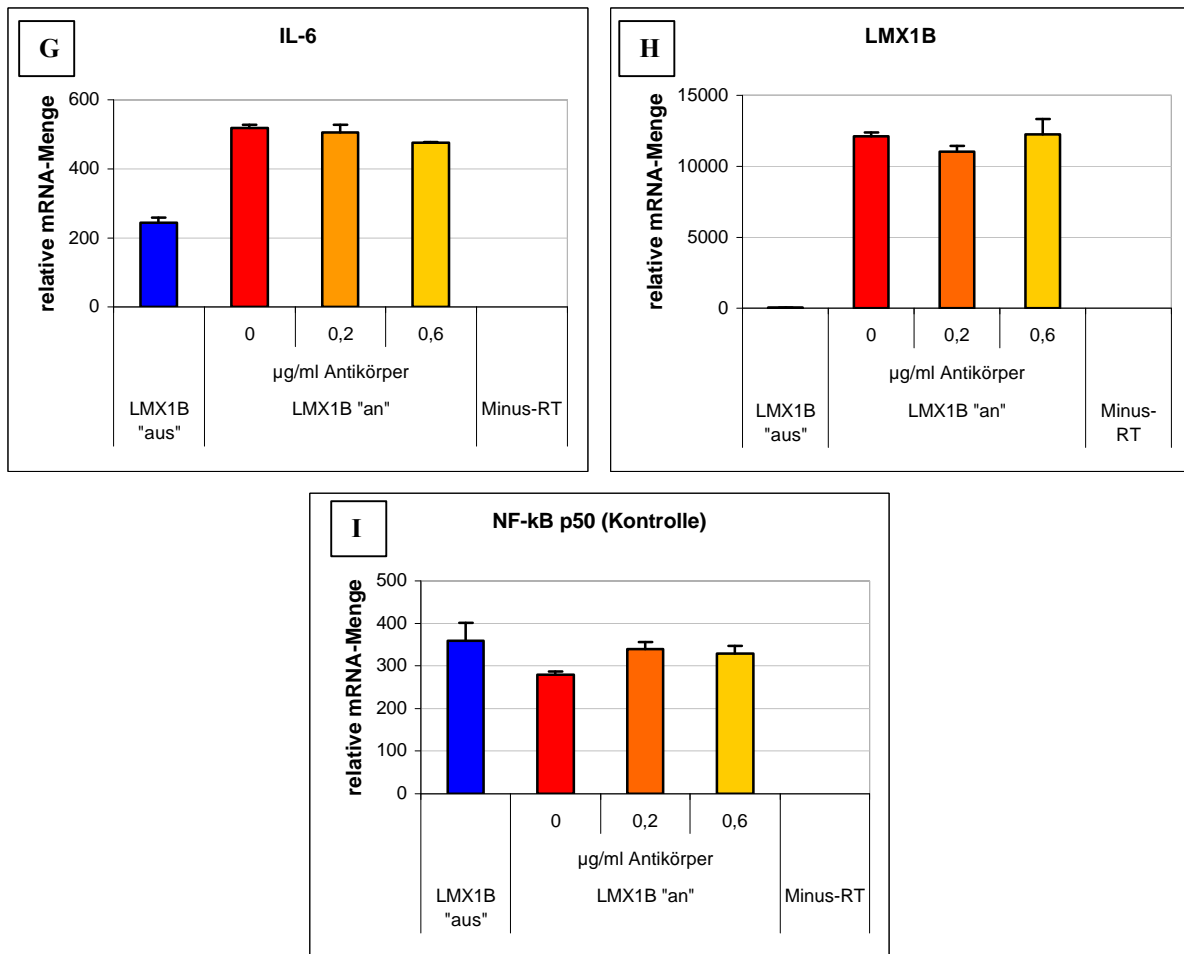


Abbildung 23: RT-qPCR-Analyse der Expression von Kontroll- und verschiedenen am IFN β -System beteiligten Genen in LMX1B-synthetisierenden Zellen nach Behandlung mit einem neutralisierenden Antikörper für IFN β . Aus 4 Tage in Medium mit 100 ng/ml Doxyzyklin (LMX1B „aus“) bzw. ohne Doxyzyklin (LMX1B „an“) und 0, 0,2, oder 0,6 μ g/ml anti-IFN β -Antikörper gewachsenen HfTA-1/myc-LMX1B-Zellen wurde Gesamt-RNA isoliert. Diese wurde in cDNA umgeschrieben, von welcher eine 10 ng RNA äquivalente Menge pro Reaktion der Echtzeit-PCR mit einem der folgenden Primerpaare eingesetzt wurde: hG1P3 F1/R1 (A), hSTAT1 F1/R1 (B), hIRF7 F2/R2 (C), hPKR F1/R1 (D), hTLR3 F1/R1 (E), hIFN β F1/R1 (F), hIL-6 F1/R1 (G), hLMX1B F8/R8 (H) und hNF- κ B p50 F1/R1 (I). Normalisiert wurde mit dem Primerpaar hLama/C F/R.

Der Einsatz des neutralisierenden Antikörpers reduzierte die Transkription der untersuchten am Interferon- β -Kreislauf beteiligten Gene und hatte keine Auswirkung auf die Transkription der LMX1B-cDNA oder des Gens für die NF- κ B-Komponente p50, dessen Regulation von IFN β unabhängig ist. Die Stärke der erzielten Inhibition unterschied sich zwischen den betroffenen Genen. *GIP3*, *STAT1*, *IRF-7*, *PKR* und *TLR3* zeigten eine stärkere Inhibition, *IFN β* eine schwächere Inhibition. *IL-6* wurde nicht inhibiert. Im Detail betrachtet wurde mit 0,6 μ g/ml des anti-IFN β -Antikörpers bei der durch LMX1B induzierten Expression von *GIP3*

87% Inhibition erreicht, bei *STAT1* 81%, bei *IRF-7* 73%, bei *PKR* 88% und bei *TLR3* 73%. Ähnliche Werte wurden zusätzlich bei *ISG15* (87%), *STAT2* (77%) und *IRF-1* (100%) beobachtet (Daten nicht gezeigt). Dagegen wurde die Expression von *IFN β* nur um 57% und somit wesentlich weniger als die der voran genannten Gene reduziert. Die *IL-6*-Expression wurde nicht inhibiert.

Es lassen sich somit erneut zwei Gruppen unterscheiden: *IFN β* und *IL-6* waren nur eingeschränkt bzw. gar nicht durch Neutralisierung von IFN β inhibierbar, während die Gruppe der anderen Gene stark inhibierbar war. Dass die Neutralisierung der biologischen Aktivität von IFN β in den LMX1B-produzierenden Zellen auf ihre Transkription einen kleineren Effekt ausübte, bestätigt die Theorie, dass diese Transkription unter einem direkteren Einfluss von LMX1B steht und erst sekundär durch den positiven Rückkopplungsmechanismus verstärkt wird. Der Anteil der positiven Rückkopplung macht die verbleibende Inhibition der Expression möglich. *GIP3* als klassisches Interferon-stimuliertes Gen und die anderen getesteten Gene scheinen dagegen nahezu vollständig auf die Aktivierung des Interferon-Rezeptors durch Bindung von IFN β angewiesen zu sein. Mit höheren Konzentrationen des neutralisierenden Antikörpers könnten vermutlich noch höhere Inhibitionswerte erreicht werden.

3.3.7 Zwei weitere NF- κ B-Zielgene, *IL-1 β* und *IL-8*, verhalten sich in LMX1B-produzierenden Zellen wie *IFN β* und *IL-6*

Die Tatsache, dass sich die Expression der Gene für Interferon- β und Interleukin-6 in verschiedenen Experimenten anders verhielt als die der übrigen Gene aus dem Interferon- β -System, veranlasste zur Überlegung, welche weiteren Gemeinsamkeiten diese beiden Gene haben. Die augenscheinlichste Gemeinsamkeit ist ihre Zugehörigkeit zu den NF- κ B-Zielgenen [Pahl, 1999]. NF- κ B ist ein heterodimerer Transkriptionsfaktor, der eine Schlüsselrolle z.B. bei Immunantwort und Regulation von Apoptose spielt [Li und Verma, 2002; Delhalle et al., 2004]. Es gibt fünf NF- κ B/REL-Gene: *NFKB1*, *NFKB2*, *RELA*, *c-REL* und *RELB*. Sie kodieren für sieben Proteine: p105, p100, p50, p52, RelA (p65), c-Rel und RelB. Dabei handelt es sich bei p50 um die aminoternale Hälfte von p105, welches von *NFKB1* kodiert wird, und bei p52 um die aminoternale Hälfte von p100, welches von

NFKB2 kodiert wird [Chen und Greene, 2004]. Diese sieben Proteine bilden durch Homo- oder Heterodimerisierung verschiedene NF- κ B-Komplexe mit einer gewissen Spezifität, was ihre Zielgene anbelangt. Das in den meisten Zelltypen am stärksten vertretene Dimer ist das Heterodimer aus p50 und RelA (p65). Sowohl *IL-6* [Chen und Greene, 2004] als auch *IFN β* [Kim et al., 2000] gehören zu den Zielgenen dieses NF- κ B-Komplexes.

In Kapitel 3.2.4 ist die Expression von p50 und p65 in den LMX1B-produzierenden Zellen und den Zellen mit unterdrückter LMX1B-Synthese bereits als Kontrolle gezeigt worden. In allen Proben wurden die Gene für diese beiden NF κ B-Komponenten transkribiert, zwischen den induzierten und nicht-induzierten Zellen war dabei kein Unterschied festzustellen. Mit der Expression der NF- κ B-Komponenten ist demnach die Voraussetzung für die Regulation der Zielgene in den HeLa-Zellen gegeben. LMX1B scheint aber auf dieser Ebene der NF- κ B-Regulation keinen Einfluss auszuüben. Dieser würde, falls wirklich vorhanden, vermutlich auf Proteinebene liegen.

Weitere NF- κ B-Zielgene, deren Expression in LMX1B-synthetisierenden HtTA-1-Zellen bereits mit vorangegangenen Experimenten untersucht worden war, sind zur Erinnerung in Tabelle 21 aufgeführt.

Tabelle 21: Bereits mittels RT-qPCR getestete NF- κ B-Zielgene und die ermittelte Erhöhung ihrer Expression in LMX1B-synthetisierenden HtTA-1-Zellen.

Gen	Erhöhung der Expression in LMX1B-synthetisierenden HtTA-1-Zellen	Kapitel
<i>IFNβ</i>	44-fach	3.3.1
<i>IL-6</i>	9,1-fach	3.3.4
<i>IRF-7</i>	6,4-fach	3.3.3
<i>IRF-1</i>	3,3-fach	3.3.3
<i>IRF-2</i>	2,5-fach	3.3.3
<i>STAT5a</i>	1,3-fach	3.3.3
<i>IFNγ</i>	keine	3.3.1
<i>NF-κB p50</i>	keine	3.2.4

Aus der Tabelle lässt sich ersehen, dass nicht alle der getesteten und damit selbstverständlich nicht alle aus der Vielzahl der existierenden NF- κ B-Zielgene in dem verwendeten System unter dem Einfluss von LMX1B zu stehen scheinen. Um diesen Einfluss jedoch bestätigen zu können, wären weitere betroffene Gene hilfreich. Aus diesem Grund sollte die Expression weiterer typischer NF- κ B-Zielgene untersucht werden. Ausgewählt wurden hierfür folgende Gene:

- *NF κ B1A*, das für I κ B- α , einen Inhibitor von NF- κ B kodiert [Pahl, 1999],
- das Gen für das Zytokin Interleukin-1 β , das neben Interleukin-6 von mit Lipopolysaccharid behandelten HeLa-Zellen ausgeschüttet wird [Wang et al., 2004], und
- die Gene für die Chemokine Interleukin-8 und MCP-1 (CCL2), deren Expression in HeLa-Zellen nach Infektion mit *T. gondii* erhöht ist [Kim et al., 2001].

Für die RT-qPCR-Analyse der Expression dieser vier Gene wurden erneut die in Kapitel 3.2.4 beschriebenen cDNA-Proben von induzierten und nicht induzierten HtTA-1/myc-LMX1B-Zellen verwendet. Die Resultate der Analyse sind in Abbildung 24 gezeigt.

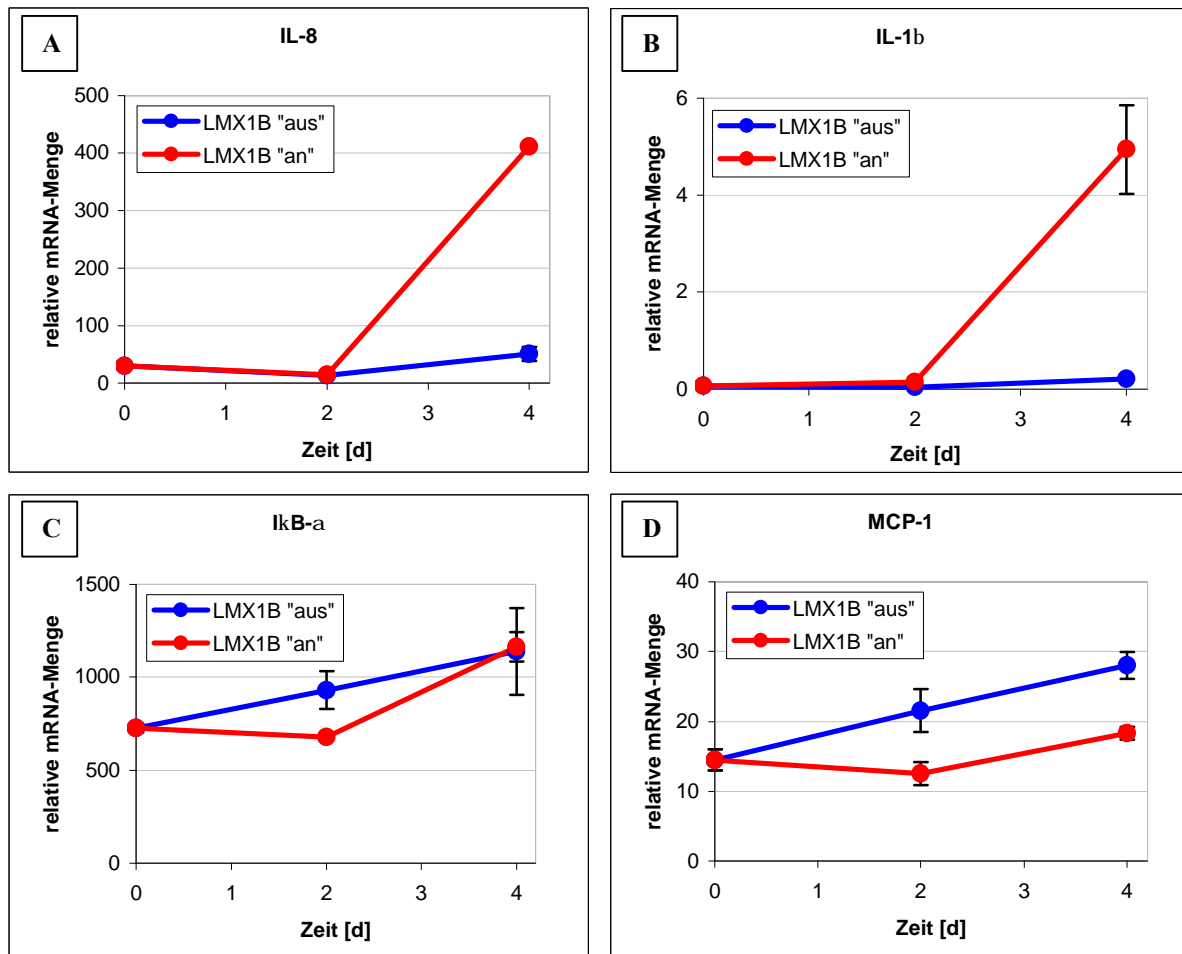


Abbildung 24: RT-qPCR-Analyse der Expression von vier NF-κB-Zielgenen in LMX1B-synthetisierenden HtTA-1-Zellen. Mehrere Tage in Medium mit 100 ng/ml Doxyzyklin kultivierte HtTA-1/myc-LMX1B-Zellen wurden abgelöst und wieder ausgesät (Tag 0) und wuchsen dann 2 bzw. 4 Tage mit (LMX1B „aus“) oder ohne (LMX1B „an“) 100 ng/ml Doxyzyklin. Anschließend erfolgten Ernte, RNA-Isolierung, cDNA-Synthese aus 1 µg Gesamt-RNA und Echtzeit-PCR mit einer 10 ng RNA äquivalenten Menge cDNA pro Reaktion. Zur Amplifikation wurden die Primerpaare hIL-8 F1/R1 (A), hIL-1β F1/R1 (B), hIκB-α F1/R1 (C), hMCP-1 F1/R1 (D), sowie hLamA/C F/R für die Normalisierung verwendet. LMX1B-synthetisierende HtTA-1-Zellen enthielten nach 4 Tagen eine größere Menge IL-8- und IL-1β-mRNA, eine etwas geringere Menge MCP-1-mRNA und die gleiche Menge IκB-α-mRNA wie die HtTA-1-Zellen, bei denen die LMX1B-Synthese unterdrückt war.

Mit *IL-8* und *IL-1β* wurden bei diesem Versuch zwei weitere Zielgene von NF-κB von der LMX1B-Synthese beeinflusst. Die relative mRNA-Menge von IL-8 war in den betreffenden Zellen nach 4 Tagen Kultur auf das 8,1-fache gegenüber den nicht-induzierten Zellen erhöht, die von IL-1β auf das 23-fache. Die Expression von *IκB-α* dagegen war bei beiden Proben ungefähr gleich, die von *MCP-1* in den LMX1B-produzierenden Zellen sogar auf das 0,6-fache vermindert.

Im nächsten Schritt sollte getestet werden, ob sich die Transkription von *IL-8* und *IL-1b* auch nach Stimulation von HtTA-1-Zellen mit Interferon- β oder Inkubation von LMX1B-produzierenden HtTA-1-Zellen mit dem neutralisierenden Anti-IFN β -Antikörper so verhält wie die von *IFN β* und *IL-6*. Dazu wurden die cDNA-Proben verwendet, die auch schon in Kapitel 3.3.5 (IFN β -Stimulation) bzw. Kapitel 3.3.6 (Neutralisierungs-Antikörper) für die Analyse anderer Gene verwendet wurden. Alle in Abbildung 25 gezeigten Werte sind wie immer Mittelwerte zweier Reaktionen.

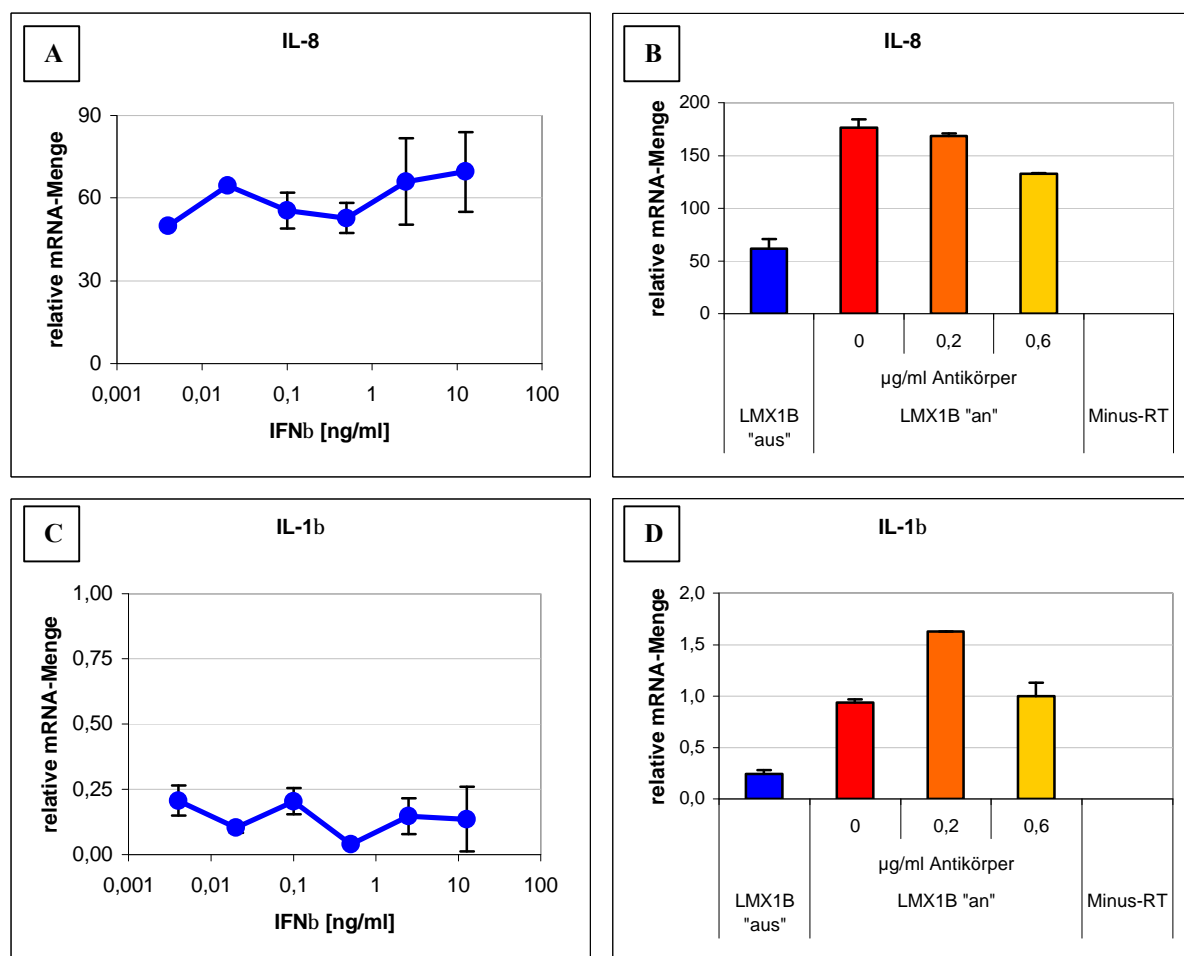


Abbildung 25: RT-qPCR-Analyse der Expression von *IL-8* und *IL-1b* nach Stimulierung von HtTA-1-Zellen mit IFN β (A und C) und Behandlung von LMX1B-produzierenden Zellen mit einem neutralisierenden Antikörper für IFN β (B und D). HtTA-1-Zellen wurden für 8 h mit 0, 0,02, 0,1, 0,5, 2,5 bzw. 12,5 ng/ml IFN β inkubiert und anschließend geerntet (A und C). HtTA-1/myc-LMX1B-Zellen (Klon #34) wuchsen vier Tage in Medium mit 100 ng/ml Doxyzyklin (LMX1B „aus“) bzw. ohne Doxyzyklin (LMX1B „an“) und 0, 0,2, oder 0,6 μ g/ml anti-IFN β -Antikörper (B und D) und wurden dann geerntet. Von beiden Probensätzen wurde Gesamt-RNA isoliert, aus 1 μ g von dieser wurde cDNA synthetisiert. Eine 10 ng RNA äquivalente Menge von letzterer wurde zusammen einem der Primerpaare hIL-8 F1/R1 (A und B), hIL-1 β F1/R1 (C und D) oder hLama/C in jede PCR-Reaktion eingesetzt. Weder die Expression von *IL-8* noch

die von *IL-1b* wurden durch die Behandlung mit den angegebenen Konzentrationen von IFN β gesteigert. Die Expression von *IL-8* in LMX1B-synthetisierenden Zellen wurde durch den neutralisierenden Antikörper nur schwach inhibiert, die von *IL-1b* überhaupt nicht.

Beim Versuch zur Stimulierbarkeit durch Inkubation mit IFN β wurde beobachtet, dass die Expression sowohl von *IL-8* als auch von *IL-1b* wie schon die von *IFN β* und dem Gen für Interleukin-6 durch 8-stündige Inkubation mit den angegebenen Konzentrationen nicht beeinflusst werden konnte. Bei der Inkubation von LMX1B-produzierenden Zellen mit 0,6 $\mu\text{g/ml}$ des Antikörpers, der die biologische Aktivität von IFN β neutralisiert, wurde die Transkription von *IL-8* lediglich um 24% inhibiert. Die Induktion von *IL-1b* wurde durch Inkubation mit dem Antikörper nicht inhibiert, sondern leicht erhöht. *IL-8* und *IL-1b* verhielten sich demnach bei *LMX1B*-Überexpression, Stimulation mit IFN β und Neutralisierung des Zytokins ähnlich wie *IFN β* und *IL-6*.

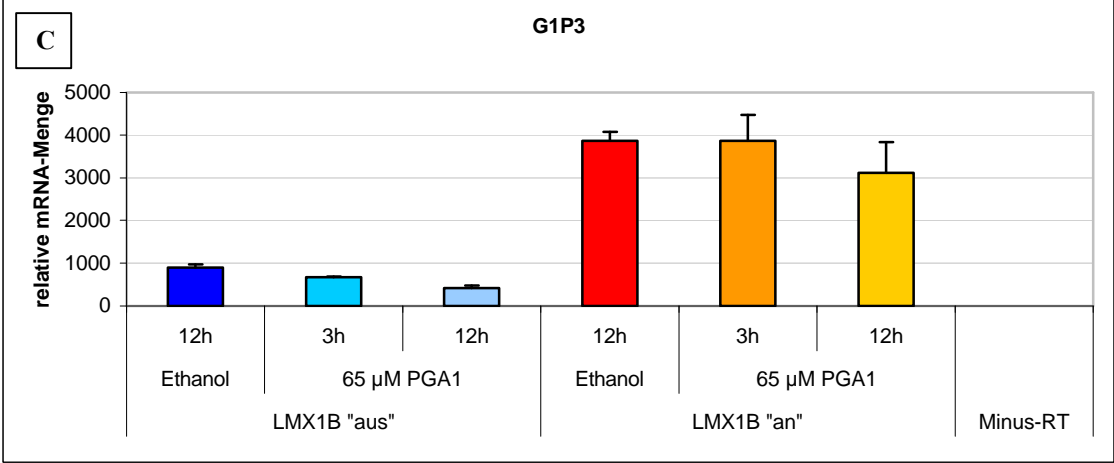
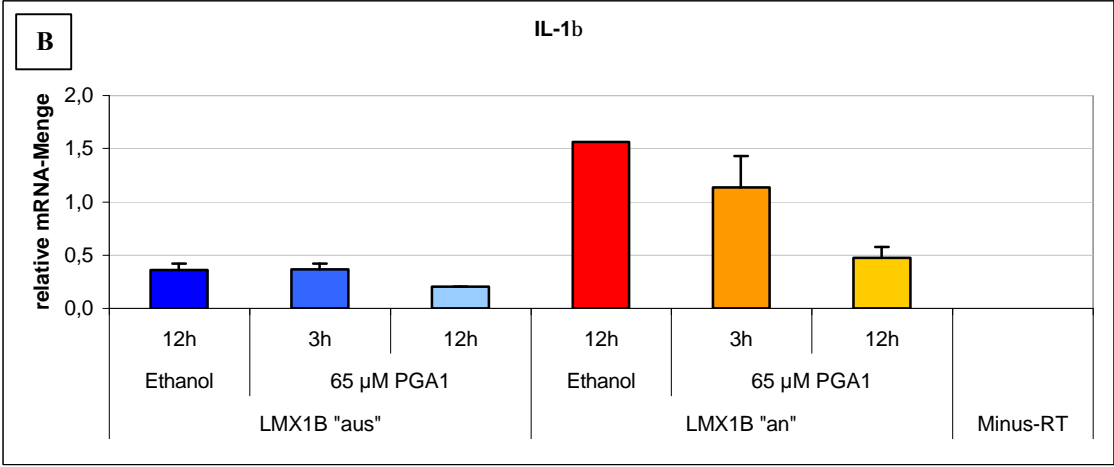
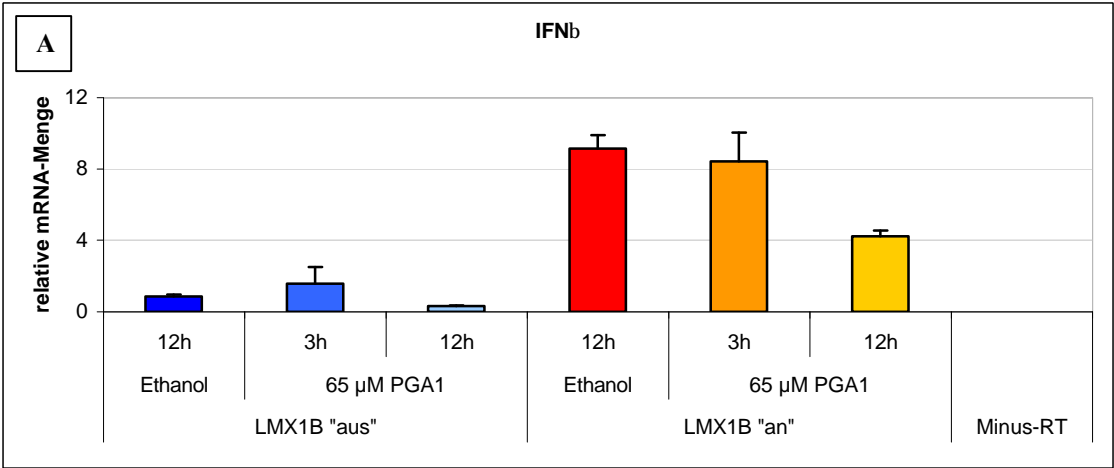
3.3.8 Die Inhibierung von NF- κ B durch Prostaglandin A₁ hemmt die durch LMX1B ausgelöste Induktion verschiedener Gene

Die Expression mehrerer Zielgene von NF- κ B war in LMX1B-produzierenden Zellen erhöht, darunter die von *IL-6*, *IL-1b* und *IL-8*. Im Gegensatz zu anderen Genen wie den ebenfalls induzierten ISGs waren diese Gene zudem in HtTA-1-Zellen kaum durch den Einsatz von IFN β stimulierbar. Ihre Induktion durch LMX1B ließ sich nur schwach durch die Neutralisierung von IFN β hemmen. Dies zeigt, dass die Induktion nicht erst Folge einer durch LMX1B ausgelösten erhöhten IFN β -Produktion und -Sekretion sein kann, wie es wahrscheinlich für die ISGs zutrifft, sondern weitestgehend unabhängig von dieser zu einem früheren Zeitpunkt geschieht. Die naheliegendste Vermutung in diesem Zusammenhang ist ein positiv regulierender Einfluss von LMX1B auf die Aktivität NF- κ Bs als Transkriptionsfaktor. Die erhöhte NF- κ B-Aktivität würde zur gesteigerten Expression der Zielgene führen, unter denen die von *IFN β* die Induktion der Interferon-stimulierten Gene und die durch deren Produkte ausgelöste Wachstumsinhibition zur Folge hat.

Um die Theorie, dass der stimulierende Effekt, den die LMX1B-Produktion auf die Expression von *IFN β* , *IL-6*, *GIP3* und anderen Gene ausübt, von der Aktivierung des

Transkriptionsfaktors NF- κ B abhängig ist, zu überprüfen, wurde das folgende Experiment geplant. Es sollte die Aktivität von NF- κ B inhibiert und überprüft werden, ob damit auch die erhöhte Genexpression in LMX1B-synthetisierenden Zellen abgeschwächt werden kann. Als Ansatzpunkte für die Inhibierung NF- κ Bs kommen verschiedene Stationen seines Signaltransduktionsweges wie z.B. die Aktivierung von IKK, die Phosphorylierung und Degradierung von I κ B oder die Translokation von NF- κ B in den Zellkern in Frage [Delhalle et al., 2004]. In diesem Fall wurde die Inhibierung der I κ B-Kinase (IKK) durch ein Zykloxygenon-Prostaglandin ausgewählt. IKK katalysiert bei Aktivierung des Signalwegs durch diverse Stimuli die Phosphorylierung des im Zytoplasma an NF- κ B gebundenen I κ Bs („inhibitor of κ B“), welches daraufhin degradiert wird und das NF- κ B-Dimer freigibt [Li und Verma, 2002]. Dieses kann nun aus dem Zytoplasma in den Zellkern wandern und seine Rolle als Transkriptionsfaktor ausüben. Die Inhibierung der IKK sollte also diese nachfolgenden Prozesse verhindern. Zykloxygenon-Prostaglandine modifizieren kovalent Cystein-Reste der IKK-Komponente IKK β und führen somit zu einer irreversiblen Inhibierung der Kinase [Delhalle et al., 2004]. Prostaglandin A₁ (PGA₁) wurde erfolgreich u.a. auch in HeLa-Zellen angewendet [Rossi et al., 2000] und deshalb für den folgenden Versuch gewählt. Seine Spezifität für den NF- κ B-Signalweg ist jedoch eher mäßig.

Induzierten und nicht induzierten HtTA-1/myc-LMX1B-Zellen des Klons #34 wurde drei Tage nach Aussaat 65 μ M Prostaglandin A₁ oder das entsprechende Volumen des Lösungsmittels Ethanol zugesetzt und für 3 bzw. 12 h inkubiert. Die später aus den Zellen gewonnene Gesamt-RNA wurde für die folgende Echtzeit-PCR in cDNA umgeschrieben. Abbildung 26 zeigt die Mittelwerte zweier parallel angesetzter Reaktionen.



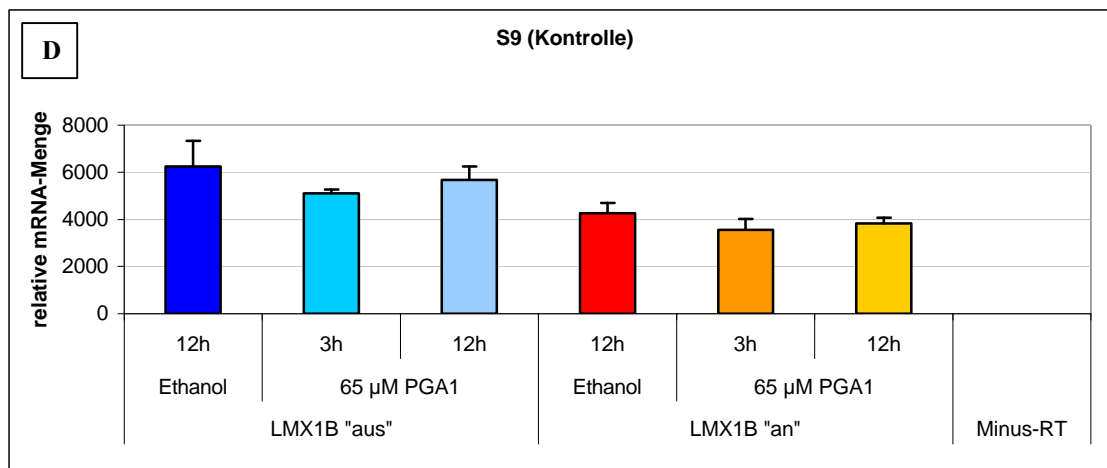


Abbildung 26: RT-qPCR-Analyse der Auswirkung von PGA₁ auf durch LMX1B-Synthese ausgelöste Genexpression. HtTA-1/myc-LMX1B-Zellen (Klon #34) wurden drei Tage in Medium mit (LMX1B „aus“) oder ohne (LMX1B „an“) Doxyzyklin kultiviert und dann für 3 bzw. 12 h mit 65 µM Prostaglandin A₁ oder einer entsprechenden Menge Ethanol als Kontrolle versetzt. Nach der anschließenden Ernte wurde Gesamt-RNA isoliert, 1 µg von dieser in cDNA umgeschrieben und eine 10 ng RNA entsprechende Menge von letzterer in eine Echtzeit-PCR eingesetzt. Es wurden die Primerpaare hIFNβ F1/R1 (A), hIL-1β F1/R1 (B), hGIP3 F1/R1 (C), h/mS9 F/R (D) und hLamA/C F/R (für die Normalisierung) verwendet. Die Expression von *IFNβ* und *IL-1β* ließ sich mit PGA₁ deutlich hemmen, die von *GIP3* nur schwach.

Da PGA₁ keine sehr hohe Spezifität für den NF-κB-Signalweg besitzt, sind die gezeigten Daten lediglich als einleitender Hinweis zu betrachten und müssen mit mindestens einer anderen Methode überprüft werden.

Der Einsatz des Prostaglandins hemmte die Expression der Gene *IFNβ*, *IL-1β* und *GIP3*. Bereits bei den nicht-induzierten Zellen war ein inhibierender Effekt des Prostaglandins zu beobachten. Im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle wurde die Genexpression durch 12-stündige Inkubation mit Prostaglandin um 44 bis 61% reduziert. Bei den induzierten Zellen zeigte sich eine Reduktion um 54% für *IFNβ*, um 70% bei *IL-1β* und um 19% bei *GIP3*. Die durch die LMX1B-Produktion ausgelöste Induktion der Gene wurde damit entsprechend um 59%, 91% und 25% inhibiert. Abbildung 27 stellt die letztgenannten Werte zur Verdeutlichung graphisch dar.

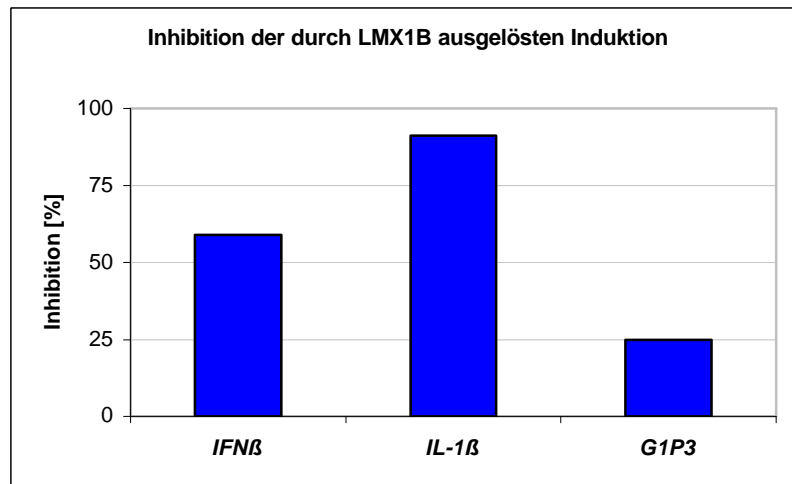


Abbildung 27: Graphische Darstellung der durch PGA_1 erzielten Inhibition der Transkription von *IFN β* , *IL-1 β* und *G1P3*. Gezeigt ist die durch 12-stündige Inkubation mit 65 μM PGA_1 erzielte Inhibition der durch LMX1B-Synthese ausgelösten Induktion von *IFN β* , *IL-1 β* und *G1P3*.

Mit Werten zwischen 25% und 91% ist der inhibierende Effekt von PGA_1 auf die Induktion von *IFN β* , *IL-1 β* und *G1P3* sehr variabel. Damit ist eine klare Interpretation der Daten eher schwierig. Die *S9*-Kontrolle zeigte sich jedoch von der Prostaglandin-Behandlung unbeeinflusst. Damit weisen die Ergebnisse dennoch darauf hin, dass die Blockierung von NF- κB die Induktion der drei Gene beeinflusst. Wären sie mit anderen Methoden reproduzierbar, könnte sich die vermutete Reihenfolge der Ereignisse in LMX1B-produzierenden HeLa-Zellen bestätigen: LMX1B könnte auf eine noch zu klärende Art und Weise einen aktivierenden Effekt auf NF- κB ausüben. Dieser Transkriptionsfaktor wiederum könnte dann verschiedene seiner Zielgene wie *IL-1 β* und *IFN β* aktivieren.

Zur Überprüfung dieser Ergebnisse und Schlussfolgerungen werden im Rahmen zweier hier anknüpfenden Doktorarbeiten weitere Inhibitoren von NF- κB getestet [Raschta, in Bearbeitung] und eine Chromatin-Immunpräzipitation für LMX1B [Neumann, in Bearbeitung] durchgeführt werden.

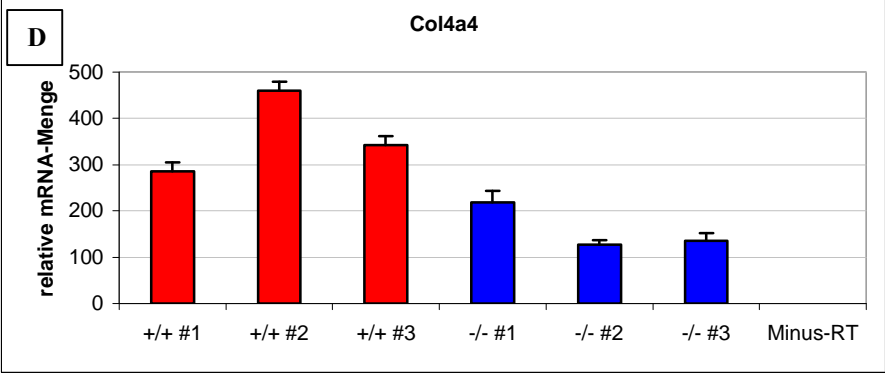
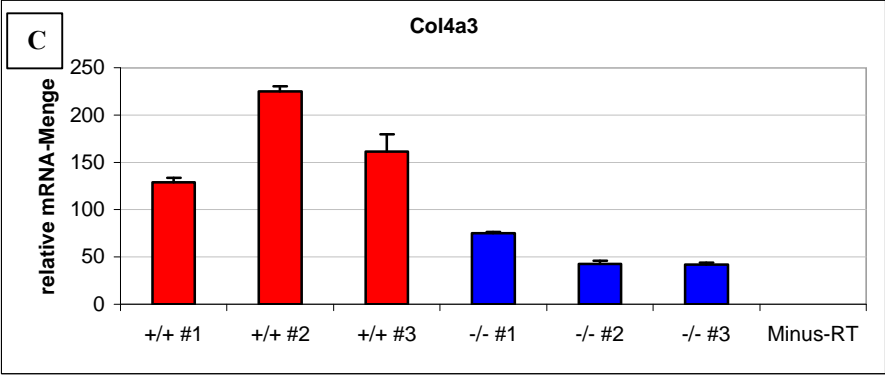
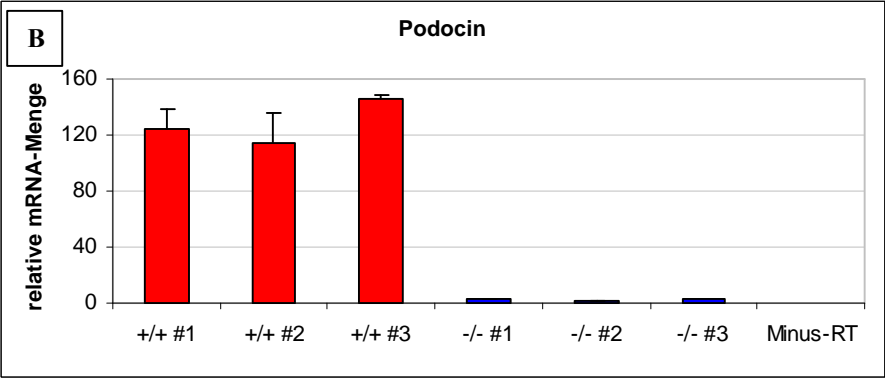
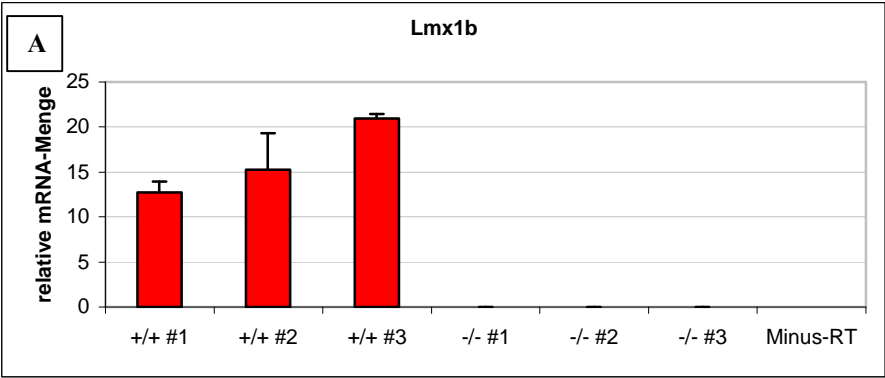
3.4 Überprüfung der an HeLa-Zellen gewonnenen Erkenntnisse mit *in vivo*-Modellen

Die induzierbare Synthese von LMX1B in den HeLa-Zellen ist ein leicht zu kontrollierendes, flexibles und etabliertes System, das jedoch artifiziell ist. Um die physiologische Rolle von LMX1B besser zu verstehen, schien daher auch der Blick auf andere Systeme, in diesem Fall auf die *Lmx1b*-Knockout-Maus und Zellen aus dem gesunden bzw. tumorösen Urothel der Blase sinnvoll.

3.4.1 **Lmx1b beeinflusst die Expression von Genen des Interferon- β -Signalwegs in der sich entwickelnden, nicht aber in der adulten Niere von Mäusen**

Da in dieser Arbeitsgruppe das besondere Augenmerk auf der Funktion von LMX1B in der Niere liegt, wurden im Zuge dieser Arbeit Nieren von neugeborenen und adulten Mäusen untersucht. Bei den Adulten standen neben den *Lmx1b*^(+/+)-Mäusen nur *Lmx1b*^(+/-)-Mäuse zur Verfügung, da *Lmx1b*^(-/-)-Mäuse bereits kurz nach der Geburt sterben. Bei den Neugeborenen konnte auch auf diese zurückgegriffen werden.

Aus den beiden Nieren einer Maus im Fall der Neugeborenen oder aus einem entsprechend großen Stück der Niere einer adulten Maus wurde Gesamt-RNA isoliert und aus dieser für die Echtzeit-PCR cDNA hergestellt. Da die Expression von am IFN β -System beteiligten Genen in den Nieren der neugeborenen Knockout-Mäuse getestet werden sollte, wurden hierfür *Isg15*, *Irf-7* und *Irf-9* ausgewählt. Für diese drei Gene war bei den LMX1B-synthetisierenden HtTA-1-Zellen eine deutliche Erhöhung der Expression gezeigt worden (siehe Kapitel 3.2.4 und 3.3.3). Als Kontrolle für das Funktionieren des Knockouts wurden *Lmx1b*, das Gen für Podocin (*Nphs2*), *Col4a3* und *Col4a4* ausgesucht. Für Kollagen IV α 3 und IV α 4 war bereits gezeigt worden, dass die Expression der entsprechenden Gene in *Lmx1b*^(-/-)-Mäusen reduziert ist [Morello et al., 2001]. Gleiches gilt für Podocin [Rohr et al., 2002; Miner et al., 2002]. Zur Kalkulation der relativen mRNA-Menge diente für die murinen Gene die Normalisierung mit dem Haushaltsgen *S9*. Abbildung 28 zeigt die Ergebnisse der Expressionsanalyse bei den Nieren neugeborener Mäuse. Es wurden die Nieren jeweils dreier *Lmx1b*^(+/+)- und *Lmx1b*^(-/-)-Tiere verwendet.



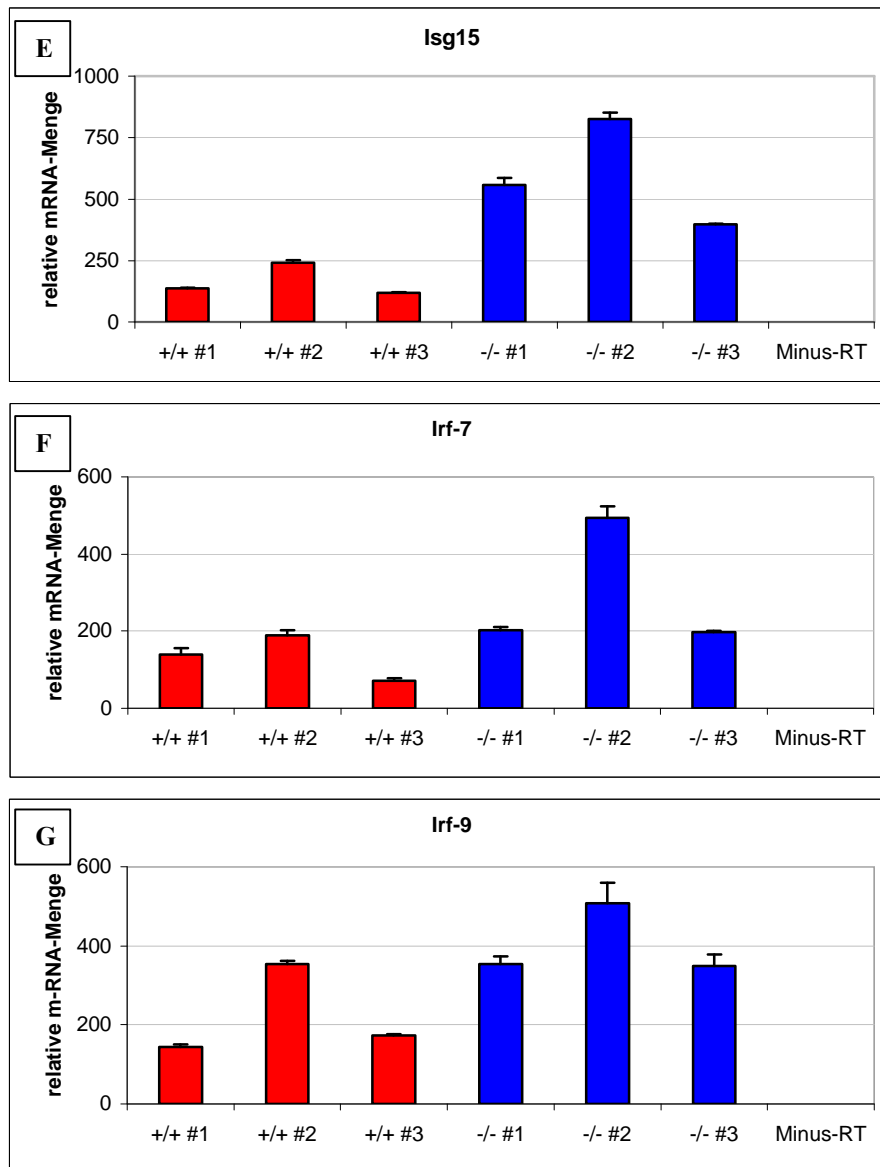


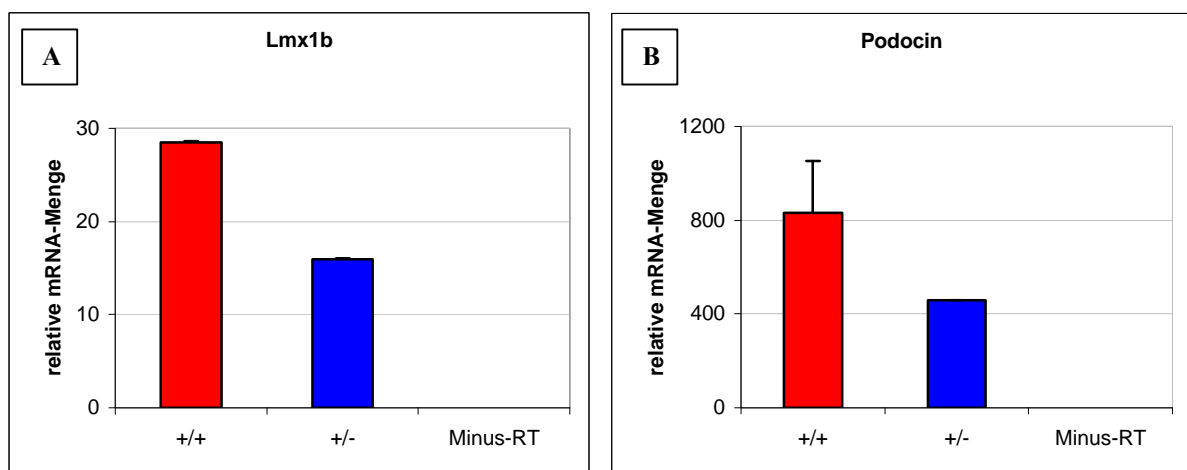
Abbildung 28: RT-qPCR-Analyse der Expression von Kontrollgenen und Genen des IFN β -Signalwegs in Nieren neugeborener *Lmx1b*-Knockout-Mäuse. Aus den beiden Nieren dreier neugeborener *Lmx1b*^(+/+)-Mäuse und dreier neugeborener *Lmx1b*^(-/-)-Mäuse (jeweils #1, #2 und #3) wurde Gesamt-RNA isoliert, aus 1 μ g von dieser cDNA synthetisiert und davon eine 10 ng RNA äquivalente Menge in jede Echtzeit-PCR-Reaktion eingesetzt. Zur Amplifikation dienten die Primerpaare mLMX1B F4/R4 (A), mPodocin F1/R1 (B), mCOL4A3 F1/R1 (C), mCOL4A4 F1/R1 (D), mISG15 F1/R1 (E), mIRF7 F1/R1 (F), mIRF9 F1/R1 (G) und h/mS9 F/R. Die Kontrollen bestätigten den korrekten Knockout von *Lmx1b*. Die Expression von *Isg15*, *Irf-7* und *Irf-9* war in den Nieren der *Lmx1b*^(-/-)-Tiere erhöht.

Die Kontrolle der *Lmx1b*-Expression zeigt deutlich, dass in den *Lmx1b*^(-/-)-Tieren keine intakte *Lmx1b*-mRNA mehr produziert wird. Die Transkription des Podocin-Gens war auf ein verschwindend geringes Maß reduziert, die der Kollagen-Gene deutlich reduziert. Dies deckt sich mit den Erwartungen.

Anders die Gene des IFN β -Systems: Die Expression von *Isg15* lag in allen drei *Lmx1b*^(-/-)-Tieren deutlich über der der Wildtyp-Tiere. Aufgrund der Ergebnisse aus den Versuchen mit den LMX1B-produzierenden HfTA-1-Zellen, bei denen die *ISG15*-Expression erhöht war, wäre zu erwarten gewesen, dass bei den *Lmx1b*^(-/-)-Mäusen das Gegenteil der Fall ist. Das gleiche gilt für *Irf-7* und *Irf-9*. Auch diese beiden Gene wurden in den *Lmx1b*^(-/-)-Tieren durchschnittlich stärker transkribiert, wobei der Unterschied hier nicht so stark ausfiel wie bei *Isg15*.

Demnach bestätigen die bei den Nieren der Knockout-Mäuse erhaltenen Ergebnisse die bei den HeLa-Zellen gemachte Beobachtung, dass die Expression der untersuchten Gene durch LMX1B beeinflusst wird. Dies scheint jedoch auf unterschiedliche Art und Weise zu geschehen, da der Effekt in die entgegengesetzte Richtung – Inhibierung statt Aktivierung – verläuft. Die Gründe hierfür müssen noch weiter untersucht werden.

Zur Ergänzung der aus der Untersuchung der Nieren neugeborener Mäuse gewonnenen Ergebnisse wurde auch die Transkription des Interferon-stimulierten Gens *Isg15* in Nieren von adulten *Lmx1b*^(+/+)- und *Lmx1b*^(+/-)-Mäusen betrachtet. Zur Kontrolle des Knockouts wurden wieder *Lmx1b* und das Gen für Podocin betrachtet. In Abbildung 29 ist das Ergebnis dieses Versuchs zu sehen.



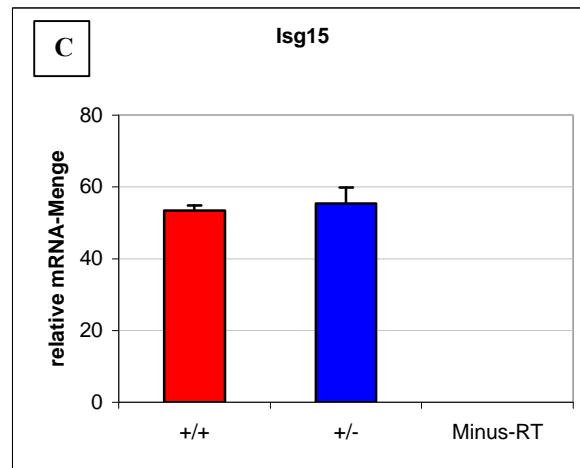


Abbildung 29: RT-qPCR-Analyse der Expression von *Isg15* in den Nieren adulter *Lmx1b*-Knockout-Mäuse. Aus je einer halben Niere einer *Lmx1b*^(+/+)- und einer *Lmx1b*^(+/-)-Maus wurde Gesamt-RNA isoliert, welche dann für die cDNA-Synthese verwendet wurde. Mit einer 10 ng RNA entsprechenden Menge cDNA wurden Echtzeit-PCR-Reaktionen angesetzt, für die entweder das Primerpaar mLMX1B F4/R4 (A), mPodocin F1/R1 (B), mISG15 F1/R1 (C) oder h/mS9 F/R (zur Normalisierung) verwendet wurde.

Der ungefähr halbierte Gehalt an *Lmx1b*- und Podocin-mRNA in dem *Lmx1b*^(+/-)-Tier bestätigt den durch Southern Blot bestimmten Genotyp der beiden Mäuse. Die relative Menge von *Isg15*-mRNA gleicht sich dagegen bei *Lmx1b*^(+/+)- und *Lmx1b*^(+/-)-Maus. Sie ist in der Niere letzterer nicht erhöht, wie es bei den Nieren der neugeborenen *Lmx1b*^(-/-)-Mäuse zu beobachten war. Ein direkter Vergleich von neugeborenen und adulten *Lmx1b*^(-/-)-Tieren ist aufgrund ihrer Lebensunfähigkeit nicht möglich. Es wäre denkbar, dass erst der vollständige Knockout des *Lmx1b*-Gens die Veränderungen in der Expression der Interferon-induzierten Gene auslöst, so dass das Ausschalten nur eines Allels kompensiert werden kann. Eine weitere Möglichkeit bestünde in der unterschiedlichen Bedeutung dieser Expression in verschiedenen Stadien der Nierenentwicklung. So könnten die hier erhaltenen Ergebnisse darauf hin deuten, dass der beobachtete Effekt von *Lmx1b* auf das IFN β -System bei der sich entwickelnden Niere eine Rolle spielt, in der adulten Niere jedoch weniger von Bedeutung ist.

3.4.2 Die Expression von Interferon-stimulierten Genen ist in den Nieren neugeborener *Lmx1b*-Knockout-Mäuse erhöht

So wie bereits mit den HtTA-1/myc-LMX1B-Zellen eine Genexpressionsanalyse durchgeführt worden war (siehe Kapitel 3.2.1), um die Funktion von LMX1B als Transkriptionsfaktor [Hobert und Westphal, 2000] zu untersuchen, sollte dies nun auch mit Nierengewebe neugeborener *Lmx1b*-Knockout-Mäuse geschehen. Ein besonderes Augenmerk sollte dabei auf die Expression von Interferon-stimulierten Genen in Nieren von *Lmx1b*^(-/-)-Mäusen im Vergleich zu denen von Wildtyp-Mäusen gerichtet werden.

Die für die Analyse benötigten Nieren wurden einer Verpaarung von *Lmx1b*^(+/-)-Mäusen entstammenden Neugeborenen direkt nach deren Geburt entnommen. Drei Nieren von drei *Lmx1b*^(+/+)-Tieren bzw. drei Nieren von drei *Lmx1b*^(-/-)-Tieren wurden zusammengeführt, die daraus isolierte RNA wurde dann zur Genexpressionsanalyse an die entsprechenden Institutionen weitergegeben. Hierbei handelte es sich zum einen um das Zentrum für medizinische Forschung (ZMF) der medizinischen Fakultät der Universität Heidelberg, welches industriell gefertigte DNA-Mikroarrays der Firma Affymetrix einsetzt. Die aus den Nieren isolierte Gesamt-RNA musste zunächst mit Oligo-dT-Primern und reverser Transkriptase in cDNA und anschließend in cRNA umgeschrieben werden, welche dann fraktioniert und auf den Array hybridisiert wurde. Für jedes Gen oder EST waren dabei 11 bis 20 "Messpaare", die aus 25mer Oligonukleotiden bestehen, auf dem "GeneChip" abgebildet. Nach anschließendem Waschen und Färben wurden die Microarray-Chips gescannt und die erhaltenen Daten zur Auswertung bereitgestellt. Für letztere standen das Verhältnis der Signale von *Lmx1b*^(+/+)- und *Lmx1b*^(-/-)-Proben und ein Signifikanz-Wert zur Verfügung.

In Tabelle 22 sind alle Interferon-stimulierten Gene aufgeführt, deren Expression in Nieren von *Lmx1b*^(-/-)-Mäusen im Vergleich zu denen von *Lmx1b*^(+/+)-Mäusen signifikant verschieden war. Interessanterweise fand sich in allen Fällen eine erhöhte Expression bei den *Lmx1b*^(-/-)-Tieren. Eine Verminderung wurde nicht beobachtet. Damit unterstützen die Daten dieser Genexpressionsanalyse die Ergebnisse der in Kapitel 3.4.1 beschriebenen RT-qPCR, bei der die Transkription des Interferon-stimulierten Gens *Isg15* untersucht worden war. Auch hier war eine Erhöhung bei den neugeborenen *Lmx1b*^(-/-)-Mäusen gezeigt worden. Der Knockout des *Lmx1b*-Gens scheint bei Mäusen demnach zu einer ausgedehnten Erhöhung der Expression von ISGs zu führen.

Gen	kodiertes Protein
<i>Ifit1</i>	Interferon-induziertes Protein mit Tetratrikopeptid-Wiederholungen 1
<i>Stat1</i>	signal transducer and activator of transcription 1
<i>Ifi1</i>	Interferon-induzierbares Protein 1
<i>Isgf3g</i>	interferon-stimulated gene factor 3 gamma (= interferon regulatory factor 9)
<i>Ifi47</i>	Interferon-gamma-induzierbares Protein 47
<i>H2-Aa</i>	histocompatibility 2, class II antigen A, alpha
<i>Igtp</i>	Gamma-Interferon-induzierte GTPase
<i>Ifi203</i>	Interferon-aktiviertes Gen 203
<i>Serping1</i>	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade G (C1 inhibitor), member 1
<i>Oas1a</i>	2'-5'-Oligoadenylat-Synthetase 1A
<i>Tor3a</i>	torsin family 3 member A
<i>Irf1</i>	interferon regulatory factor 1

Tabelle 22: Interferon-stimulierte Gene, deren Expression in Nieren von neugeborenen *Lmx1b*^(-/-)-Mäusen in einem Affymetrix-Chip-Array erhöht war. Aus Nieren von drei neugeborenen *Lmx1b*^(+/+)- bzw. *Lmx1b*^(-/-)-Mäusen wurde Gesamt-RNA isoliert und dem ZMF der medizinischen Fakultät der Universität Heidelberg zur Genexpressionsanalyse mittels Mikroarray-Technik der Firma Affymetrix überlassen. Gezeigt sind neun Interferon-stimulierte Gene, deren Expression bei den *Lmx1b*^(-/-)-Tieren signifikant erhöht war. Eine verminderte Expression anderer ISGs konnte nicht beobachtet werden.

Die Gesamt-RNA der Mäuse-Nieren wurde ebenfalls an das Deutsche Krebsforschungszentrum (DKFZ) in Heidelberg gesendet, welches bereits die Genexpressionsanalyse an den LMX1B-synthetisierenden HtTA-Zellen durchgeführt hatte (siehe Kapitel 3.2.1). So sollte durch zwei unabhängig durchgeführte Analysen die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse gewährleistet werden. Wie für die HtTA-1-Zellen beschrieben wurde im DKFZ zunächst die mRNA mit Oligo-dT-Primern und reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben und dabei gleichzeitig mit α -³³P-dCTP radioaktiv markiert. Die markierten cDNA-Moleküle wurden dann mit Filtern, die mehrere Tausend verschiedene humane cDNAs – jede davon zweimal an verschiedenen Stellen – enthielten, hybridisiert. Das Set der getesteten Gene überlappte dabei mit dem am ZMF getesteten, war jedoch nicht identisch. Für ein genaueres Ergebnis wurde die Hybridisierung wiederholt und bei der Auswertung der Daten die so erhaltenen Vierfachwerte betrachtet.

In Tabelle 23 sind alle Interferon-stimulierten Gene aufgeführt, deren Expression in den Nieren von *Lmx1b*^(-/-)-Mäusen im Vergleich zu Nieren von *Lmx1b*^(+/+)-Mäusen erhöht war. Diesen 13 ISGs, deren Expression erhöht war, steht mit *Ifit1* eines gegenüber, bei dem eine leicht verminderte Expression festgestellt wurde. Dies widerspricht den Ergebnissen des Affymetrix-Arrays, bei dem mit derselben RNA eine signifikante Erhöhung detektiert worden war. Eines der beiden Ergebnisse scheint demnach fehlerhaft zu sein. Dennoch bestätigt dieser cDNA-Array die bisherigen Beobachtungen bezüglich der Expression von ISGs in *Lmx1b*-Knockout-Mäusen. Diese scheint in den Nieren von *Lmx1b*^(-/-)-Tieren deutlich erhöht.

Gen	kodiertes Protein
<i>Ifit3</i>	Interferon-induziertes Protein mit Tetratrikopeptid-Wiederholungen 3
<i>Cxcl10</i>	chemokine (C-X-C motif) ligand 10
<i>Ifi47</i>	Interferon-gamma-induzierbares Protein 47
<i>Tor3a</i>	torsin family 3, member A
<i>Isgf3g</i>	interferon-stimulated gene factor 3 gamma (= interferon regulatory factor 9)
<i>Ifi203</i>	Interferon-aktiviertes Gen 203
<i>Il6st</i>	interleukin 6 signal transducer
<i>Osmr</i>	oncostatin M receptor
<i>Irf2</i>	interferon regulatory factor 2
<i>Ifitm3l</i>	interferon induced transmembrane protein 3-like
<i>Irf2bp1</i>	interferon regulatory factor 2 binding protein 1
<i>Ifnar2</i>	Interferon- α/β -Rezeptor 2
<i>Irf3</i>	interferon regulatory factor 3

Tabelle 23: Interferon-stimulierte Gene, deren Expression in Nieren neugeborener *Lmx1b*^(-/-)-Mäuse in einem Filter-cDNA-Array erhöht war. Aus Nieren von drei neugeborenen *Lmx1b*^(+/+)- bzw. *Lmx1b*^(-/-)-Mäusen isolierte Gesamt-RNA wurde im DKFZ einer Genexpressionsanalyse unterzogen. Bei 13 Interferon-stimulierten Genen war die Expression in *Lmx1b*^(-/-)-Tieren signifikant erhöht. *Ifit1* zeigte als einziges ISG eine leicht verminderte Expression.

3.4.3 Expression von *Lmx1b* und *Isg15* im Thymus von *Lmx1b*-Knockout-Mäusen

Produkte Interferon-stimulierter Gene, darunter auch ISG15, werden zwar hauptsächlich mit der angeborenen, unspezifischen Immunabwehr gegen virale und bakterielle Infektionen in Verbindung gebracht [Zhao, C. et al., 2005], werden aber auch von Lymphozyten sezerniert. So wurde Sekretion von ISG15 u.a. bei einer von humanen T-Lymphozyten abstammenden Zelllinie und bei IFN β -induzierten Primärkulturen von peripheren, sowohl CD4- (T-Helfer-Zellen) als auch CD8-positive (T-Killer-Zellen) Subpopulationen enthaltenden, humanen Blutzellen nachgewiesen [D’Cunha et al., 1996].

T-Lymphozyten wandern nach ihrer Bildung im Knochenmark auf dem Blutweg in den Thymus, ein primäres lymphatisches Organ, ein und durchlaufen hier ihre Differenzierung [Junqueira et al., 2002]. Als deren Zeichen produzieren sie die Marker CD4 und CD8 („cluster of differentiation“) und die Komponenten des T-Zellrezeptors. Nach einer Selektion von immunkompetenten T-Lymphozyten verlassen diese den Thymus und gelangen über den Blutstrom zu den peripheren lymphatischen Organen. Der Thymus erreicht den Höhepunkt seiner Entwicklung in der Pubertät und wird dann fortlaufend rückgebildet [Sobotta und Welsch, 2003]. Zu den sekundären lymphatischen Organen, die von den T-Lymphozyten besiedelt werden, gehören die Lymphknoten und die Milz, in denen sich dichte Ansammlungen dieser Zellen finden [Sobotta und Welsch, 2003].

Daten von Witzgall und Le Hir [Kastner, 2004] haben gezeigt, dass *Lmx1b*^(+/-)-Mäuse auf die Injektion eines gegen die glomeruläre Basalmembran gerichteten Antiserums eine verringerte Immunantwort entwickeln als Wildtyp-Mäuse, bei denen dies zu einer starken Proteinurie führt. Es lag also nahe, die Expression von Interferon-induzierten Genen, die wie gezeigt in den Nieren neugeborener *Lmx1b*^(-/-)-Mäuse erhöht ist (siehe Kapitel 3.4.2), auch bei lymphatischen Organen dieser Tiere zu überprüfen.

Dazu wurden den neugeborenen Mäusen zusätzlich zu den Nieren auch die Milz und der Thymus entnommen. Lymphknoten konnten aufgrund ihrer geringen Größe nicht isoliert und verarbeitet werden. Nach der Genotypisierung der Mäuse wurde aus den Organen von *Lmx1b*^(+/+)- und *Lmx1b*^(-/-)-Mäusen Gesamt-RNA isoliert, aus der wiederum cDNA für die Echtzeit-PCR hergestellt wurde. Zuerst sollte die Expression von *Lmx1b* in Milz und Thymus getestet werden. Abbildung 30 zeigt das Ergebnis dieses Experiments.

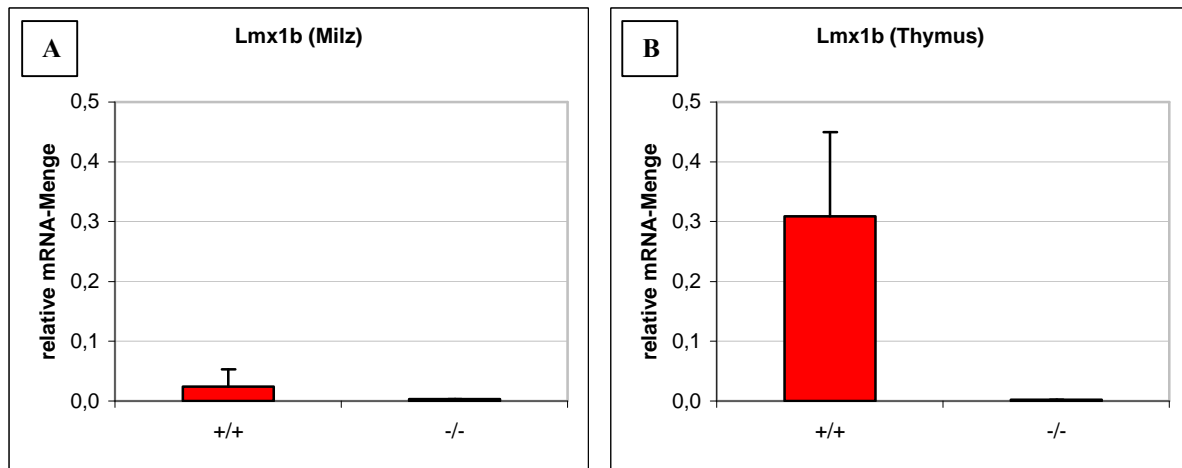


Abbildung 30: Expression von *Lmx1b* in der Milz und im Thymus von neugeborenen *Lmx1b*-Knockout-Mäusen. Aus der Milz (A) und dem Thymus (B) von neugeborenen *Lmx1b*^(+/+)- und *Lmx1b*^(-/-)-Mäusen wurde Gesamt-RNA isoliert und diese in cDNA umgeschrieben. Eine 10 ng RNA entsprechende Menge cDNA wurde dann pro Echtzeit-PCR-Reaktion eingesetzt. Es wurden die Primerpaare mLMX1B F4/R4 und h/mS9 F/R (zur Normalisierung) verwendet. *Lmx1b*-mRNA konnte bei keinem der beiden Genotypen in der Milz detektiert werden. Im Thymus der Wildtyp-Mäuse fand sich eine äußerst geringe Menge der mRNA, beim *Lmx1b*^(-/-)-Genotyp war keine vorhanden.

Weder in der Milz der *Lmx1b*^(+/+)- noch in der der *Lmx1b*^(-/-)-Maus war *Lmx1b*-mRNA zu detektieren. Das Gen scheint in diesem Organ also nicht exprimiert zu werden. Im Gegensatz dazu wurde eine, wenn auch sehr geringe Menge von *Lmx1b*-mRNA im Thymus der Wildtyp-Maus gemessen. Wie beim funktionierenden Knockout zu erwarten und bereits an den Nieren neugeborener Mäuse demonstriert (siehe Kapitel 3.4.1), zeigte der *Lmx1b*^(-/-)-Genotyp diese nicht mehr. Verglichen mit der Niere neugeborener Mäuse (siehe Abbildung 28), bei der die relative *Lmx1b*-mRNA-Menge im Durchschnitt bei 16 lag, ist letztere im Thymus ungefähr um den Faktor 50 niedriger. Es ist nicht auszuschließen, dass sie nicht von den Zellen des Thymus selbst sondern von zirkulierenden, durch den Thymus wandernden Blutzellen stammt. Da *Lmx1b* nur im Thymus und nicht in der Milz exprimiert wurde, sollte nun auch lediglich in diesem Organ die Expression eines Interferon-induzierten Gens untersucht werden. Hierzu wurde *Isg15* ausgewählt.

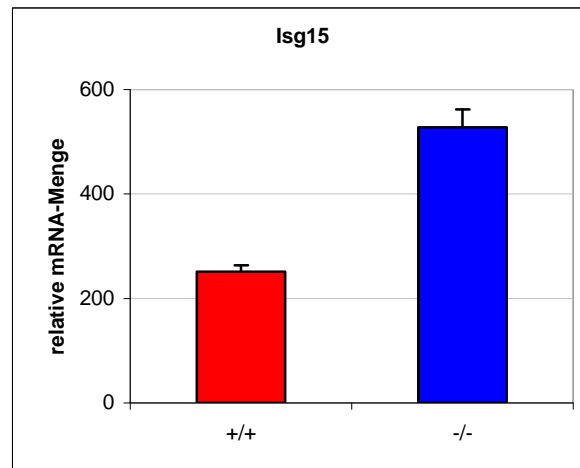


Abbildung 31: Expression von *Isg15* im Thymus von *Lmx1b*-Knockout-Mäusen. Mit einer 10 ng RNA entsprechenden Menge cDNA aus dem Thymus neugeborener *Lmx1b*^(+/+)- und *Lmx1b*^(-/-)-Mäuse wurden Echtzeit-PCR-Reaktionen angesetzt, für die entweder das Primerpaar mISG15 F1/R1 oder h/mS9 F/R verwendet wurde. *Isg15* wurde im Thymus beider Genotypen exprimiert, wobei die detektierte mRNA-Menge bei dem *Lmx1b*^(-/-)-Tier ungefähr doppelt so hoch war wie beim Wildtyp.

In Abbildung 31 ist zu erkennen, dass *Isg15* im Thymus sowohl der *Lmx1b*^(+/+)- als auch der *Lmx1b*^(-/-)-Maus exprimiert wurde. Dabei zeigte das *Lmx1b*^(-/-)-Tier eine erhöhte Transkription. Die detektierte mRNA-Menge war ungefähr doppelt so hoch wie bei der Wildtyp-Maus. Dies entspricht in der Tendenz der bereits an den Nieren der neugeborenen Mäuse beobachteten Erhöhung der *Isg15*-Expression bei den Knockout-Tieren (siehe Kapitel 3.4.1) und bestätigt dieses Ergebnis.

Ferner ergeben sich hieraus Hinweise auf eine mögliche Beteiligung von *Lmx1b* und einer von diesem Transkriptionsfaktor abhängigen Expression von Interferon-stimulierten Genen an Immunreaktionen bei Mäusen. Dieser Theorie soll in einer anderen laufenden Doktorarbeit (Jürgen Kastner) nachgegangen werden.

3.4.4 Untersuchung menschlicher Urothel- und Urothelkarzinom-Zelllinien auf die Bedeutung endogener LMX1B-Produktion für die Entwicklung von Karzinomen

In einer Kooperation mit Dr. Robert Stöhr vom Lehrstuhl für Urologie der medizinischen Fakultät an der Universität Regensburg sollte untersucht werden, ob LMX1B eine Rolle bei der Entwicklung von Tumoren der Urothelzellen aus der menschlichen Blase spielt.

Das *LMX1B*-Gen befindet sich auf Chromosom 9q34. Verlust von Chromosom 9 oder Deletionen in genau diesem Locus werden oftmals bei Urothelzell-Karzinomen beobachtet [Amira et al., 2004]. *TSCI* (tuberöse Sklerose Komplex 1) z.B. ist ein Tumorsuppressorgen, das hier lokalisiert wurde. Dessen Mutation tritt häufig bei Urothelzell-Karzinomen auf [Adachi et al., 2003]. Diese Übereinstimmung des Locus von *LMX1B* und Tumorsuppressorgen und die Beobachtung des wachstumshemmenden Effekts von *LMX1B* auf HeLa-Zellen führten zur Theorie, dass es sich bei *LMX1B* möglicherweise ebenfalls um ein Tumorsuppressorgen handeln könnte. Sein Verlust bzw. Defekt könnte so bei Urothelzellen an der Entstehung von Tumoren beteiligt sein. Unterschiede in der *LMX1B*-Produktion zwischen den verschiedenen Karzinomen könnten sich in unterschiedlicher Malignität widerspiegeln.

3.4.5 Urothel- und Urothelkarzinom-Zelllinien zeigen unterschiedlich starke Expression von *LMX1B*

Damit deren *LMX1B*-Expression untersucht werden konnte, stellte Dr. Robert Stöhr tiefgefrorene Pellets von Zellen verschiedener humaner Zelllinien zur Verfügung (siehe Tabelle 24). Diese Zellen werden routinemäßig zu Studien des Urothelzell-Karzinoms verwendet [Stöhr et al., 2002].

Tabelle 24: Untersuchte humane Zelllinien

Zelllinie	Ursprung	Differenzierungsgrad
UROtsa	gesundes Urothel (immortalisiert mit SV40 large T-Antigen)	
RT4	rückläufiges, niedriggradiges papilläres Karzinom aus dem Urothel	hoch
RT112	Karzinom aus dem Urothel	moderat
J82	invasives, hochgradiges Karzinom aus dem Urothel	schwach

Mit Hilfe der RT-qPCR sollte die Menge von *LMX1B*-mRNA bei den verschiedenen Urothelzelllinien bestimmt werden. Zu diesem Zweck wurde aus den von Dr. Robert Stöhr überlassenen, tiefgefrorenen Pellets der UROtsa-, RT4-, RT112- und J82-Zellen Gesamt-RNA präpariert, aus der anschließend für die Echtzeit-PCR cDNA hergestellt wurde. Um

diese Menge der *LMX1B*-mRNA in ihrer Größenordnung besser einschätzen zu können, wurde ebenfalls cDNA von HEK293T-Zellen (humane embryonale Nierenzellen) eingesetzt.

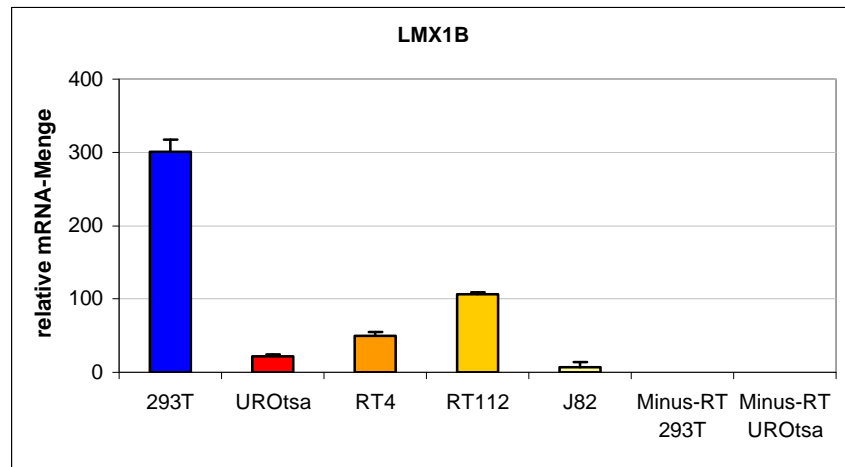


Abbildung 32: RT-qPCR-Analyse der Expression von *LMX1B* bei Urothel- bzw. Urothelkarzinomzellen im Vergleich zu HEK293T-Zellen. Aus UROtsa-, RT4-, RT112- und J82-Zellen wurde RNA isoliert, daraus cDNA synthetisiert und eine 10 ng RNA äquivalente Menge cDNA pro Reaktion in eine Echtzeit-PCR eingesetzt. *LMX1B*-cDNA wurde mit dem Primerpaar h*LMX1B* F7/R7 amplifiziert. Normalisiert wurde mit S9 F/R. Als Vergleich wurde außerdem eine Probe von HEK293T-Zellen gemessen. Alle getesteten Urothelzellen synthetisierten *LMX1B*-mRNA. Dabei gab es Unterschiede zwischen den verschiedenen Zelllinien.

Im Diagramm der Abbildung 32 wird deutlich, dass die getesteten Urothelzelllinien *LMX1B* exprimieren. Die relative mRNA-Menge liegt bei allen Proben unter der von HEK293T-Zellen, bei denen es sich um immortalisierte Zellen einer gesunden menschlichen Niere handelt. Augenfällig ist auch ein Unterschied zwischen den einzelnen Urothel- bzw. Urothelkarzinom-Zelllinien. Die synthetisierte *LMX1B*-mRNA-Menge nahm von den Zellen aus dem gesunden Urothel (UROtsa) über die hoch differenzierten Tumorzellen (RT4) zu den moderat differenzierten Tumorzellen (RT112) jeweils auf das Doppelte zu. Die schwach differenzierten J82-Zellen des invasiven Tumors bildeten jedoch nur ein Drittel der mRNA-Menge der UROtsa-Zellen. Es fanden sich somit starke Unterschiede zwischen den Zellen aus dem gesunden Urothel und den Tumorzellen, es ergab sich jedoch keine eindeutige Korrelation zwischen Tumor- bzw. Differenzierungsgrad und *LMX1B*-Expression. Zur Klärung, ob *LMX1B* die Rolle eines Tumorsuppressorgens in Urothelzellen haben könnte, waren demnach weitere Versuche nötig.

3.4.6 Die Expression von LMX1B-Kofaktoren unterscheidet sich zwischen Urothel- und Urothelkarzinom-Zellen

Über seine LIM-Domänen tritt der Transkriptionsfaktor LMX1B mit anderen Proteinen in Wechselwirkung. Die Bindung dieser sog. Kofaktoren kann positive oder negative Effekte auf die Aktivierung von Genen haben. Demnach führt eine unterschiedliche Verfügbarkeit von Kofaktoren auch zu Unterschieden in der durch LMX1B induzierten Genexpression, was sich so im Grad der Urotheltumore widerspiegeln könnte, falls LMX1B bei deren Suppression eine Rolle spielt.

LDB1 („LIM-domain-binding protein 1“) z.B. ist ein Adaptorprotein, das als Homodimer an LIM-Domänen von LIM-Homöobox-Proteinen bindet [Agulnick et al., 1996; Matthews und Visvader, 2003] und diese mit anderen Transkriptionsfaktoren verbindet. LDB1 bindet auch LMX1B und kann sowohl hemmend [Dreyer et al., 2000] als auch aktivierend [Hobert und Westphal, 2000] auf es wirken. Interessanterweise wurde LDB1 ebenfalls als Teil eines Komplexes mit dem Tumorsuppressorprotein LKB1, welches in verschiedenen Tumoren mutiert ist, beschrieben [Setogawa et al., 2006]. Im Vergleich hierzu handelt es sich bei RLIM („RING finger LIM-domain-binding protein“) um einen ausschließlich negativ regulierenden Kofaktor von LIM-Homöobox-Proteinen [Bach et al., 1999]. Die Expression dieser beiden Kofaktoren sollte nun auch in den Proben der verschiedenen Urothelzellen bestimmt werden, um deren mögliche Beteiligung zusammen mit LMX1B an der Tumorbildung zu untersuchen.

Hierzu wurden dieselben cDNA-Proben, die schon auf *LMX1B*-Expression getestet worden waren (siehe Kapitel 3.4.5), in die Echtzeit-PCR eingesetzt. Die relativen LMX1B-mRNA-Mengen aus Abbildung 32 sind zum Vergleich zusammen mit denen von LDB1 und RLIM in Abbildung 33 noch einmal gezeigt.

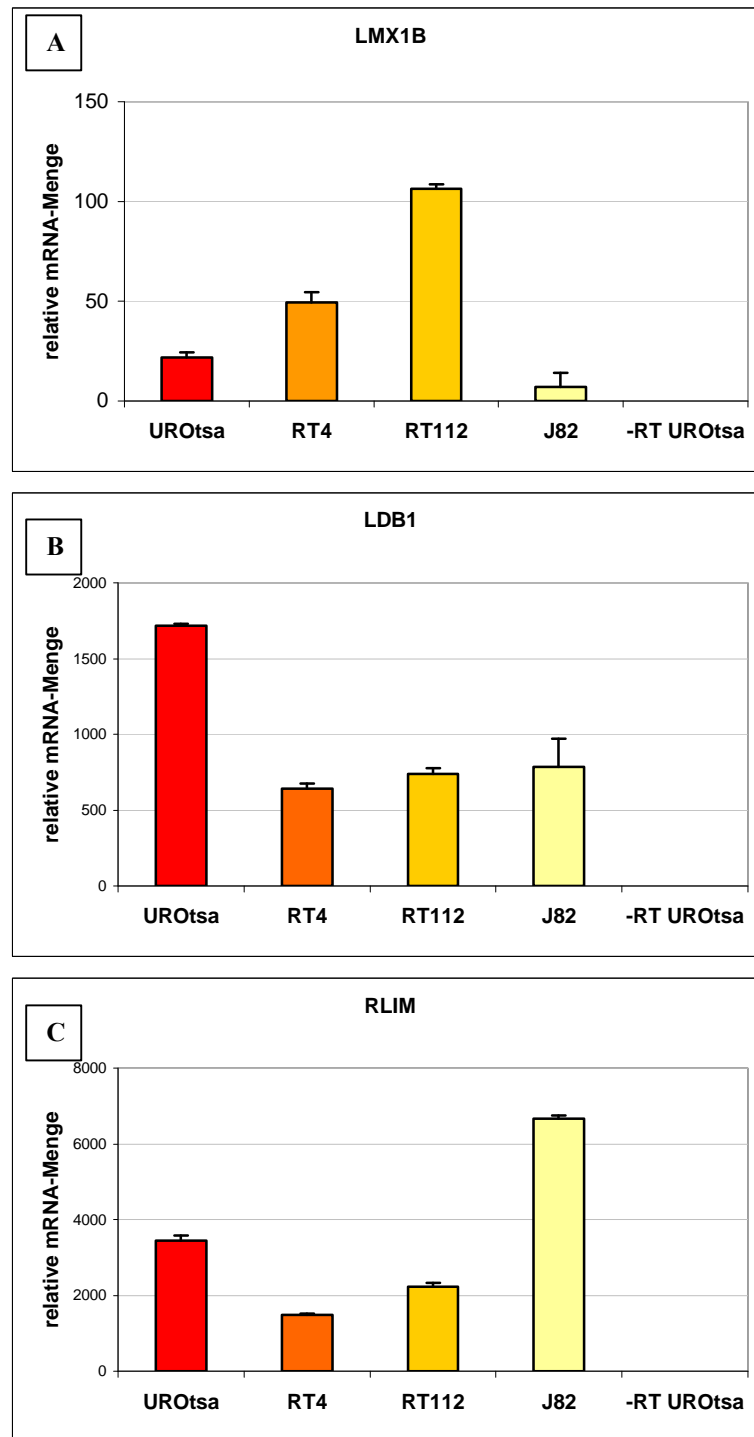


Abbildung 33: RT-qPCR-Analyse der Expression von *LMX1B*, *LDB1* und *RLIM* bei Urothel- und Urothelkarzinomzellen. Aus RNA-Proben von UROtsa-, RT4-, RT112- und J82-Zellen wurde cDNA synthetisiert und von dieser eine 10 ng RNA äquivalente Menge pro Reaktion in eine Echtzeit-PCR eingesetzt. (A) zeigt die Werte der relativen *LMX1B*-mRNA-Menge aus Abbildung 32 ohne den Vergleich mit den HEK293T-Zellen. (B) *LDB1*-cDNA wurde mit dem Primerpaar m/hLDB1 F2/R2 amplifiziert, zur Normalisierung diente S9 F/R. Die Tumorzelllinien zeigten eine auf unter die Hälfte verringerte *LDB1*-Expression. (C) Die *RLIM*-cDNA wurde mit dem Primerpaar hRLIM F2/R2 amplifiziert, zur Normalisierung diente ebenfalls S9 F/R. Die *RLIM*-mRNA-Menge verringerte sich von den UROtsa- zu den RT4-Zellen auf die Hälfte und stieg über die RT112- zu den J82-Zellen sogar auf das Doppelte an.

Die semiquantitative Bestimmung von LDB1-mRNA ergab einen deutlichen Unterschied zwischen den ursprünglich aus einem gesunden Urothel stammenden Zellen und den aus Tumoren gewonnenen Zelllinien (Abbildung 33A). Alle drei Tumorzelllinien zeigten im Vergleich zu den UROtsa-Zellen einen auf unter die Hälfte verringerten LDB1-mRNA Gehalt. Zwischen den RT4-, RT112- und J82-Zellen bestand kein auffallender Unterschied, allenfalls ein leichter Anstieg von den hoch differenzierten RT4- zu den schwach differenzierten J82-Zellen war zu erkennen.

Bei der Quantifizierung von RLIM-mRNA ergab sich ein uneinheitlicheres Bild. Wie Abbildung 33B zeigt, sank zunächst von den UROtsa- zu den RT4-Zellen die mRNA-Menge um etwas mehr als die Hälfte. Dies wurde auch schon bei der LDB1-mRNA beobachtet. Im Gegensatz hierzu war jedoch ein deutlicherer Anstieg von der RT4- zu der RT112-Probe zu erkennen, und die J82-Probe enthielt fast doppelt so viel RLIM-mRNA wie die Probe der gesunden Urothelzellen.

Die differenzierte Expression von LMX1B und seinen Kofaktoren LDB1 und RLIM in den Urothel- und verschiedenen Urothelkarzinomzellen muss Auswirkungen auf das komplexe Zusammenspiel dieser Proteine in den entsprechenden Zellen haben. Dieses wiederum beeinflusst die Expression anderer Gene und könnte sich so bei entsprechenden Zielgenen auch in Tumorbildung äußern bzw. im Tumorgrad widerspiegeln.

3.4.7 Die Expression von Genen des Interferon- β -Signalwegs ist in Urothelkarzinomzellen erhöht

Wie in Abschnitt 3.3 beschrieben, bewirkt die Überexpression von *LMX1B* in den HtTA-1/myc-LMX1B-Zellen eine Veränderung der Expression von Genen, die am Interferon- β -Signalweg beteiligt sind. Da die *LMX1B*-, *LDB1*- und *RLIM*-Expression in den Urothel- und Urothelkarzinomzellen verschieden ist, sollte überprüft werden, ob es auch hier einen Unterschied in der mRNA-Menge von Genen des Interferon- β -Systems gibt.

Zum einen wurde *IFN β* selbst getestet, zum anderen zwei Gene, deren Expression durch Interferon- β stimuliert wird: *ISG15* und *IRF-7*. Die Transkription beider Gene wird nach Bindung von Interferon- β an seinen Rezeptor und Aktivierung des JAK/STAT-Signalwegs

induziert, indem der ISGF3 („interferon-stimulated gene factor 3“-Komplex gebildet wird und an das ISRE („interferon-stimulated response element“) der Gene bindet [Taniguchi und Takaoka, 2002; Stark et al., 1998].

Für diesen Versuch wurden nur die am schwächsten differenzierten Zellen aus dem invasiven Tumor mit den von einem gesunden Urothel stammenden UROtsa-Zellen verglichen.

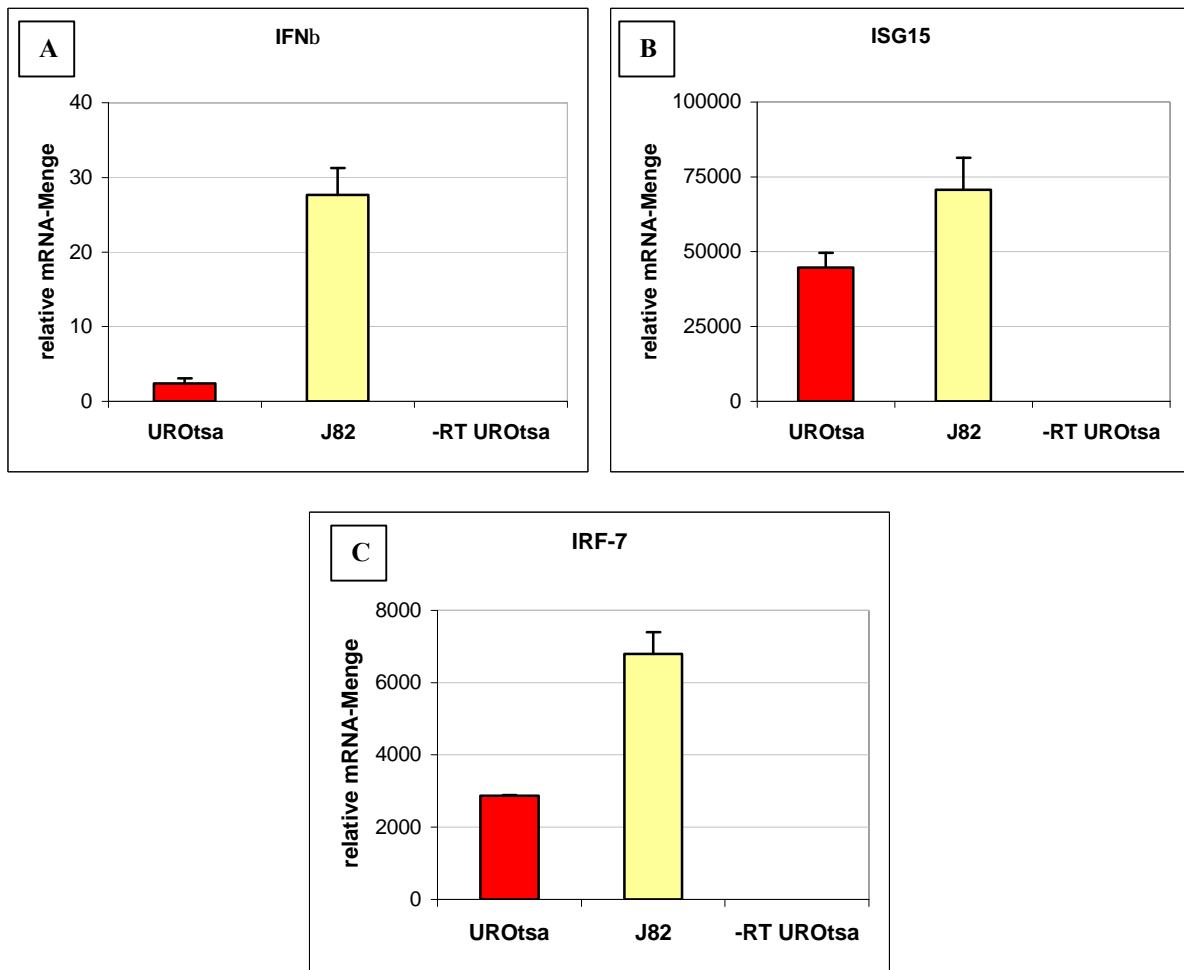


Abbildung 34: RT-qPCR-Analyse der Expression von *IFN β* , *ISG15* und *IRF7* in UROtsa- und J82-Zellen. Von RNA aus UROtsa- und J82-Zellen wurde cDNA synthetisiert und von dieser eine 10 ng RNA entsprechende Menge pro Echtzeit-PCR-Reaktion eingesetzt. Es wurden die Primerpaare hIFN β F1/R1, hISG15 F1/R1 und hIRF7 F2/R2 sowie S9 F/R zur Normalisierung verwendet. Die Expression aller drei Gene war in den J82-Zellen erhöht.

Die drei untersuchten Gene *IFN β* , *ISG15* und *IRF7* zeigten alle drei eine erhöhte Expression in den Urothelkarzinomzellen J82 im Vergleich zu den Zellen aus dem gesunden Urothel. Am stärksten ausgeprägt war diese Differenz beim Interferon- β -Gen, hier war die mRNA-Menge

in den J82-Zellen 11-fach erhöht. Die *IRF7*-Expression zeigte einen 2,4-fachen Unterschied, die *ISG15*-Transkription steigerte sich lediglich um den Faktor 1,6.

Die erhöhte *ISG15*- und *IRF7*-Expression könnte eine Folge von gesteigerter Interferon- β -Synthese sein, da beide Gene durch dieses Zytokin stimulierbar sind. Bei *IRF-7* handelt es sich zusätzlich noch um ein Zielgen des Transkriptionsfaktors NF- κ B, welcher in HeLa-Zellen durch LMX1B aktiviert zu werden scheint (siehe Kapitel 3.3.8). Auch *IFN β* ist ein anscheinend über die Aktivierung von NF- κ B durch LMX1B induziertes Gen. Die Beobachtung, dass die Expression von *ISG15*, *IRF-7* und *IFN β* in den Tumorzellen, die ja eine schwächere *LMX1B*-Transkription aufweisen als die Zellen aus dem gesunden Gewebe, erhöht ist, deckt sich mit den bei den Knockout-Mäusen gemachten Erfahrungen. Auch hier war die Expression der Gene nicht, wie nach den Experimenten mit den HeLa-Zellen zu erwarten, in den *Lmx1b*^(-/-)-Tieren erniedrigt, sondern erhöht.

Für die endgültige Klärung der Frage, ob LMX1B wirklich eine essentielle Rolle bei der Entwicklung von Tumoren im Urothel der menschlichen Blase spielt, wären weitere Versuche notwendig.

4. Diskussion

4.1 Einführung

Podozyten sind eine Komponente der glomerulären Filtrationsbarriere in der menschlichen Niere. Die Zellen synthetisieren die für die Filtration des Blutes und Bildung des Primärharns essentielle glomeruläre Basalmembran. Zwischen den Fußfortsätzen der Podozyten spannt sich die sog. Schlitzmembran, deren Poren und Oberflächenladung ebenfalls einen hohen Anteil zur Ultrafiltration im Glomerulus beitragen [Übersicht bei Pavenstädt et al., 2003].

Über die Transkriptionsregulation in Podozyten ist noch wenig bekannt [Rasclé et al., 2007]. Einer der wenigen Transkriptionsfaktoren, für die mittlerweile eine Rolle in diesen Zellen nachgewiesen werden konnte, ist LMX1B, ein Mitglied der LIM-Homöodomäne-Proteine. Mutationen im *LMX1B*-Gen sind für eine autosomal-dominant vererbte Erkrankung namens Nagel-Patella-Syndrom (NPS) verantwortlich [Dreyer et al., 1998; McIntosh et al., 1998; Vollrath et al., 1998]. Die meisten bekannten Mutationen liegen in Bereichen, die für eine der beiden proteinbindenden LIM-Domänen oder die DNA-bindende Homöodomäne kodieren [Übersicht bei Bongers et al., 2002]. Eine kleine Anzahl von Mutationen existiert jedoch auch im für die mutmaßliche Transaktivierungsdomäne kodierenden Bereich. LIM-Homöodomäne-Transkriptionsfaktoren wie LMX1B regulieren die Expression von Genen, die während der Entwicklung Zell- bzw. Gewebedifferenzierung und Körperbauplan bestimmen [Übersicht bei Curtiss und Heilig, 1998]. Bei Patienten mit NPS treten in Übereinstimmung hiermit u.a. Skelettanomalien, Anomalien der Hornhaut des Auges und eine Nephropathie auf [Übersicht bei Sweeney et al., 2003], welche auch bei der *Lmx1b*-Knockout-Maus nachgewiesen wurden [Chen et al. 1998]. Dies gilt insbesondere für Anomalien der Podozyten und der glomerulären Basalmembran in der Niere. An der Knockout-Maus konnte gezeigt werden, dass *Lmx1b* die Expression der Gene für Kollagen IV α 3 und Kollagen IV α 4, Podocin und CD2AP reguliert [Morello et al., 2001; Miner et al., 2002; Rohr et al., 2002]. Ein Mangel dieser Proteine konnte jedoch in Nierenbiopsien von NPS-Patienten nicht nachgewiesen werden [Heidet et al., 2003].

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, LMX1B näher zu charakterisieren, um seine Funktion in der Zelle und damit seine Rolle bei Differenzierung und Krankheitsbildung besser verstehen zu können. Der Schwerpunkt der Arbeit lag dabei auf der transkriptionsregulatorischen Funktion von LMX1B, auch im Hinblick auf den wachstumsinhibierenden Effekt, den der Transkriptionsfaktor auf HeLa-Zellen ausübt [Prestel, 2003].

4.2 Die durch LMX1B erhöhte Induktion der NF- κ B-Zielgene und Interferon-stimulierten Gene ist spezifisch und wie die Wachstumsinhibition von der LIM2-Domäne abhängig

Der bisher unbekannt stimulierende Effekt von LMX1B auf die Expression von NF- κ B-Zielgenen und Interferon-stimulierten Genen (ISGs) ist das zentrale Ergebnis der vorliegenden Arbeit. Er wird in Kapitel 4.3 ausführlich diskutiert. Im Folgenden wird zunächst ein Experiment erläutert, dass die Spezifität dieses neu identifizierten Effekts untermauert.

Für die Wachstumsinhibition, die LMX1B in HeLa-Zellen auslöst [Prestel, 2003], ist die LIM2-Domäne des Transkriptionsfaktors essentiell. Die auch bei Patienten mit Nagel-Patella-Syndrom identifizierte LMX1B-Mutante C95F, bei der die Struktur dieser Domäne zerstört ist [Bongers et al., 2002], übt daher keinen erkennbaren Einfluss auf die Proliferation der HeLa-Zellen aus [Kastner, 2004]. Da es sich bei der LIM2-Domäne um eine der beiden proteinbindenden Domänen handelt, scheint LMX1B für die Wachstumsinhibition mit mindestens einem anderen Protein zu interagieren. Der wachstumsinhibierende Effekt wird vermutlich durch die oben genannte, mit der Induktion von NF- κ B-Zielgenen verbundene Induktion von ISGs vermittelt. Deshalb wurde exemplarisch an dem ISG *GIP3* und dem NF- κ B-Zielgen *IL-8* überprüft, ob die LIM2-Domäne tatsächlich bereits auf dieser Ebene von essentieller Bedeutung ist. Aus der Beobachtung, dass sowohl die als Kontrolle in Medium ohne Doxyzyklin gewachsenen untransfizierten HtTA-1-Zellen als auch die das LMX1B (C95F)-Protein synthetisierenden Zellen im Gegensatz zu den das LMX1B-Wildtyp-Protein produzierenden Zellen keine signifikant erhöhte GIP3- oder IL-8-mRNA-Menge zeigten (siehe Abbildung 13), lassen sich mehrere Schlüsse ziehen:

1. Wie die Wachstumsinhibition [Prestel, 2003; Kastner, 2004; siehe auch Abbildung 2, diese Arbeit] ist die Geninduktion kein unspezifischer Effekt der Doxyzyklin-Konzentration im Medium. Dies konnte ebenfalls am Beispiel der *ISG15*-Expression im Zuge eines Vergleichs von RNase-Protection-Assay und RT-qPCR bewiesen werden (siehe Abbildung 9 und Abbildung 10).
2. Wie die Wachstumsinhibition [Kastner, 2004] ist die Geninduktion kein unspezifischer Effekt der Überexpression eines Proteins von der Größe LMX1Bs. Dies zeigten auch im Rahmen einer hier anknüpfenden Doktorarbeit als Kontrolle verwendete HfTA-1-Zellen, welche die H-Kette des humanen Ferritins produzieren [Cozzi et al., 2000]. Obwohl die Synthese des Proteins ebenfalls eine Wachstumsinhibition zur Folge hat, war bei diesen Zellen keine erhöhte Expression von ISGs zu beobachten [Anne-Sarah Raschta, persönliche Mitteilung].
3. Die LIM2-Domäne von LMX1B ist für die Induktion von NF- κ B-Zielgenen und ISGs essentiell. Da LMX1B über seine LIM-Domänen mit anderen Proteinen in Wechselwirkung tritt, scheint die Bindung mindestens eines Proteins für diese Induktion unabdingbar sein.

4.3 LMX1B reguliert die Expression von NF- κ B-Zielgenen und stimuliert dadurch die Expression von Interferon-stimulierten Genen

Die in Kapitel 4.2 eingeführte Regulation von NF- κ B-Zielgenen und Interferon-stimulierten Genen in LMX1B-produzierenden Zellen wurde im Verlauf dieser Arbeit eingehend erforscht. Dabei waren vor allem der zugrunde liegende Mechanismus und weitere beteiligte Komponenten von Interesse.

Den ersten Hinweis auf eine Induktion von NF- κ B-Zielgenen durch LMX1B lieferte die mittels RT-qPCR-Analyse ermittelte deutliche Erhöhung der basalen Expression der Gene für Interferon- β (*IFN β*) und Interleukin-6 (*IL-6*) (siehe Abbildung 14 und Abbildung 20). Zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung war kein ELISA für humanes IFN β verfügbar, jedoch konnte die Sekretion dieses Zytokins im späteren Verlauf der Arbeit indirekt durch Inhibierung seiner biologischen Aktivität mittels neutralisierendem Antikörper bewiesen

werden (siehe unten). Eine Gemeinsamkeit von *IFN β* und *IL-6* ist ihre Induktion durch das heterodimere NF- κ B-Protein p50/RELA (p65) [Pahl, 1999; Kim et al., 2000; Chen und Greene, 2004]. Auch die Gene für das Zytokin Interleukin-1 β und das Chemokin Interleukin-8, zwei klassische NF- κ B-Zielgene, zeigten bei einer späteren Analyse eine deutliche Induktion in LMX1B-produzierenden Zellen (siehe Abbildung 24).

Die folgenden Befunde verdeutlichen die besondere Stellung dieser vier Gene unter der Vielzahl von in LMX1B-produzierenden HeLa-Zellen verstärkt exprimierten Genen. Bei einer Inkubation von HeLa-Zellen mit Interferon- β zeigten *GIP3*, *IRF-9*, *STAT1*, *PKR* und *TLR3* (siehe Abbildung 21) sowie *IRF-1*, *IRF-7* und *STAT2* (Daten nicht gezeigt) bereits mit geringen Konzentrationen des Zytokins eine starke, in einem Plateau endende Erhöhung ihrer Expression. Dagegen reagierte die Transkription von *IL-6* nur äußerst träge. *IFN β* , *IL-1 β* und *IL-8* wurden unter den Versuchsbedingungen überhaupt nicht stimuliert (siehe ebenfalls Abbildung 21). Dies geschah erst bei längerer Inkubation mit höherer IFN β -Konzentration (siehe Abbildung 22). Die Inkubation von LMX1B-synthetisierenden HeLa-Zellen mit einem die Bioaktivität von IFN β neutralisierenden Antikörper inhibierte die durch LMX1B-Produktion hervorgerufene Erhöhung der Expression von *GIP3*, *STAT1*, *IRF-7*, *PKR*, *TLR3* (siehe Abbildung 23) sowie *ISG15*, *STAT2* und *IRF-1* (Daten nicht gezeigt) stark bis vollständig. Dagegen konnte die erhöhte Transkription von *IFN β* nur mäßig, die von *IL-8* nur schwach gehemmt werden (siehe Abbildung 23 und Abbildung 25). Die *IL-6*- und die *IL-1 β* -Expression zeigten sich sogar unbeeinflusst von der Neutralisierung des Zytokins (siehe ebenfalls Abbildung 23 und Abbildung 25). Tatsächlich wurde die Expression von *IL-1 β* durch Inkubation mit dem Antikörper sogar erhöht.

Die Stimulation mit IFN β beweist, dass der positive Rückkopplungsmechanismus im Interferon- β -Signalweg, bei dem das Zytokin seine eigene Transkription steigert, auch in den HeLa-Zellen funktioniert. Unumstritten ist jedoch, dass *IFN β* , *IL-6*, *IL-1 β* und *IL-8* wesentlich unempfindlicher gegenüber einer IFN β -Stimulation als die übrigen in LMX1B-produzierenden Zellen stimulierten Gene sind. Das Experiment mit dem neutralisierenden Antikörper bestätigt zunächst einmal, dass nicht nur das Gen für Interferon- β in HeLa-Zellen grundsätzlich und in den LMX1B-produzierenden Zellen verstärkt transkribiert wird, sondern dass auch das IFN β -Protein in entsprechender Weise gebildet wird. Des Weiteren muss es von den Zellen auch sezerniert werden, da der

neutralisierende Antikörper ausschließlich extrazellulär an IFN β binden kann. Der inhibierende Einfluss des Antikörpers beweist, dass IFN β durch die Bindung an seinen auch in HeLa-Zellen exprimierten Rezeptor (siehe Abbildung 15) ein Signal an die entsprechenden Zellen gibt, dessen Weiterleitung am Ende zur Induktion weiterer Gene führt. Die unterschiedliche Stärke der Inhibition durch den Antikörper spiegelt wieder, in welchem Maß die Induktion von IFN β abhängt. So ist anzunehmen, dass die in LMX1B-synthetisierenden Zellen beobachtete Erhöhung der Expression von *GIP3*, *ISG15*, *STAT1*, *STAT2*, *IRF-1*, *IRF-7*, *PKR* und *TLR3* gänzlich durch das verstärkte IFN β -Signal ausgelöst wird, da hier eine Inhibition von bis zu 100% erfolgte. Im Gegensatz dazu scheinen die durch IFN β nur schwach induzierbaren und durch den neutralisierenden Antikörper ebenfalls nur schwach bzw. gar nicht beeinflussten Gene *IFN β* , *IL-6*, *IL-1 β* und *IL-8* weiter stromaufwärts induziert zu werden. Bei dem durch den Antikörper immerhin teilweise inhibierten *IFN β* handelt es sich insofern um eine Ausnahme, als dass es bekanntermaßen selbst ein Interferon-induzierbares Gen ist. IFN β verstärkt seine eigene Expression durch den über IRF-7 laufenden positiven Rückkopplungsmechanismus [Sato et al., 2000]. An der anfänglichen Induktion der NF- κ B-Zielgene *IFN β* , *IL-6*, *IL-1 β* und *IL-8* scheint LMX1B in noch zu klärender Art und Weise mehr oder weniger direkt beteiligt zu sein.

Um mit einer zweiten Methode die Ergebnisse des den neutralisierenden Antikörper für Interferon- β verwendenden Experiments zu überprüfen, wurde versucht, mittels RNA-Interferenz (RNAi) den IFN α/β -Rezeptor auszuschalten und so das IFN β -Signal an die Zellen zu unterbinden. Tatsächlich zeigte dieses Experiment eine wesentlich schwächere Inhibition von *IL-6* in den LMX1B-produzierenden Zellen als von *GIP3* und *IRF-7*. Die Ergebnisse des Antikörper-Experiments wären dadurch bestätigt. Da jedoch der Knockdown der beiden Rezeptorketten leider nur auf mRNA-Ebene und nicht auf Proteinebene nachgewiesen werden konnte, wurde von einer Weiterführung der Experimente abgesehen und auf eine Darstellung der Daten in dieser Arbeit verzichtet. Wahrscheinlich handelte es sich hier um ein Problem bei der Spezifität der für die Western-Blot-Analyse verwendeten Antikörper. Nachfolgenden Arbeiten bleibt es vorbehalten, nach Optimierung dieser Kontrolle die Experimente wieder aufzunehmen und weitere Gene zu testen.

Außer *IFN β* , *IL-6*, *IL-1 β* und *IL-8* waren im Rahmen dieser Arbeit auch die NF- κ B-Zielgene *IRF-1*, *IRF-2*, *IRF-7*, *STAT5a*, *IFN γ* , *NF κ B p50*, *NF κ BIA* und *MCP-1* auf ihre Expression in LMX1B-synthetisierenden HeLa-Zellen getestet worden. Davon waren *IFN γ* , *NF κ B p50* und

das für den NF- κ B-Inhibitor I κ B- α kodierende [Pahl, 1999] *NF κ BIA* von der LMX1B-Produktion vollkommen und *STAT5a* nahezu unbeeinflusst (siehe Abbildung 14, Abbildung 11, Abbildung 24 und Abbildung 16). *IRF-7*, *IRF-1* und *IRF-2* zeigten eine deutliche Erhöhung ihrer Expression (siehe Abbildung 17), die jedoch schwächer ausfiel als die von *IFN β* , *IL-6*, *IL-1 β* und *IL-8* (siehe Abbildung 14, Abbildung 20 und Abbildung 24). Die Expression von *MCP-1 (CCL-2)*, das für ein Chemokin, dessen Produktion in HeLa-Zellen nach Infektion mit *T. gondii* erhöht ist [Kim et al., 2001], kodiert, war sogar vermindert (siehe Abbildung 24). Damit wird deutlich, dass nicht jedes Zielgen von NF- κ B durch die LMX1B-Produktion beeinflusst werden kann. Am stärksten reagierten diejenigen NF- κ B-Zielgene auf LMX1B, die sich sowohl bei Stimulation von HeLa-Zellen durch Inkubation mit Interferon- β als auch bei Neutralisierung von dessen biologischer Aktivität bei LMX1B-synthetisierenden Zellen als relativ unabhängig von IFN β erwiesen hatten. Die Induktion von durch den neutralisierenden Antikörper stark gehemmten Genen wie *IRF-7* geht dagegen wohl auf die erhöhte IFN β -Sekretion der LMX1B-produzierenden Zellen und nicht auf eine direkte Induktion durch LMX1B oder NF- κ B zurück.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte also gezeigt werden, dass LMX1B in HeLa-Zellen die Expression einer Gruppe von NF- κ B-Zielgenen wie *IL-6*, *IL-8*, *IL-1 β* und *IFN β* positiv reguliert. (Wie hier anknüpfende Arbeiten bereits andeuten, geschieht dies vermutlich direkt durch Bindung an deren Promotoren (siehe Kapitel 4.4)). Weiterhin wurde gezeigt, dass das daraufhin verstärkt synthetisierte und auch sezernierte Interferon- β -Protein die Expression von Interferon-induzierten Genen wie z.B. *ISG15* und *GIP3*, *IRF-1* und *IRF-7* sowie in positiver Rückkopplung *IFN β* selbst stimuliert. In Abbildung 35 ist dieses System der Genregulation graphisch dargestellt.

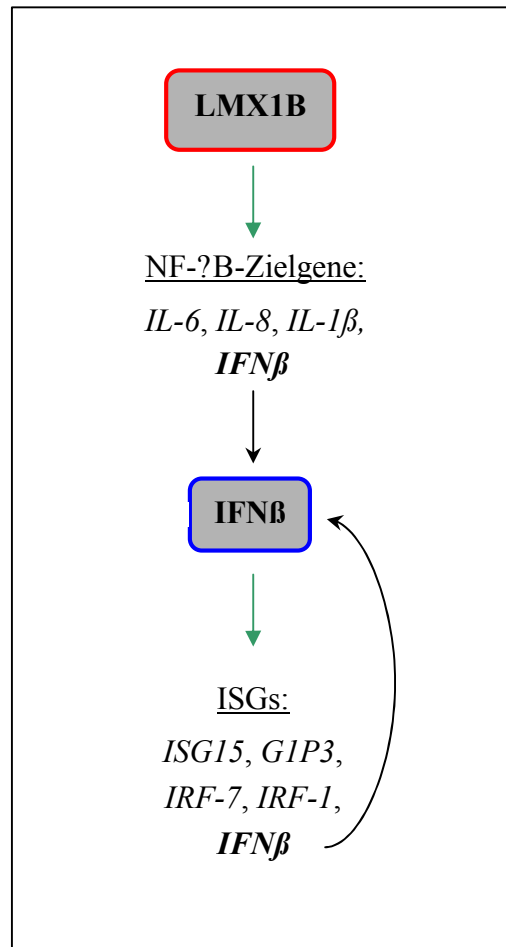


Abbildung 35: Die durch LMX1B aktivierte Genexpression in HeLa-Zellen. LMX1B induziert die Expression von NF-κB-Zielgenen, darunter *IFNβ*. Das IFNβ-Protein wird synthetisiert und sezerniert und aktiviert durch Bindung an seinen Rezeptor in der Plasmamembran eine Signalkaskade, über welche Interferon-stimulierte Gene (ISGs) induziert werden. Da es sich bei *IFNβ* ebenfalls um ein ISG handelt, wird die Synthese von Interferon-β in einem positiven Rückkopplungsmechanismus verstärkt. Auch IRF-1 und IRF-7 spielen bei diesem Rückkopplungsmechanismus eine wichtige Rolle (nicht dargestellt).

4.4 Mögliche Modelle der Regulation von NF-κB-Zielgenen durch LMX1B

Welcher Mechanismus könnte nun der Induktion bestimmter NF-κB-Zielgene durch LMX1B zugrunde liegen? LMX1B verstärkt nicht die Transkription der NF-κB-Komponenten p50 und p65 (siehe Abbildung 11) und kann somit nicht auf dieser Ebene für eine erhöhte Verfügbarkeit des Transkriptionsfaktors sorgen. Demnach übt LMX1B entweder auf Proteinebene einen Einfluss auf NF-κB aus oder induziert die betroffenen Gene direkt. Um zu überprüfen, ob NF-κB selbst an der Induktion beteiligt ist, wurde die Aktivität von NF-κB

durch den Einsatz von Prostaglandin A₁ (PGA₁) inhibiert. PGA₁ hemmt die IκB-Kinase (IKK), welche durch Katalyse der Phosphorylierung des im Zytoplasma an NF-κB gebundenen IκBs („inhibitor of κB“) dessen Degradierung auslöst. Das NF-κB-Dimer wird dadurch frei und kann in den Zellkern wandern, um dort seine Funktion als Transkriptionsfaktor zu erfüllen [Li und Verma, 2002]. Die Spezifität von PGA₁ für den NF-κB-Signalweg ist jedoch nicht sehr hoch. Der Einsatz des Prostaglandins hemmte zwar die Expression von *IFNβ*, *IL-1β* und *GIP3* (siehe Abbildung 26), der inhibierende Effekt von PGA₁ auf die durch LMX1B verursachte Induktion war jedoch sehr variabel (siehe Abbildung 27). Das als Negativkontrolle betrachtete Haushaltsgen *S9* wurde nicht durch die Prostaglandin-Behandlung beeinflusst (siehe Abbildung 26), und der Effekt der Blockierung von NF-κB auf die Induktion von *IFNβ*, *IL-1β* und *GIP3* durch LMX1B könnte echt sein. Dennoch ist eine Interpretation der Daten eher schwierig, und das Ergebnis dieses Experiments sollte mit anderen Methoden überprüft werden.

Für die Funktion LMX1Bs in HeLa-Zellen lassen sich nun folgende Modelle aufstellen:

1. indirekte Aktivierung von NF-κB-Zielgenen über Aktivierung des NF-κB-Komplexes durch
 - a) transkriptionelle Aktivierung eines positiven Regulators des NF-κB-Signalwegs, oder
 - b) positive Regulierung der transkriptionellen Aktivität NF-κBs im Zellkern, sowie
2. direkte Aktivierung von NF-κB-Zielgenen durch LMX1B.

1. Indirekte Aktivierung von NF-κB-Zielgenen über Aktivierung des NF-κB-Komplexes

Könnte mit anderen Methoden das Ergebnis des PGA₁-Experiments reproduziert werden, müsste LMX1B auf Proteinebene einen aktivierenden Effekt auf den Transkriptionsfaktor NF-κB ausüben und die NF-κB-Zielgene damit nur indirekt beeinflussen.

1.a) Aktivierung des NF- κ B-Komplexes durch transkriptionelle Aktivierung eines positiven Regulators des NF- κ B-Signalwegs

Abbildung 36 zeigt das erste denkbare Modell der NF- κ B-Aktivierung, bei dem LMX1B die Transkription eines positiven Regulators des NF- κ B-Signalweges induziert. In diesem Fall wäre eine erhöhte Translokation NF- κ Bs vom Zytoplasma in den Zellkern zu erwarten.

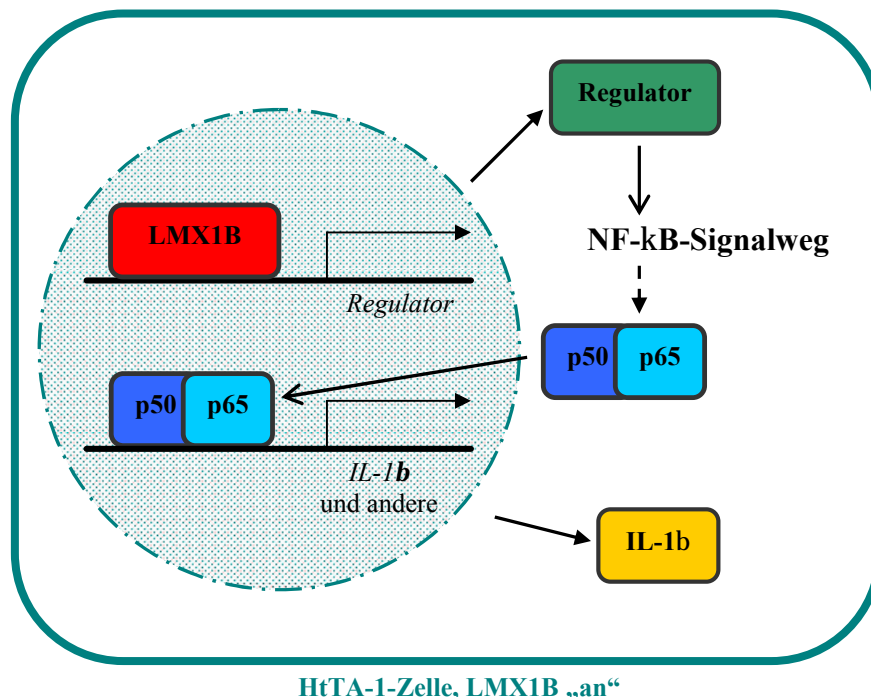


Abbildung 36: Transkriptionelle Aktivierung eines positiven Regulators. LMX1B bindet an regulatorische Sequenzen eines für einen positiven Regulator des NF- κ B-Signalwegs kodierenden Gens und induziert so dessen Expression. Das Regulatorprotein ist danach an der Aktivierung des NF- κ B-Komplexes im Zytoplasma beteiligt. Der aktivierte Komplex kann nun in den Zellkern wandern und die Expression der NF- κ B-Zielgene induzieren.

Auch wenn das Experiment, bei dem mit PGA_1 NF- κ B gehemmt wurde, auf eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors in LMX1B-synthetisierenden Zellen hindeutet, ist obiges Modell eher unwahrscheinlich. Es beinhaltet eine generelle Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs, was sich nicht mit der Beobachtung, dass nur ein Teil der Zielgene des Transkriptionsfaktors aktiviert wird, vereinbaren lässt. In einer an die vorliegende Arbeit anknüpfenden Doktorarbeit [Anna-Sarah Raschta] soll zur Abklärung die Translokation NF- κ Bs in den Zellkern immunzytochemisch und durch Western-Blot-Analyse nukleärer und zytosolischer Lysate untersucht werden. Dazu ist der Einsatz eines Antikörpers für die p65-Untereinheit des Transkriptionsfaktors bei Zellen mit an- und Zellen mit abgeschalteter LMX1B-Synthese

vorgesehen. Des Weiteren sollen als Ergänzung zur Hemmung NF- κ Bs durch PGA_1 weitere für NF- κ B spezifische Inhibitoren bei LMX1B-produzierenden Zellen eingesetzt werden. Würden die Ergebnisse des PGA_1 -Experiments damit wider Erwarten bestätigt, könnten sich gleichzeitig wichtige Hinweise auf den Schritt ergeben, an dem LMX1B den NF- κ B-Signalweg indirekt aktiviert. Dies wäre möglich, da es an verschiedenen Stationen des Signaltransduktionswegs, an dessen Ende NF- κ B aktiviert wird, Ansatzpunkte für dessen Inhibierung gibt. Zunächst sind der Einsatz von Oridonin, das die DNA-Bindeaktivität von NF- κ B zerstört [Ikezoe et al., 2005] und der Einsatz von JSH-23, das zusätzlich dazu auch die Translokation in den Zellkern blockiert [Shin et al., 2004], geplant. In einem weiteren Ansatz soll mittels Köder-Oligonukleotiden die Aktivität von NF- κ B gehemmt werden. Diese doppelsträngigen Oligonukleotide enthalten ein Enhancer-Element mit hoher Affinität für NF- κ B. Sie binden an freie NF- κ B-Moleküle und verhindern so deren Interaktion mit den Promotoren der Zielgene [Tomita et al., 2003]. Verschiedene Gruppen konnten diese Methode bereits erfolgreich für NF- κ B auch in HeLa-Zellen anwenden [Tomita et al., 1998; Fichtner-Feigl et al., 2005; Fichtner-Feigl, persönliche Mitteilung]. Ferner soll im Rahmen einer laufenden Doktorarbeit [Anne-Sarah Raschta] mittels RNA-Interferenz die Expression des Gens für die p65-Untereinheit NF- κ Bs gehemmt werden. Die beiden letztgenannten Methoden erlauben jedoch keine Differenzierung zwischen dem oben genannten Modell und den folgenden Möglichkeiten.

1.b) Aktivierung des NF- κ B-Komplexes durch positive Regulierung der transkriptionellen Aktivität NF- κ Bs im Zellkern

Bei einem nukleären Effekt von LMX1B auf die NF- κ B-Aktivität wäre keine erhöhte Translokation des p50/p65-Dimers vom Zytoplasma in den Zellkern zu erwarten. Es gibt mehrere Wege, über welche die Aktivität NF- κ Bs im Zellkern aktiviert wird:

- durch erhöhte Acetylierung oder verminderte Deacetylierung NF- κ Bs [Übersicht in Chen und Greene, 2003],
- durch Regulation des Phosphorylierungszustands von NF- κ B [Übersicht bei Chen und Greene, 2004],
- oder durch Protein/Protein-Interaktion.

Für letztere Möglichkeit lassen sich in Zusammenhang mit LMX1B verschiedene Hypothesen aufstellen. So könnte LMX1B z.B. an den NF- κ B-Repressor RAI (RelA-assoziiertes Inhibitor) binden. RAI wurde im Hefe-Zwei-Hybrid-System als möglicher Interaktionspartner von LMX1B identifiziert [Rohr, Dissertation in Vorbereitung]. Es ist ein nukleäres, in Herz, Plazenta und Prostata stärker, in der Niere in geringen Mengen synthetisiertes Protein, das *in vitro* und *in vivo* an die p65 (RelA)-Untereinheit von NF- κ B bindet. Kotransfektion von RAI und p65 in HEK293-Zellen inhibierte die DNA-Bindeaktivität von p65 und die von NF- κ B abhängige Genexpression [Yang et al., 1999]. Neuere Studien identifizierten RAI als C-terminales Fragment eines größeren Proteins namens iASPP („inhibitor of ASPP protein“) im Menschen und Nkip1 („NF- κ B interacting protein 1“) in der Maus, das ebenfalls *in vivo* mit p65 interagiert [Herron et al., 2005]. Wahrscheinlich binden RAI bzw. Nkip1 p65 über ihre C-terminalen Ankyrin-repeats, die auch andere NF- κ B-Inhibitoren für ihre Interaktion mit NF- κ B verwenden [Rothwarf und Karin, 1999]. Es wäre nun vorstellbar, dass in Zellen mit abgeschalteter LMX1B-Produktion RAI an NF- κ B bindet und dessen induzierende Wirkung auf seine Zielgene hemmt. In LMX1B-produzierenden Zellen konkurriert das LMX1B-Protein mit NF- κ B um RAI, fängt es ab und verhindert damit die Hemmung NF- κ Bs. Die NF- κ B-Zielgene werden induziert. Dieses Modell ist in Abbildung 37 gezeigt.

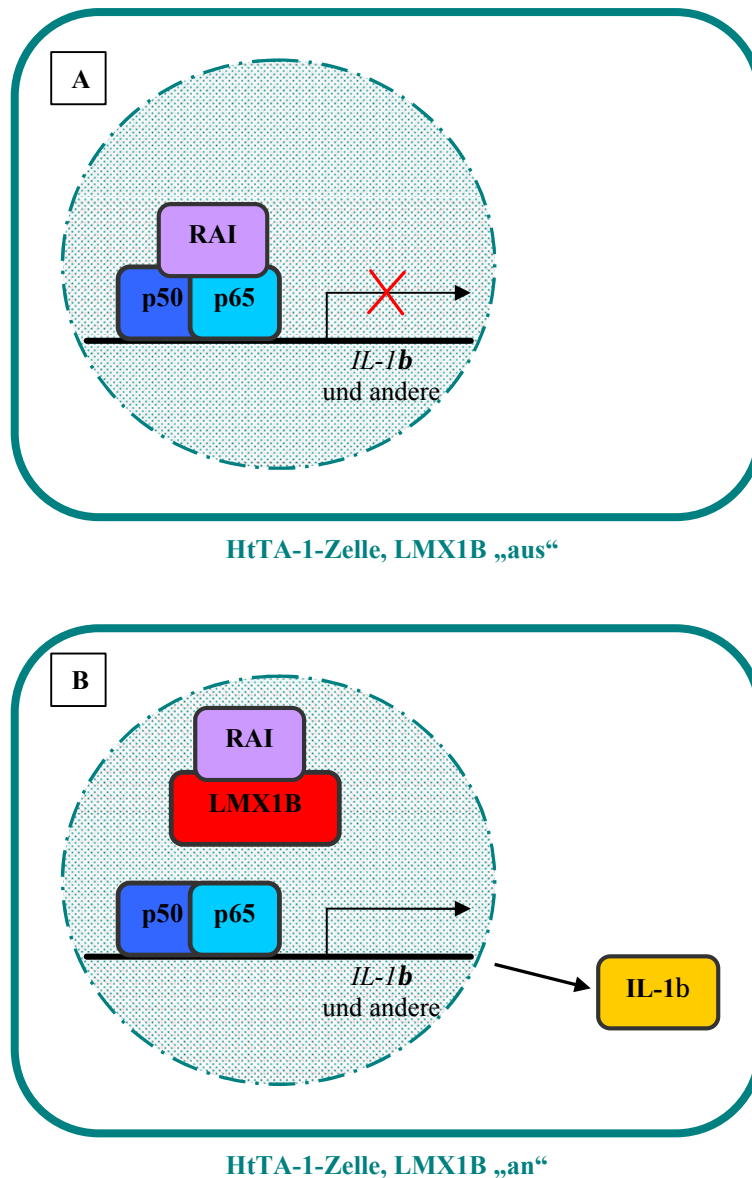


Abbildung 37: Neutralisierung des NF-κB-Repressors RAI. (A) In Abwesenheit des LMX1B-Proteins bindet RAI an NF-κB und hemmt dessen transkriptionelle Aktivität. (B) LMX1B interagiert mit RAI, welches NF-κB nun nicht mehr durch Bindung hemmen kann. Die NF-κB-Zielgene werden aktiviert.

Ferner wäre denkbar, dass RAI wie in Abbildung 38 dargestellt als Adaptorprotein, das eine transkriptionelle Kooperation von LMX1B und NF-κB ermöglicht, fungiert.

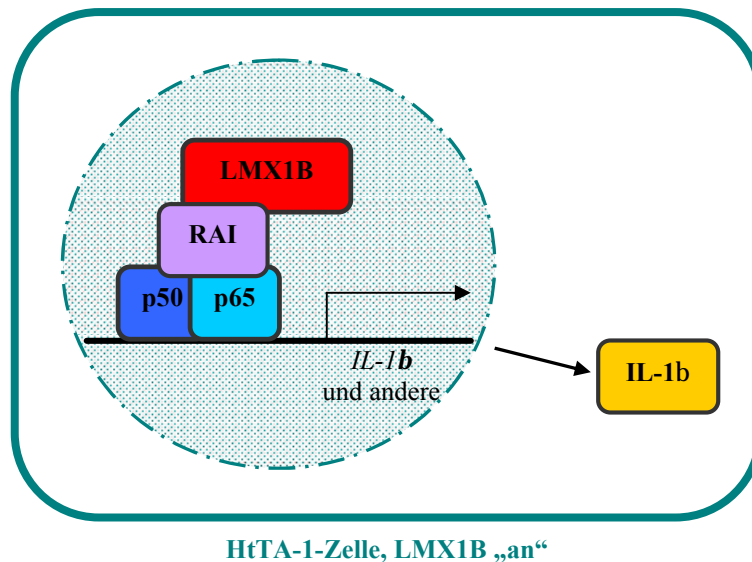


Abbildung 38: RAI als Adaptorprotein. LMX1B interagiert mit RAI, welches die Funktion eines Adaptorproteins erfüllt und die Bildung eines Komplexes mit NF-κB ermöglicht. Dieser Komplex höherer Ordnung aktiviert die NF-κB-Zielgene.

Um die Beteiligung RAIs an der LMX1B-induzierten Expression von NF-κB-Zielgenen zu überprüfen, ist die Synthese von RAI in den HeLa-Zellen, die LMX1B induzierbar produzieren, geplant. Die dadurch erhöhte Verfügbarkeit von RAI-Molekülen könnte zu einer wieder verstärkten Interaktion von RAI mit NF-κB und damit zur Hemmung des Transkriptionsfaktors führen. Die verstärkte Expression von *IL-1b*, *IFNβ* und den anderen Zielgenen würde damit aufgehoben werden. Zusätzlich soll die Interaktion von LMX1B und RAI im Rahmen einer laufenden Diplomarbeit [Eva Heining] in einer Ko-Immunpräzipitation getestet werden. Diese gab erste Hinweise darauf, dass ein von LMX1B und RAI gebildeter Komplex nicht zu einer weiteren Bindung von NF-κB fähig ist. Damit ist das Modell der konkurrierenden Interaktion zwischen diesen Proteinen das wahrscheinlichere der beiden gezeigten.

Eine weitere Möglichkeit der Interaktion ist die direkte Bindung von LMX1B an NF-κB ähnlich der von nTRIP6 an NF-κB. TRIP6 ist ein LIM-Protein aus der Zyxin-Familie und besitzt als solches C-terminal drei LIM-Domänen [Yi und Beckerle, 1998]. nTRIP6 ist eine nukleäre Isoform von TRIP6, die wahrscheinlich durch alternatives Spleißen entsteht. In HeLa-Zellen scheint nTRIP6 konstitutiv mit der NF-κB-Untereinheit p65 assoziiert zu sein und als Koaktivator des Transkriptionsfaktors zu fungieren [Kassel et al., 2004]. Die Bindung von nTRIP6 an p65 kann sowohl über die erste als auch über die zweite der drei LIM-

Domänen, aber auch über eine Kombination der beiden erfolgen. Kassel et al. vermuten, dass nTRIP6 weitere Koaktivatoren durch Protein-Protein-Interaktion in einen Komplex mit NF- κ B rekrutiert. Eine andere Gruppe konnte zeigen, dass Überexpression von *TRIP6* die Aktivierung von *TNF* und anderen Genen durch NF- κ B potenziert, während eine dominant-negative Mutante von TRIP6 diese inhibiert [Li et al., 2004]. Vielleicht bindet LMX1B, wie Abbildung 39 zeigt, ebenfalls über eine seiner LIM-Domänen an p65. Dabei müsste es sich um die LIM2-Domäne handeln, da diese im Gegensatz zur LIM1-Domäne für die durch LMX1B in den HeLa-Zellen hervorgerufenen Veränderungen unverzichtbar zu sein scheint (siehe Kapitel 4.2). Damit wäre jedoch eine Funktion als Adaptorprotein für die Rekrutierung weiterer Transaktivatoren in einen Komplex mit NF- κ B auszuschließen.

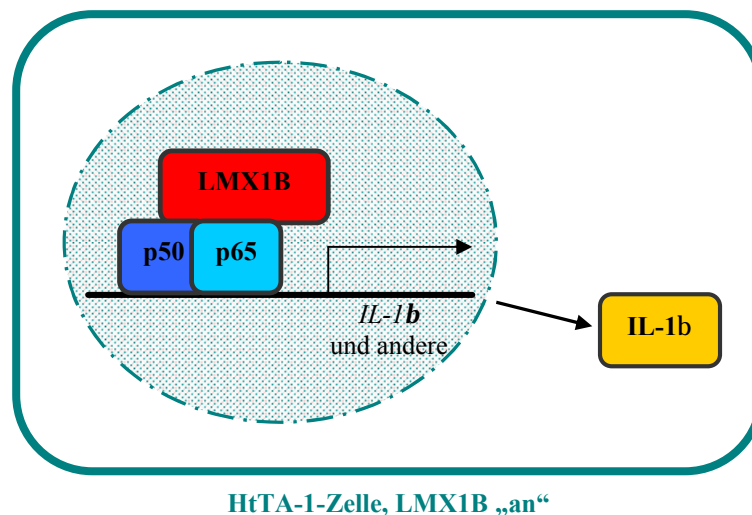


Abbildung 39: Interaktion von LMX1B und NF- κ B. LMX1B bindet mit mindestens einer seiner LIM-Domänen an NF- κ B. Dieser Komplex aktiviert die NF- κ B-Zielgene.

Die potentielle Interaktion von LMX1B und NF- κ B wird in einer hier ansetzenden Diplomarbeit [Eva Heining] ebenfalls durch Ko-Immunpräzipitation getestet. Dabei bereits gemachte Beobachtungen scheinen gegen eine Bindung der beiden Transkriptionsfaktoren zu sprechen. In diesem Fall würde dieses Modell ausscheiden.

2. Direkte Aktivierung von NF- κ B-Zielgenen durch LMX1B

Bei diesem in Abbildung 40 skizzierten Modell bindet LMX1B in seiner Funktion als Transkriptionsfaktor mit seiner Homöodomäne an regulatorische Sequenzen der NF- κ B-Zielgene und aktiviert damit deren Expression, möglicherweise in Kooperation mit NF- κ B.

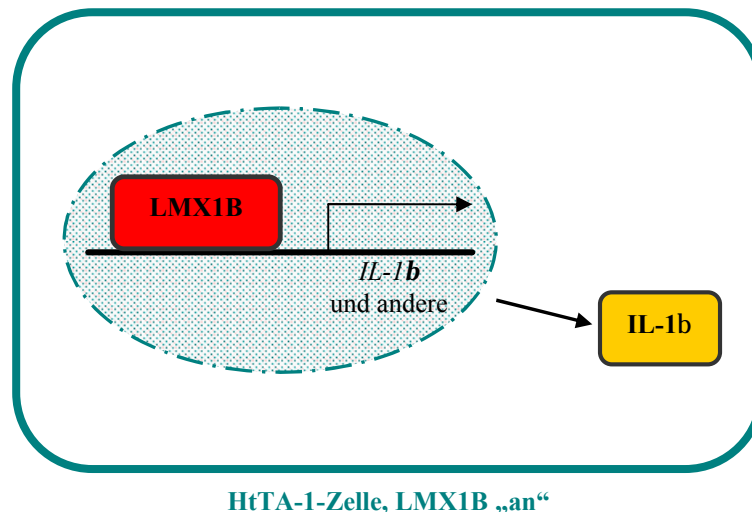


Abbildung 40: Direkte Aktivierung von NF- κ B-Zielgenen. LMX1B bindet an regulatorische Sequenzen und induziert so die Expression der betreffenden Gene.

Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wird in einer hier anknüpfenden Doktorarbeit [Astrid Neumann] bei HeLa-Zellen mit ab- bzw. angeschalteter LMX1B-Produktion die Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) [Kuo und Allis, 1999] angewendet. Mit dieser Methode sollen *in vivo* gebildete Protein-DNA-Komplexe mit einem Antikörper für LMX1B immunpräzipitiert und die aufgereinigten Bruchstücke genomischer DNA mittels Echtzeit-PCR auf ihren Anteil an NF- κ B-Zielgen-DNA untersucht werden. Erste Tests lieferten Hinweise darauf, dass LMX1B tatsächlich an die DNA von NF- κ B-Zielgenen binden kann. In diesem Fall würde das oben gezeigte Modell in den HeLa-Zellen zutreffen, und es bliebe noch zu klären, welche Rolle die Bindung von LMX1B an RAI hierbei spielt, und ob und gegebenenfalls wie LMX1B und NF- κ B ohne gegenseitige Bindung (siehe oben) kooperieren.

4.5 Die Interferon- β -vermittelte Regulation der ISG-Expression durch LMX1B

Allen Modellen ist die resultierende Induktion verschiedener NF- κ B-Zielgene, darunter auch *IFN β* , gemeinsam. Die in Folge erhöhte Produktion des IFN β -Proteins induziert nach Sekretion in derselben und in benachbarten Zellen wiederum eine Vielzahl anderer Gene. Von diesen sind einige Teil eines positiven Rückkopplungsmechanismus, andere könnten durch Einwirken auf den Zellzyklus das Wachstum der HeLa-Zellen hemmen. Die Bindung sezernierten IFN β s an seinen Rezeptor in der Plasmamembran kann mehrere Signalwege aktivieren. Unter diesen ist der für die antiviralen und wachstumsinhibierenden Effekte von Interferon benötigte [Stark et al., 1998] JAK/STAT-Signalweg der klassische und am besten erforschte. Die RT-qPCR-Analyse von Proben aus HeLa-Zellen mit an- und abgeschalteter LMX1B-Produktion zeigte deutlich eine Beeinflussung verschiedener seiner Komponenten durch LMX1B.

So wurde die Expression von *STAT1* und *STAT2* sowie von *IRF-9* durch LMX1B-Synthese deutlich erhöht (siehe Abbildung 16 und Abbildung 17). Bei den drei Proteinen handelt es sich um die Komponenten des ISGF3-Komplexes, der die Transkription von Interferon-stimulierten Genen aktiviert. Auch die Expression der drei bekanntermaßen durch Typ I-Interferon stimulierbaren Gene für IRF-1, IRF-2 und IRF-7 [Taniguchi und Takaoka, 2002; Takaoka und Taniguchi, 2003; Lehtonen et al., 1997] war erhöht. Die Transkription des nicht durch Typ I-IFN stimulierbaren [Taniguchi et al., 2001] *IRF-3* war dagegen unverändert. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass das IFN β -Signal in den LMX1B-synthetisierenden HeLa-Zellen nicht allein über die Aktivierung konstitutiv vorhandener STAT1-, STAT2- und IRF-9-Moleküle in den Zellkern weitergeleitet wird, sondern dass auch erhöhte intrazelluläre Mengen dieser Moleküle das Signal transportieren. Dieses Phänomen wurde bereits bei IFN α -stimulierten Makrophagen beobachtet [Lehtonen et al., 1997]. *STAT1*, *STAT2* und *IRF-9* könnten selbst unter direkter transkriptioneller Regulierung durch IFN β stehen. Der *STAT2*-Promotor besitzt in der Tat ein unvollständiges, jedoch funktionstüchtiges ISRE [Yan et al., 1995]. Es wäre aber auch ein anderer IFN-induzierbarer Rückkopplungsmechanismus, z.B. über IRF-1, denkbar. Auch IRF-7 könnte die *IFN β* -Expression und die dadurch bedingte Induktion von ISGs in einem positiven Rückkopplungsmechanismus verstärken. IRF-1 verstärkt vermutlich ebenso die Expression von *IFN β* und induziert selbst die Transkription einer Reihe von dem Interferon- β -System

zugeordneten Genen. Außerdem ist es möglich, dass IRF-1 ursächlich an der in den LMX1B-produzierenden Zellen beobachteten erhöhten Expression von *p21* beteiligt ist (siehe Kapitel 4.7). Letztlich übt IRF-2 eine regulierende Funktion auf dieses System vielfältig verstärkter Transkription aus.

Neben den oben genannten Elementen des JAK/STAT-Signalwegs wurden mit der Serin/Threonin-Proteinkinase PKR und Toll-like Rezeptoren (TLRs) weitere wichtige Mitspieler bei der Regulation von und durch Interferon- β untersucht. Dabei zeigten LMX1B-synthetisierende HeLa-Zellen eine leichte Erhöhung der Expression des Gens für die wegen ihrer Induzierbarkeit durch Typ I-Interferon [Meurs et al. 1990] auch als „interferon-inducible, dsRNA-dependent protein kinase“ bezeichnete PKR (siehe Abbildung 18). Als Vermittler der antiviralen und antiproliferativen Wirkung von Interferonen stimuliert sie über die Aktivierung der I κ B-Kinase NF- κ B [Zamanian-Daryoush et al., 2000] und dadurch u.a. auch an der Regulation des Zellzyklus beteiligte Gene. Diese Aktivierung von NF- κ B durch PKR könnte auch für die oben erwähnte Induktion von *IFN β* durch IRF-1 von essentieller Bedeutung zu sein. IRF-1-vermittelte *IFN β* -Induktion und Wachstumsinhibition korrelierten mit der Expression von PKR [Kirchhoff et al., 1995], und IRF-1 scheint über PKR NF- κ B, mit dem es synergistisch am *IFN β* -Promotor wirkt, zu aktivieren [Kirchhoff et al., 1999]. NF- κ B, IFN β , PKR und IRF-1 bilden demnach ein System der synergistischen Wirkung und positiven Rückkopplung, das an der Wachstumsinhibition in LMX1B-synthetisierenden Zellen beteiligt zu sein scheint.

Aktivierung von TLR3, TLR4, TLR7, TLR8 oder TLR9 kann die Produktion von Typ I-Interferonen stimulieren [Hertzog et al., 2003; Mogensen und Paludan, 2005]. Weder in den nicht-induzierten noch in den induzierten Zellen konnte *TLR7*-, *TLR8*- oder *TLR9*-mRNA nachgewiesen werden. HeLa-Zellen scheinen demnach keinen dieser drei Rezeptoren zu produzieren. Dies ist nicht ungewöhnlich, da die Synthese der einzelnen bekannten Toll-like Rezeptoren von Gewebe zu Gewebe sehr unterschiedlich ist [Zarembek und Godowski, 2002]. *TLR3* und *TLR4* dagegen wurden von den HeLa-Zellen exprimiert, Produktion von LMX1B steigerte diese Expression (siehe Abbildung 19). Beide TLRs sind in der Lage, durch IRF-3 und IRF-7 vermittelt IFN β zu stimulieren [Sakaguchi et al., 2003; Honda et al., 2005; Moynagh, 2005]. In Immunzellen kann in einem positiven Rückkopplungsmechanismus über die Aktivierung von ISGF3 auch *TLR3* durch IFN β

induziert werden [Miettinen et al., 2001]. In HeLa-Zellen könnte letzteres vielleicht auch für TLR4 gelten. TLR3 und TLR4 würden demnach ebenfalls eine Rolle bei der von LMX1B ausgelösten und über Interferon- β laufenden Induktion verschiedener anderer Gene spielen. Im Hinblick auf die mögliche Beteiligung der beiden Rezeptoren an LMX1B-vermittelten Vorgängen *in vivo* sei erwähnt, dass ihre Anwesenheit ebenfalls in der menschlichen Niere nachgewiesen werden konnte [Zarembler und Godowski, 2002]. Über die Funktion von Toll-like Rezeptoren abseits des Immunsystems und der Abwehr von Infektionen liegen nur wenige Erkenntnisse vor. Es gibt jedoch Hinweise auf eine wichtige Rolle dieser Rezeptoren bei Erkrankungen der Niere und die Existenz endogener Liganden neben den bekannten exogenen, von Pathogenen stammenden Liganden [Anders et al., 2004].

Um die in diesem Kapitel postulierte zeitliche Abfolge der Ereignisse genauer zu untersuchen, könnten Proben der HeLa-Zellen mit an- bzw. abgeschalteter LMX1B-Produktion in geringeren Zeitabständen für die RNA-Gewinnung und nachfolgende RT-qPCR-Analyse gewonnen werden. Die in dieser Arbeit verwendeten Proben wurden in Abständen von zwei Tagen genommen, Abstände von zwölf Stunden würden eine höhere Auflösung der Kaskade von Geninduktionen gewährleisten.

4.6 **Biologische Signifikanz**

Da die induzierbare Synthese von LMX1B in den HeLa-Zellen ein zwar leicht zu kontrollierendes, flexibles und etabliertes, jedoch recht artifizielles System ist, wurde mit der *Lmx1b*-Knockout-Maus auch ein *in vivo*-Modell untersucht. Um die physiologische Rolle des Einflusses von *Lmx1b* auf den Interferon- β -Signalweg in den Podozyten aufzuklären, wurden Nieren neugeborener *Lmx1b*^(+/+)- und *Lmx1b*^(-/-)-Mäuse für die Experimente herangezogen. Die RT-qPCR-Analyse der Expression von *Isg15*, *Irf-7* und *Irf-9* ergab überraschenderweise eine höhere relative Menge der entsprechenden mRNAs in den Knockout-Tieren (siehe Abbildung 28). Basierend auf den für die HeLa-Zellen erhaltenen Ergebnissen, die eine Erhöhung der Expression dieser und anderer Gene durch LMX1B-Produktion zeigten, wären erniedrigte mRNA-Mengen in den Knockout-Tieren zu erwarten gewesen. Zwei voneinander unabhängig durchgeführte Genexpressionsanalysen mittels cDNA-Array, für die ebenfalls Nieren neugeborener *Lmx1b*^(+/+)- und *Lmx1b*^(-/-)-Mäuse verwendet wurden, bestätigten das

Ergebnis der RT-qPCR-Analyse (siehe Tabelle 22 und Tabelle 23). Sie lieferten eine Reihe Interferon-stimulierter Gene, deren Expression in den *Lmx1b*^(-/-)-Tieren erhöht war.

Um noch etwas mehr über die Funktion von Lmx1b in der Mäuseniere zu erfahren, wurde die Expression von *Isg15* auch in den Nieren adulter Mäuse betrachtet. Da *Lmx1b*^(-/-)-Mäuse postnatal sterben, konnten ausschließlich Gewebe adulter *Lmx1b*^(+/+)- und *Lmx1b*^(+/-)-Mäuse untersucht werden. Zwischen den beiden getesteten Genotypen bestand kein Unterschied in der relativen *Isg15*-mRNA-Menge (siehe Abbildung 29). Hier könnte sich eine veränderte Bedeutung der von Lmx1b beeinflussten ISG-Expression während der Entwicklung des Organs widerspiegeln. Die Verhältnisse bei neugeborenen und ausgewachsenen Tieren deuten darauf hin, dass sie zwar während der embryonalen Entwicklung, nicht aber im ausgereiften Zustand der Mäuseniere eine Rolle spielt.

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse lässt sich sagen, dass LMX1B nicht nur in HeLa-Zellen, sondern auch *in vivo* in der Niere neugeborener Mäuse Einfluss auf die Expression von Genen des Interferon- β -Systems ausübt. Seine Wirkung ist jedoch in den beiden Systemen genau entgegengesetzt. In den HeLa-Zellen wirkt LMX1B aktivierend, in den Nieren der neugeborenen Mäuse inhibierend auf die Expression von ISGs. In den HeLa-Zellen werden die ISGs durch LMX1B indirekt über die erhöhte Synthese von Interferon- β induziert. In den Nieren konnte mittels RT-qPCR jedoch keine IFN β -mRNA detektiert werden [Daten nicht gezeigt]. Entweder ist die Expression *IFN* β s selbst für diese sensitive Methode zu niedrig, oder die betreffenden ISGs werden dort über einen anderen Mechanismus aktiviert. Auch das NF- κ B-Zielgen *IL-6* wird in der Niere von *Lmx1b*^(-/-)-Mäusen verstärkt exprimiert [Anne Rascle und Jürgen Kastner, persönliche Mitteilungen]. Eine verstärkte Expression dieses Gens sowie von *IL-1 β* wurde ebenfalls im Auge dieser Mäuse detektiert [Jürgen Kastner, persönliche Mitteilung]. Die Induktion der NF- κ B-Zielgene durch Lmx1b könnte also sowohl bei der Entwicklung der murinen Niere als auch des Auges von Bedeutung sein.

Als Modell für die Aktivierung von NF- κ B-Zielgenen durch LMX1B wäre unter Einbezug der oben vorgestellten Ergebnisse nun das für die HeLa-Zellen vorgestellte Modell der direkten Aktivierung am wahrscheinlichsten. Im murinen Gewebe müsste zusätzlich ein Korepressor von Lmx1b vorhanden sein, der für die Hemmung dieser Gene beim Wildtyp mitverantwortlich ist. Im HeLa-Zellsystem müsste dieser Korepressor entweder fehlen bzw.

seine Menge limitiert sein oder ein Koaktivator existieren, der die Induktion der Gene ermöglicht, sobald LMX1B an ihre Promotoren gebunden ist. Diese möglichen Modelle sind in Abbildung 41 dargestellt.

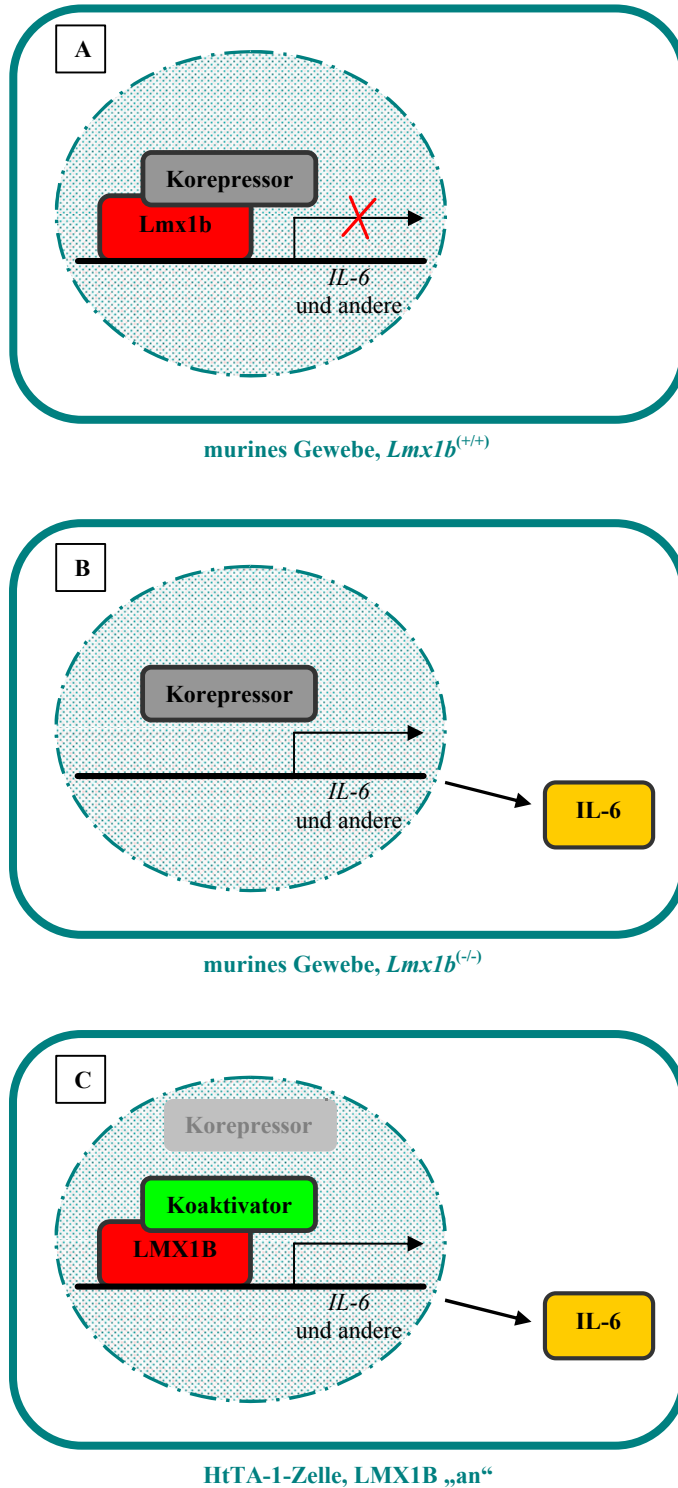


Abbildung 41: Mögliche Kofaktoren von Lmx1b/LMX1B am Promotor von NF-?B-Zielgenen in der Maus und HeLa-Zellen. (A) Bei der Wildtyp-Maus vermindert die Bindung eines Komplexes aus Lmx1b und einem Korepressor die Expression von NF-?B-Zielgenen. (B) Bei der *Lmx1b*-Knockout-Maus ist durch Fehlen des

hemmenden Komplexes die Expression der betreffenden Gene induziert. (C) In den HeLa-Zellen kann LMX1B durch das Fehlen des Korepressors und/oder die Bindung eines Koaktivators *IL-6* und andere Gene aktivieren.

Der Gegensatz von HeLa-Zellen und Mäusen ist nicht ungewöhnlich, da die Genexpression des Menschen und die der Maus häufig voneinander abweichen. Auch im speziellen Fall von LMX1B sind Unterschiede zwischen Mensch und Maus bereits bekannt. So wird das Nagel-Patella-Syndrom beim Menschen autosomal-dominant vererbt, und es wird Haploinsuffizienz als pathogenetischer Wirkmechanismus der *LMX1B*-Mutationen angenommen [McIntosh et al., 1998; Dunston et al., 2004], während heterozygote Mäuse keinen offensichtlichen Phänotyp zeigen [Chen et al., 1998].

Neben der möglichen Rolle der *Lmx1b*-gesteuerten Expression von Interferon-stimulierten Genen bei der murinen Organentwicklung wurde auch eine Beteiligung derselben bei der Immunreaktion untersucht. *Lmx1b*^(+/-)-Mäuse reagierten in einem von Witzgall und Le Hir durchgeführten Experiment auf die Injektion eines gegen die glomeruläre Basalmembran gerichteten Antikörpers mit einer schwächeren Immunantwort als Wildtyp-Mäuse. Die als Indikator beobachtete Proteinurie war bei den heterozygoten Tieren deutlich vermindert [persönliche Mitteilung]. Als Erklärung für dieses Phänomen sind zwei Möglichkeiten denkbar. 1. Die Struktur der glomerulären Basalmembran könnte in den *Lmx1b*^(+/-)-Tieren so verändert sein, dass der Antikörper nicht mehr binden kann. Diese Möglichkeit ist eher unwahrscheinlich, da das genaue Epitop des Antikörpers zwar unbekannt ist, die Basalmembran von *Lmx1b*^(+/-)-Mäusen jedoch bis zu einem Alter von einem Jahr elektronenmikroskopisch keine morphologischen Abnormalitäten aufweist [Rohr et al., 2002]. 2. Bei den *Lmx1b*^(+/-)-Tieren liegt ein Defekt in der Immunantwort vor. In der Literatur werden keine Auffälligkeiten im Bereich des Immunsystems bei Patienten mit Nagel-Patella-Syndrom erwähnt. Jedoch werden Glomerulonephritiden meist durch Störung im Immunsystem verursacht [Jennette und Thomas, 2001], weswegen es dennoch interessant erschien, die Expression von *Lmx1b* in lymphatischen Organen zu überprüfen. Die RT-qPCR zeigte keine Expression des *Lmx1b*-Gens in der Milz von Wildtyp-Mäusen, im Thymus konnte jedoch eine geringe Menge seiner mRNA detektiert werden. Diese war bei den Knockout-Tieren nicht nachweisbar (siehe Abbildung 30). Da die in der Milz detektierte mRNA-Menge um den Faktor 50 kleiner war als die in den Nieren detektierte Menge, ist allerdings nicht auszuschließen, dass es sich um eine „Verunreinigung“ aus zirkulierenden, durch den Thymus wandernden Blutzellen handelt. Unter diesen Blutzellen befindet sich eine

große Anzahl von T-Lymphozyten. Diese wandern nach ihrer Bildung im Knochenmark auf dem Blutweg in das Organ ein und durchlaufen dort ihre Differenzierung [Junqueira et al., 2002]. Interessanterweise werden Produkte Interferon-stimulierter Gene auch von T-Lymphozyten sezerniert. So wurde z.B. die Sekretion von ISG15 bei IFN β -induzierten Primärkulturen von peripheren humanen Blutzellen, die sowohl CD4- (T-Helfer-Zellen) als auch CD8-positive (T-Killer-Zellen) Subpopulationen enthielten, nachgewiesen [D’Cunha et al., 1996]. Das gleiche gilt für eine von humanen T-Lymphozyten abstammende Zelllinie. Neben der humoralen Immunantwort [Le Hir, 2004] spielt die Vermittlung durch T-Helfer-Zellen die größte Rolle bei der Entwicklung einer Glomerulonephritis [Tipping und Holdsworth, 2003]. Dies waren Gründe genug, auch die Expression von *Isg15* in den Thymus-Proben zu untersuchen. In der Tat wurde *Isg15*-mRNA in den Proben detektiert, wobei die mRNA-Menge im Thymus des Knockout-Tieres im Vergleich zum Wildtyp auf das Doppelte erhöht war (siehe Abbildung 31). Damit wird zum einen die bereits bei den Nieren beobachtete Tendenz der erhöhten ISG-Expression in den *Lmx1b*^(-/-)-Mäusen bestätigt. Zum anderen wird eine Bedeutung von *Lmx1b* und der von ihm gesteuerten Expression von Interferon-stimulierten Genen bei der murinen Immunreaktion impliziert. In einer mittlerweile abgeschlossenen Diplomarbeit [Kastner, 2004] konnten jedoch keine Hinweise auf eine Beteiligung von T-Zellen bei einem Immundefekt von *Lmx1b*^(-/-)-Mäusen gefunden werden. Damit rückt der Thymus selbst wieder in den Vordergrund der Betrachtungen. So ist z.B. die durch das Masern-Virus ausgelöste Differenzierung von Epithelzellen des Thymus, an deren Ende die Apoptose der betroffenen Zellen steht, von deren IFN β -Sekretion abhängig [Vidalain et al., 2002]. Ob ISG15 im Thymus von Bedeutung ist, scheint bis dato nicht untersucht worden zu sein. Über eine Rolle von LMX1B bei der Immunantwort kann demnach zu diesem Zeitpunkt nur spekuliert werden. In einer laufenden Doktorarbeit (ebenfalls Jürgen Kastner) werden derzeit zur Aufklärung weitere Versuche durchgeführt.

4.7 Mögliche vermittelnde Komponenten des wachstumsinhibierenden Effekts von LMX1B auf HeLa-Zellen

Die im vorherigen Kapitel besprochene Induktion des NF- κ B-Zielgens *IFN β* hat eine verstärkte Expression von Interferon-stimulierten Genen (ISGs) zur Folge. Da viele Produkte dieser Gene proliferationshemmende Eigenschaften besitzen, könnte die Induktion von *IFN β* durch LMX1B eine der möglichen vermittelnden Komponenten von dessen

wachstumsinhibierendem Effekt sein. Zunächst seien jedoch zwei andere im Rahmen der vorliegenden Arbeit gezeigte Charakteristika dieses Effekts zusammengefasst:

1. Wie in Kapitel 4.2 beschrieben ist die LIM2-Domäne sowohl für den wachstumsinhibierenden Effekt als auch die Induktion von NF- κ B-Zielgenen und ISGs von essentieller Bedeutung. Der LDH-Assay zeigte, dass ein LMX1B-Protein, dem die andere proteinbindende Domäne - die LIM1-Domäne - fehlt, noch dazu fähig ist, das Wachstum der HtTA-1-Zellen zu inhibieren (siehe Abbildung 2). Ein unspezifischer Überexpressionseffekt kann ausgeschlossen werden, da mit Mutanten der LIM2-Domäne keine Wachstumsinhibition mehr erreicht werden konnte [Kastner, 2004; Prestel, 2003]. Die LIM1-Domäne scheint demnach für den negativen Effekt, den LMX1B auf das Wachstum von HeLa-Zellen ausübt, verzichtbar zu sein. Dies steht im Einklang mit zwei von Johnson et al. gemachten Beobachtungen. Im Hefe-Zwei-Hybrid-System war die Affinität eines statt jeweils einer LIM1- und LIM2-Domäne zwei LIM2-Domänen („2xLIM2“) enthaltenden Lmx1.1-Proteins zu E47/Pan-1 viermal höher als die des Wildtyp-Proteins, während eine zwei LIM1-Domänen („2xLIM1“) enthaltende Form gar keine Bindung zeigte. In gleicher Weise erhöhte das 2xLIM2-Konstrukt die Synergie zwischen Lmx1.1 und E47/Pan-1 bei der Aktivierung eines an einen Insulin-Minienhancer gekoppelten Reportergens in BHK-21-Zellen. Mit dem 2xLIM1-Konstrukt konnte keinerlei Synergie mehr festgestellt werden. Für das Protein Ajuba aus der Zyxin-Familie der LIM-Proteine ist bereits gezeigt worden, dass LIM-Domänen für einen wachstumshemmenden Effekt verantwortlich sein können [Kanungo et al., 2000]. Durch stabile Transfektion einzelner LIM-Domänen konnten Kanungo et al. den wachstumsinhibierenden Effekt den ersten beiden LIM-Domänen, die Stimulation der Differenzierung der dritten LIM-Domäne zuordnen. Beide Beispiele bestätigen, dass die verschiedenen LIM-Domänen, wie hier bei LMX1B beobachtet, von unterschiedlicher Bedeutung für die Funktion des betreffenden Proteins sein können.

2. Eine FACS-Analyse des Zellzyklus zeigte bei LMX1B-synthetisierenden HtTA-1-Zellen eine Verschiebung des Zyklus in Richtung der G₀/G₁-Phase auf Kosten der S-, G₂- und M-Phase [Prestel, 2003]. Mit einer zweiten Methode, der Inkorporation von Bromodesoxyuridin (BrdU) während der S-Phase und dessen immunzytochemischem Nachweis, konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit diese Ergebnisse nun bestätigt werden (siehe Tabelle 16). Unter den LMX1B-synthetisierenden Zellen befand sich eine deutlich geringere Zahl in der S-Phase als bei den Kontrollzellen (siehe Abbildung 5). Durch

eine vorangehende Synchronisierung der Zellen könnten die Unterschiede zwischen den verschiedenen Proben wahrscheinlich noch verstärkt sichtbar werden. Da Apoptose und damit eine höhere Absterberate der Zellen definitiv ausgeschlossen werden konnten [Kastner, 2004], scheint eine geringere Zellteilungsrate die alleinige Ursache für das verringerte Wachstum der LMX1B-produzierenden Zellen zu sein. Diese drückt sich in einem erhöhten Anteil von Zellen in den Lückenphasen G_0 und G_1 des Zellzyklus aus. LMX1B wird in der menschlichen Niere ausschließlich von den Podozyten produziert. Diese sind nach ihrer endgültigen Differenzierung nicht mehr in der Lage sich zu teilen, können aber erneut in den Zellzyklus eintreten [Ly et al., 2004]. Folgt der verstärkten Proteinsynthese zu Beginn des Zyklus keine DNA-Synthese und Zellteilung, da die Zelle als Konsequenz einer Erhöhung von p21 und p27 den Zyklus am G_1/S -Kontrollpunkt stoppt, entsteht Hypertrophie [Pavenstädt et al., 2003]. Diese Vergrößerung des Zellvolumens ist eine häufige Reaktion von Podozyten auf eine Schädigung, wie z.B. bei diabetischer Nephropathie und fokal-segmentaler Glomerulosklerose (FSGS) beobachtet wurde [Shankland, 2006]. Dahinter könnte sich ein Mechanismus verbergen, der es den zur Proliferation weitestgehend unfähigen Zellen erlaubt, entblößte Bereiche der glomerulären Basalmembran wieder zu bedecken. Interessanterweise besitzen LMX1B-synthetisierende HeLa-Zellen nach eigenen Beobachtungen in der Mehrzahl ein größeres Zellvolumen (Daten nicht gezeigt). Eine Erklärung hierfür könnte eine erhöhte Expression von *p21* in den *LMX1B*-überexprimierenden Zellen (siehe unten) sein. Sollte an dieser Stelle weitergeforscht werden, wäre neben einer genauen Dokumentation und statistischen Betrachtung der Zelldimensionen auch eine Analyse der Expression von *p27* notwendig.

Neben den bekannten zellzyklusregulatorischen Proteinen wie den CKIs, zu denen p21 und p27 gehören, können unter anderem auch die Produkte der Gruppe klassischer Interferon-stimulierter Gene (ISGs) das Wachstum von Zellen hemmen. Wie eine Genexpressionsanalyse zeigte, werden von diesen ISGs auch einige in LMX1B-synthetisierenden, langsamer wachsenden HeLa-Zellen verstärkt exprimiert (siehe Tabelle 17). Dies sind *GIP3*, *ISG15*, *IFIT1*, *IFI44*, *IFITM1*, *IFITM3*, *IFI16* und *IFITM2*. Mittels einer RT-qPCR-Analyse der Expression von *GIP3*, *ISG15*, *IFIT1* und *IFI16* konnten diese Befunde nun bestätigt werden (siehe Abbildung 11). Durch eine kürzere Kulturdauer wurde dabei die Wahrscheinlichkeit ungewollter sekundärer Ereignisse vermindert. Außerdem konnte durch die Verwendung eines anderen Zellklons ein klonaler Effekt ausgeschlossen werden. Wie der Einsatz des Antikörpers, der die biologische Aktivität IFN β s

neutralisiert, am Beispiel von *GIP3* (siehe Abbildung 23) und *ISG15* (Daten nicht gezeigt) bewiesen, ist die Induktion dieser Gene auch in den LMX1B-produzierenden HeLa-Zellen eine Folge verstärkter IFN β -Sekretion.

Die wenigen bekannten Fakten über ISGs belegen ihre proliferationshemmende Wirkung. So wurde z.B. eine erhöhte Expression von *GIP3* in alternden menschlichen Fibroblasten, die wie adulte Podozyten nicht mehr proliferieren, beschrieben [Tahara et al., 2005]. Überexpression von *IFIT1* in HT 1080-Zellen aus einem humanen Fibrosarkom führte zu einer Reduktion von deren Wachstumsrate [Guo et al., 2000], und *IFITM1* wurde in vielen Zelltypen als Teil eines an der Transduktion wachstumshemmender Signale beteiligten Membrankomplexes aus mehreren Proteinen beschrieben [Bradbury et al., 1992]. Die Entwicklung von Gehirntumoren geht mit einer verminderten Transkription von *IFITM3* einher [Huang et al., 2000], und *IFI16* beeinflusst durch Bindung an p53 z.B. die Expression von *p21*. Von *ISG15* sind bisher keine direkten antiproliferativen Wirkungen bekannt. Es besitzt zwei Ubiquitin-Homologie-Domänen und wird z.B. nach Inkubation von Zellen mit Interferon an verschiedenste Proteine angehängt [Loeb und Haas, 1992]. Diese Modifizierung scheint die betreffenden Proteine jedoch nicht für die Degradierung durch Proteasomen zu markieren [Malakhov et al., 2003]. Unter den wenigen identifizierten Zielproteinen von *ISG15* befinden sich auch andere Interferon-induzierbare Proteine, darunter STAT1, JAK1 [Malakhov et al., 2003] und IRF-3. Diese drei werden für die durch ein Interferon-Signal ausgelöste Induktion der anderen ISGs benötigt. Die sog. ISGylierung von IRF-3 scheint in virusinfizierten Zellen dessen Degradierung zu verhindern und so durch einen Rückkopplungsmechanismus die Abwehr der Zelle zu verstärken [Lu et al., 2006]. Es ist also möglich, dass die erhöhte Expression von *ISG15* durch Stabilisierung der Signaltransduktion die Expression von *GIP3*, *IFI16* etc. unterstützt und auf diese Weise seinen Teil zur Wachstumsinhibition beiträgt.

Um zu überprüfen, ob der wachstumshemmende Effekt LMX1Bs in HeLa-Zellen wirklich von der verstärkten Sekretion von IFN β und darauf folgenden Induktion der ISGs abhängt, wird im Rahmen einer laufenden Doktorarbeit [Jürgen Kastner] der die Bioaktivität von IFN β neutralisierende Antikörper verwendet. Es soll das Wachstum von in An- und Abwesenheit des Antikörpers gewachsenen LMX1B-produzierenden HeLa-Zellen im LDH-Assay verglichen werden. Sollte der wachstumshemmende Effekt von LMX1B wie postuliert maßgeblich durch verstärkte Expression des Gens für IFN β und der ISGs vermittelt werden,

wäre eine Verminderung dieses Effekts und damit ein wieder beschleunigtes Wachstum zu erwarten.

Auch die oben bereits angedeutete Erhöhung der Expression von p21 in den LMX1B-synthetisierenden HeLa-Zellen könnte für den wachstumsinhibierenden Effekt verantwortlich gemacht werden. Sie war erstmals in einem cDNA-Array festgestellt worden [Prestel, 2003; siehe auch Tabelle 17] und konnte nun im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe der RT-qPCR bestätigt werden (siehe Abbildung 11). Der Cdk-Inhibitor p21 übt durch Inhibition von Cdks in der G₁-Phase [Harper et al., 1995] und Inhibition der DNA-Replikation durch Interaktion mit PCNA [Waga et al., 1994], aber auch in der G₀- [Pavenstädt et al., 2003] oder G₂-Phase [Dulic et al., 1998; Niculescu et al., 1998] eine verzögernde Wirkung auf den Zellzyklus aus. Die Funktionen von p21 im Zellzyklus speziell von Podozyten sind noch nicht vollständig verstanden. Es gibt Hinweise darauf, dass p21 bei glomerulären Erkrankungen mit proliferierenden Podozyten eine schützende Funktion zur Begrenzung weiterer Proliferation ausübt, wenn die p27- und p57-Level sinken [Kim et al., 1999]. Es könnte aber auch als eine Art „Gerüst“ für die Bildung von Komplexen aus Cyclinen, Cdks und PCNA dienen, die die Proliferation unterstützen [Shankland, 2000]. Die Regulation der *p21*-Expression kann sowohl auf transkriptioneller als auch auf posttranskriptioneller Ebene erfolgen. Auf beiden Ebenen spielt das Tumorsuppressor-Protein p53 eine wichtige Rolle. Es existieren jedoch auch p53-unabhängige Mechanismen der transkriptionellen Regulation. So resultierte interessanterweise die Überexpression des für einen Homöobox-Transkriptionsfaktor kodierenden Gens *Gax* in Fibroblasten und VSM-Zellen zu einem durch *p21*-Hochregulierung hervorgerufenen Wachstumsstillstand [Smith et al., 1997]. c-Myc, ein Transkriptionsfaktor und Protoonkogen, kann die Expression von *p21* inhibieren [Mitchell und El-Deiry, 1999; McNeil und Musgrove, 2006], indem es an einen oder mehrere andere bisher noch nicht genau identifizierte Transkriptionsfaktoren am *p21*-Promotor bindet [Gartel und Radhakrishnan, 2005]. Die Expression von c-Myc war in den LMX1B-produzierenden HeLa-Zellen gegenüber den Zellen mit ausgeschalteter LMX1B-Produktion erniedrigt (siehe Abbildung 11). Dass verminderte c-Myc-Level direkte Effekte auf p21-mRNA-Level haben können, wurde an verschiedenen Modellen gezeigt. Immer wurde die *p21*-Transkription erhöht und dadurch das Wachstum der verwendeten Zellen (darunter auch HeLa-Zellen) negativ beeinflusst [McConnell et al., 2003; Koshiji et al., 2004; Li und Wu, 2004]. Demnach könnte auch in den LMX1B-synthetisierenden Zellen die verminderte *c-Myc*-Expression Ursache für die erhöhte *p21*-Transkription sein.

Typ I-Interferon steigert bei einer Vielzahl von Zelllinien die *p21*-Transkription und löst damit einen Stillstand des Zellzyklus aus [Sangfelt et al., 1997; Subramaniam und Johnson, 1997; Giandomenico et al., 1998]. Ausserdem beeinflusst es die Expression des *c-Myc*-Gens über Veränderungen in der posttranskriptionellen Prozessierung der mRNA negativ [Einat et al., 1985]. An der Inhibition von *c-Myc* scheint auch STAT1 beteiligt zu sein. So spielt phosphoryliertes Stat1 eine Schlüsselrolle bei der zum Zellzyklusarrest führenden Inhibierung des Gens durch *All-trans*-Retinolsäure [Dimberg et al., 2003]. Interleukin-6 wiederum kann ebenfalls die *p21*-Expression stimulieren. In einer menschlichen Osteoblasten-Zelllinie konnte nach Stimulation mit IL-6 eine Aktivierung des *p21*-Promotors durch Bindung von STAT1 und STAT3 an eine STAT-Bindungsstelle gezeigt werden [Bellido et al., 1998]. Dass die Induktion der drei NF- κ B-Zielgene *IFN β* , *STAT1* und *IL-6* auch in den LMX1B-synthetisierenden HeLa-Zellen für die Inhibition von *c-Myc* und die Induktion von *p21* verantwortlich sein könnte, ist jedoch aus den folgenden Gründen eher unwahrscheinlich: 1. Sowohl die Hemmung der *c-Myc*-Expression als auch die Induktion der *p21*-Expression tritt vor der erhöhten Expression von *IFN β* , *IL-6* oder *STAT1* auf. Die erhöhte bzw. verminderte mRNA-Menge von *c-Myc* und *p21* konnte bereits bei zwei Tage lang induzierten Zellen detektiert werden und folgt damit unmittelbar der Expression von *LMX1B* (siehe Abbildung 11). Die erhöhte mRNA-Menge der drei letztgenannten wurde dagegen erst bei vier Tage lang induzierten Zellen gemessen (siehe Abbildung 14, Abbildung 16 und Abbildung 20) und folgt damit der *LMX1B*-Expression verzögert. 2. Die Inhibition von *c-Myc* und die Induktion von *p21* konnten durch Inkubation der Zellen mit dem Antikörper, der die biologische Aktivität von *IFN β* neutralisiert, nicht gehemmt werden (Anne Rasclé, persönliche Mitteilung). Dies schließt zumindest *IFN β* als Verursacher aus. Alternativ könnte es möglich sein, dass *LMX1B* selbst die Expression von *c-Myc* direkt inhibiert, was dann zu erhöhter *p21*-Expression führt. Vielleicht induziert *LMX1B* aber auch zusätzlich die *p21*-Expression direkt. Zur Klärung wäre sicherlich die Untersuchung von in geringeren Zeitabständen gewonnenen Proben hilfreich. Auch eine Chromatin-Immunpräzipitation könnte hier Aufschluss geben.

Abbildung 42 zeigt die oben diskutierten Möglichkeiten für den in LMX1B-synthetisierenden HeLa-Zellen zur Wachstumsinhibition führenden Signalweg.

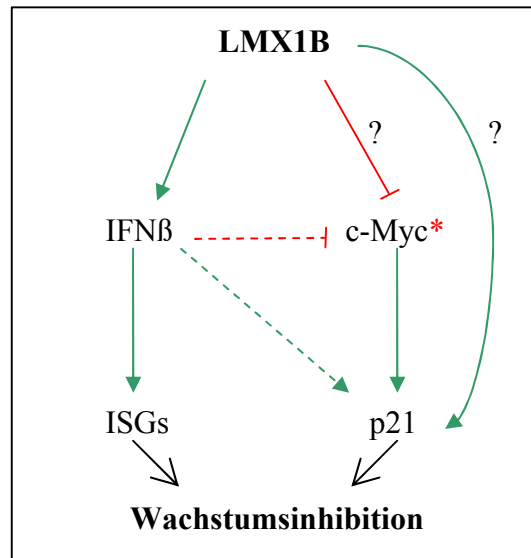


Abbildung 42: Mögliche Vermittler der durch LMX1B in HeLa-Zellen ausgelösten Wachstumsinhibition. LMX1B induziert NF- κ B-Zielgene, darunter auch *IFN β* . Die verstärkte Sekretion des IFN β -Proteins führt zu einer Induktion von ISGs, deren Produkte wiederum das Wachstum von Zellen hemmen können. Ebenso inhibiert eine durch Verminderung der c-Myc-Level gesteuerte Erhöhung der p21-Konzentration das Zellwachstum. An welcher Stelle LMX1B hier eingreifen könnte, bleibt zu klären. Durch IFN β (wie auch durch STAT1 und IL-6, nicht dargestellt) könnten *c-Myc* bzw. *p21* ebenfalls beeinflusst werden. Dies ist im Fall der LMX1B-produzierenden HeLa-Zellen jedoch eher unwahrscheinlich. (* verminderte Konzentration)

4.8 LMX1B ist kein Tumorsuppressor in Urothelzellen

In einer Kooperation mit Dr. Robert Stöhr vom Lehrstuhl für Urologie der Medizinischen Fakultät an der Universität Regensburg wurde untersucht, ob LMX1B in Urothelzellen der menschlichen Blase die Rolle eines Tumorsuppressorgens spielen könnte. Die Tatsache, dass das *LMX1B*-Gen sich auf Chromosom 9q34 befindet und Deletionen in genau diesem Locus oftmals bei Urothelzell-Karzinomen beobachtet werden [Amira et al., 2004], führten zusammen mit dem wachstumsinhibierenden Effekt von LMX1B auf HeLa-Zellen zu dieser Theorie.

Es wurden eine Zelllinie aus gesundem Urothel sowie drei Zelllinien aus Karzinomen mit unterschiedlichem Differenzierungsgrad untersucht. Mit Hilfe der RT-qPCR ließ sich zunächst feststellen, dass *LMX1B* auch vom Urothel der menschlichen Harnblase exprimiert wird (siehe Abbildung 32). Beim Vergleich der verschiedenen Zelllinien ergaben sich zwar

größere Unterschiede in der relativen LMX1B-mRNA-Menge, jedoch keine direkte Korrelation zwischen dieser Menge und dem Tumorgrad.

Die Fähigkeit von LMX1B, die Expression von für die Regulation des Zellwachstums wichtigen Genen zu kontrollieren, kann auch durch die Verfügbarkeit von Kofaktoren, die hemmend oder aktivierend mit LMX1B in Wechselwirkung treten, beeinflusst werden. Aus diesem Grund wurde die Expression von *LDB1* und *RLIM* untersucht. *LDB1* kann sowohl hemmend [Dreyer et al., 2000] als auch aktivierend [Hobert und Westphal, 2000] auf LMX1B wirken. Es wurde interessanterweise ebenfalls als Teil eines Komplexes mit dem Tumorsuppressorprotein LKB1 beschrieben [Setogawa et al., 2006]. *RLIM* wurden bisher ausschließlich negativ regulierende Eigenschaften zugeschrieben [Bach et al., 1999]. Die RT-qPCR-Analyse zeigte bei allen drei Tumorzelllinien eine Verminderung der *LDB1*-mRNA-Menge gegenüber den UROtsa-Zellen (siehe Abbildung 33). Zwischen den Tumorzelllinien bestanden dabei keine signifikanten Unterschiede. Setzt man voraus, dass dieses Verhältnis auch bei den Proteinmengen wieder zu finden ist, könnte eine verminderte Menge des Kofaktors *LDB1* die Aktivität von LMX1B in den Karzinomzellen negativ beeinflussen. Während bei den hoch differenzierten Tumorzellen für *RLIM* eine verminderte mRNA-Menge detektiert wurde, war diese in den beiden anderen Tumorzelllinien erhöht (siehe ebenfalls Abbildung 33). Im Hinblick auf die oben beschriebene Theorie macht eine erhöhte *RLIM*-Expression in den invasiven Tumorzellen Sinn. In Zellen, die außer LMX1B auch verstärkt dessen Korepressor *RLIM* produzieren, sollte sich ebenfalls die Expression von LMX1B-Zielgenen ändern. Vorstellbar wäre z.B., dass eine Gruppe von Genen durch LMX1B alleine aktiviert, in Zusammenarbeit mit *RLIM* jedoch gehemmt wird.

Im nächsten Schritt wurde die Expression der in LMX1B-produzierenden HeLa-Zellen induzierten Gene *IFN β* , *ISG15* und *IRF-7* untersucht. Dabei wurden lediglich die gesunden Urothelzellen und die Zellen aus dem invasiven Tumor verglichen. Die Expression von *IFN β* war in den Tumorzellen stark erhöht. Auch eine leicht erhöhte *ISG15*- und *IRF-7*-mRNA-Menge konnte detektiert werden. Von der erhöhten *ISG15*- und *IRF7*-Expression ist anzunehmen, dass sie eine Folge von gesteigerter Interferon- β -Synthese ist. An der vorangehend erhöhten *IFN β* -Expression wiederum könnte LMX1B wie in den HeLa-Zellen ursächlich beteiligt sein (siehe Kapitel 4.3). Dieses Ergebnis könnte als Hinweis auf die Beteiligung von LMX1B bei der Tumorbildung interpretiert werden, widerspricht aber der nach Analyse von *RLIM* und *LDB1* vermuteten verminderten Aktivität von LMX1B in den

invasiven Tumorzellen. An dieser Stelle sei jedoch an die *Isg15*-Expression bei den *Lmx1b*-Knockout-Mäusen erinnert. Diese war in den Nieren und im Thymus der *Lmx1b*^(-/-)-Mäuse, also bei ausgeschalteter *Lmx1b*-Funktion, erhöht. Mittlerweile ist anerkannt, dass Interferon- β auch auf Tumorzellen einen wachstumshemmenden Effekt ausübt. So werden Interferone vom Typ I erfolgreich als Therapeutikum bei verschiedenen Arten von Tumoren eingesetzt [Pokrovskaja et al., 2005]. Vergleichbar mit anderen Krebsmedikamenten scheint hier Apoptose einer der Hauptmechanismen zu sein. Im Gegensatz zur antiviralen Aktivität von IFN α/β scheint die gegen Tumorwachstum gerichtete proapoptotische aber nicht über den JAK/STAT-Signaltransduktionsweg, sondern über PI3K- und MAPK-Signalwege vermittelt zu werden [Pokrovskaja et al., 2005]. Auf Basis dieser Hintergrundinformationen betrachtet lässt sich die erhöhte *IFN β* -Expression in den Zellen aus dem malignen Urothelkarzinom nicht erklären. Es wäre zu erwarten, dass die Produktion von IFN β in diesen Zellen vermindert und nicht, wie die RT-qPCR-Ergebnisse vermuten lassen, erhöht ist.

Die zu Beginn der Untersuchungen gestellte Frage, ob *LMX1B* ein Tumorsuppressorgen sein könnte, das bei der Entwicklung von Karzinomen des Urothels aus der menschlichen Blase eine entscheidende Rolle spielt, kann mit den vorliegenden Ergebnissen wahrscheinlich verneint werden. Sie lieferten keine stimmigen Hinweise auf eine Beteiligung *LMX1B*s an der Tumorentstehung oder der Ausprägung des Tumorgrades. Die RT-qPCR-Analyse der Expression von Kofaktoren zeigte zwar Tendenzen, die auf eine verminderte Aktivität von *LMX1B* hinweisen könnten, in diesem Fall wäre *LMX1B* selbst jedoch kein Tumorsuppressorgen.

4.9 Schlussfolgerung und Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit ist es gelungen, eine bisher unbekannt Funktion von *LMX1B* bei der Regulation von NF- κ B-Zielgenen aufzudecken. So wird eine Reihe dieser Gene, darunter die Gene für Interferon- β und Interleukin-6, in *LMX1B*-synthetisierenden HeLa-Zellen verstärkt exprimiert. Für den zugrunde liegenden Mechanismus sind die indirekte Aktivierung von NF- κ B durch transkriptionelle Aktivierung eines positiven NF- κ B-Regulators, die positive Regulierung der Aktivität NF- κ Bs im Zellkern oder die direkte Aktivierung der NF- κ B-Zielgene durch Bindung von *LMX1B* an deren Promotor denkbar. Im

Rahmen einer hier anknüpfenden Doktorarbeit [Astrid Neumann] gemachte Untersuchungen sprechen für die letztgenannte Möglichkeit. Andere Versuchsergebnisse deuten darauf hin, dass LMX1B für die direkte Aktivierung der Gene nicht an NF- κ B binden und so mit diesem kooperieren kann [Eva Heining, persönliche Mitteilung]. Die Interaktion LMX1Bs mit dem NF- κ B-Repressor RAI könnte eine noch unbekannt Rolle in diesem System der Genregulation spielen. Die erhöhte Expression des *IFN β* -Gens hat eine erhöhte Synthese des Zytokins in den HeLa-Zellen zur Folge. Diese wiederum induziert über den JAK/STAT-Signalweg die Expression diverser Interferon-induzierter Gene (ISGs) wie *GIP3* und *ISG15*.

Auch *in vivo*, genauer gesagt in der Maus, beeinflusst *Lmx1b* die Expression von NF- κ B-Zielgenen und ISGs. Wie Untersuchungen an den Nieren neugeborener Wildtyp- und *Lmx1b*-Knockout-Mäuse zeigten, wird diese hier jedoch gehemmt und nicht wie in den HeLa-Zellen stimuliert. Ausgehend vom Modell der direkten Aktivierung der NF- κ B-Zielgene durch LMX1B müsste in der Maus ein zusätzlicher Korepressor existieren, der in den HeLa-Zellen fehlt bzw. von einem Koaktivator verdrängt wird. Da bei adulten Tieren kein Unterschied in der ISG-Expression zwischen *Lmx1b*^(+/-)- und Wildtyp-Tier festgestellt werden konnte, ist anzunehmen, dass diese Aktivität von *Lmx1b* während der embryonalen Entwicklung, nicht aber im ausgereiften Zustand der Niere von Bedeutung ist. Die ebenfalls im Thymus von *Lmx1b*-Knockout-Mäusen nachgewiesene Erhöhung der *Isg15*-Expression könnte auf eine Rolle der durch *Lmx1b* ausgelösten Induktion von NF- κ B-Zielgenen und ISGs bei der murinen Immunreaktion schließen lassen.

Die Produkte der ISGs könnten für den wachstumsinhibierenden Effekt verantwortlich sein, den LMX1B auf HeLa-Zellen ausübt, und dem eine Verzögerung des Zellzyklus zugrunde liegt. Den meisten der in den LMX1B-produzierenden Zellen induzierten ISGs wird ein solcher Effekt zugeschrieben. Eine zweite vermittelnde Komponente der Wachstumsinhibition könnte *p21* sein, dessen Expression in den betreffenden Zellen ebenfalls erhöht ist. Dies lässt sich wahrscheinlich auf die ebenso festgestellte verminderte Expression von *c-Myc* zurückführen. Letztere wird vermutlicht nicht durch die Induktion der NF- κ B-Zielgene IFN β , IL-6 und STAT1 sondern auf einem anderen Weg, möglicherweise durch LMX1B selbst, ausgelöst. In jedem Fall ist die Bindung eines weiteren Proteins an LMX1B sowohl für die Induktion von ISGs und NF- κ B-Zielgenen als auch für die Wachstumsinhibition erforderlich, da die proteinbindende LIM2-Domäne für beide Effekte

essentiell ist. Die zweite proteinbindende LIM-Domäne (LIM1) scheint jedoch verzichtbar zu sein.

Die hier entdeckte Rolle von LMX1B bei der Regulation von NF- κ B-Zielgenen wie *IFN β* in HeLa-Zellen und in der Maus ist ein wichtiges Puzzlestück seiner Funktion. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind deshalb Basis für weitere Forschung in der Arbeitsgruppe. Die nähere Charakterisierung dieser neuen transkriptionregulatorischen Funktion von LMX1B ist derzeit Gegenstand mehrerer Arbeiten [Anne Rascle, Eva Heining, Jürgen Kastner, Astrid Neumann, Anne-Sarah Raschta]. So wird im Zellkultur-Modell ihr genauer Mechanismus einschließlich möglicher Interaktionspartner wie NF- κ B und RAI untersucht und ihre Bedeutung für den wachstumshemmenden Effekt von LMX1B beleuchtet. Zusammen mit den hieraus bereits gewonnenen Daten wurden die wichtigsten Ergebnisse aus der vorliegenden Arbeit mittlerweile veröffentlicht (Rascle et al., 2009; siehe Kapitel 7 (Veröffentlichungen)). Des Weiteren wird die Relevanz der Regulation von NF- κ B-Zielgenen *in vivo* durch die Verwendung der *Lmx1b*-Knockout-Maus eingehender erforscht. Dabei liegt der Fokus auf der Funktion von *Lmx1b* in der Niere. Langfristiges Ziel sollte selbstverständlich die Übertragbarkeit auf den Menschen, respektive Patienten mit Nagel-Patella-Syndrom sein.

5. Zusammenfassung

LMX1B ist einer der wenigen Transkriptionsfaktoren, für die bisher eine wichtige Rolle in Podozyten nachgewiesen werden konnte. Podozyten sind eine unverzichtbare Komponente der glomerulären Filtrationsbarriere in der menschlichen Niere. So leiden Patienten mit Nagel-Patella-Syndrom - einer autosomal-dominant vererbten Krankheit, bei der das LMX1B-Gen mutiert ist - auch häufig unter einer Nephropathie. Daneben treten u.a. Skelettanomalien und Anomalien der Hornhaut des Auges auf. Hier spiegelt sich die Rolle von LIM-Homöodomäne-Transkriptionsfaktoren wie LMX1B als Regulatoren bei der Zell- und Gewebedifferenzierung wieder.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Funktion von LMX1B in der Zelle näher zu charakterisieren. Dazu wurden zunächst HeLa-Zelllinien, die den Wildtyp und verschiedene Mutanten des LMX1B-Proteins mittels Tet-off-System regulierbar produzieren, eingesetzt. Wie frühere Arbeiten bereits zeigten, übt LMX1B einen wachstumsinhibierenden Effekt auf HeLa-Zellen aus. Nun konnte mittels BrdU-Inkorporation abgesichert werden, dass dieser Effekt nicht auf Apoptose sondern auf eine Verzögerung des Zellzyklus zurückzuführen ist. Außerdem wurde eine frühere Studie, die den beiden proteinbindenden LIM-Domänen eine essentielle Bedeutung bei dieser Funktion LMX1Bs zuwies ohne auf jede einzeln einzugehen, nun weitergeführt. Dabei stellte sich im LDH-Assay mit einer LMX1B-Mutante, der die LIM1-Domäne fehlt, heraus, dass diese Domäne für die Wachstumsinhibition verzichtbar und demnach die LIM2-Domäne für den Effekt ausreichend ist.

Die weiteren Untersuchungen beschäftigten sich mit der transkriptionsregulatorischen Funktion von LMX1B. Dabei konnte, ebenfalls im HeLa-Zellsystem, eine bisher unbekannt Funktion von LMX1B bei der Regulation von NF- κ B-Zielgenen aufgedeckt werden. Wie eine RT-qPCR-Analyse zeigte, induziert LMX1B in diesen Zellen die Expression einer Reihe von NF- κ B-Zielgenen wie *IFN β* , *IL-6*, *IL-1 β* und *IL-8*. Der dieser Induktion zugrunde liegende Mechanismus ist Gegenstand der laufenden Forschung der Arbeitsgruppe. Mögliche Modelle sind die direkte Aktivierung der Gene durch LMX1B oder die zur Induktion der Gene führende Aktivierung des NF- κ B-Komplexes auf Proteinebene. Letztere könnte über transkriptionelle Aktivierung eines positiven Regulators des NF- κ B-Signalwegs im Zytoplasma, verstärkte Acetylierung bzw. verminderte Deacetylierung oder Regulation des

Phosphorylierungszustands NF- κ Bs im Zellkern aber auch über Protein/Protein-Interaktion erfolgen. Für letztere kommen eine direkte Interaktion von LMX1B mit NF- κ B ähnlich der Interaktion des LIM-Proteins nTRIP6 mit NF- κ B oder eine Interaktion mit dem NF- κ B-Repressor RAI in Frage. RAI wurde im Verlauf einer anderen Arbeit im Hefe-Zwei-Hybrid-System als potentieller Interaktionspartner LMX1Bs identifiziert. Im Rahmen mehrerer laufender Doktor- bzw. Diplomarbeiten werden die vorgeschlagenen Modelle nun überprüft.

Wie indirekt durch Verwendung eines neutralisierenden Antikörpers gezeigt werden konnte, führt die durch LMX1B ausgelöste erhöhte IFN β -Expression zu einer ebenfalls erhöhten Synthese des Interferon-beta-Proteins. Diese induziert, wie die RT-qPCR zeigte, über den JAK/STAT-Signalweg die Expression diverser klassischer Interferon-induzierter Gene wie *GIP3* und *ISG15*, aber auch die von Genen für Proteine, die an einer positiven Rückkopplung beteiligt sind. Hierzu gehören STATs, IRFs, PKR und Toll-like-Rezeptoren. Interferon-beta, Interleukin-6 und die Produkte vieler ISGs besitzen wachstumshemmende Eigenschaften, weshalb der wachstumsinhibierende Effekt LMX1Bs in HeLa-Zellen auf deren verstärkte Synthese zurückzuführen sein könnte. Weiterführende Studien weisen jedoch inzwischen darauf hin, dass die ebenfalls durch RT-qPCR-Analyse detektierte Verminderung der *c-Myc*-Expression und Verstärkung der *p21*-Expression hier eine bedeutendere Rolle spielen. Die erhöhte Expression von *p21* könnte dabei durch die verminderte Synthese von c-Myc ausgelöst werden, da c-Myc normalerweise *p21* hemmt.

Bei Podozyten handelt es sich um hochdifferenzierte Zellen, die selbst bei Beschädigung des Glomerulus in der Regel nicht mehr proliferieren. Eine der hauptverantwortlichen molekularen Komponenten dieses Phänomens ist der Cdk-Inhibitor p21. Möglicherweise spielt auch hier die Genregulation und Wachstumshemmung durch LMX1B eine Rolle. Die bei Podozyten als Reaktion auf Beschädigung ihres Epithels häufig entwickelte Hypertrophie, eine Vergrößerung des Zellvolumens nach Eintritt in den Zellzyklus ohne anschließende Zellteilung, konnte auch bei LMX1B-produzierenden HeLa-Zellen beobachtet werden.

Auch *in vivo*, in den Nieren neugeborener Mäuse beeinflusst LMX1B die Expression von Genen des Interferon-beta-Systems. Sein Effekt ist hier jedoch hemmender Natur, wie die Untersuchung von *Lmx1b*-Knockout- und Wildtyp-Tieren zeigte. In der Niere adulter Tiere konnte kein Einfluss von *Lmx1b* festgestellt werden, demnach scheint dieser nur während der embryonalen Entwicklung von Bedeutung zu sein. Eine Rolle von *Lmx1b* bei der murinen

Immunreaktion deutet sich durch die Beobachtung an, dass *Lmx1b* auch im Thymus neugeborener Mäuse die Expression eines ISGs hemmt. Wie sich mittlerweile abzeichnet, scheint die Regulation der NF- κ B-Zielgene für Entwicklung des murinen Auges von größerer Relevanz zu sein als für die der murinen Niere.

In einem anderen *in vivo*-Modell - Zelllinien aus gesundem Urothel der menschlichen Blase und dessen Tumoren – konnten auch deutliche Unterschiede in der Expression von *LMX1B* und Genen für dessen Kofaktoren LDB1 und RLIM sowie für Gene des Interferon-beta-Systems detektiert werden. Jedoch konnte eine anfänglich vermutete Funktion LMX1Bs als Tumorsuppressor in diesem Gewebe ausgeschlossen werden.

Die im Rahmen dieser Arbeit entdeckte Rolle von LMX1B bei der Induktion von NF- κ B-Zielgenen in HeLa-Zellen eröffnet ein weites, spannendes Feld für die weitere Erforschung seiner Funktion. Ergänzt durch Daten, die im Rahmen hier anknüpfender Doktor- und Diplomarbeiten über den genaueren Mechanismus der LMX1B-bedingten Induktion erhalten wurden, wurden die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit inzwischen veröffentlicht. Die Tatsache, dass *Lmx1b* auch *in vivo* im Maus-Modell die Expression von NF- κ B-Zielgenen und Genen des Interferon-beta-Signalwegs beeinflusst, lässt auf eine Relevanz beim Menschen und bei der Erforschung des Nagel-Patella-Syndroms hoffen.

6. Literaturverzeichnis

Abramovich C., Shulman, L.M., Ratovitski, E., Harroch, S., Tovey, M., Eid, P., Revel, M. (1994). **Differential tyrosine phosphorylation of the IFNAR chain of the type I interferon receptor and of an associated surface protein in response to IFN-alpha and IFN-beta.** *EMBO J* 13, 5871-5877

Ackrill A.M., Reid, L.E., Gilbert, C.S., Gewert, D.R., Porter, A.C.G., Lewin, A.R., Stark, G.R., Kerr, I.M. (1991). **Differential response of the human 6-16 and 9-27 genes to a and g interferons.** *Nucleic Acids Res* 19, 591-598

Adachi, H., Igawa, M., Shiina, H., Urakami, S., Shigeno, K., Hino, O. (2003). **Human bladder tumors with 2-hit mutations of tumor suppressor gene TSC1 and decreased expression of p27.** *J Urol* 170, 601-604

Agrawal, S., Agrawal, M.L., Chatterjee-Kishore, M., Stark, G.R., Chisolm, G.M. (2002). **Stat1-dependent, p53-independent expression of p21^{waf1} modulates oxysterol-induced apoptosis.** *Mol Cell Biol* 22, 1981-1992

Agulnick, A.D., Taira, M., Breen, J.J., Tanaka, T., Dawid, I.B., Westphal, H. (1996). **Interactions of the LIM-domain-binding factor Ldb1 with LIM homeodomain proteins.** *Nature* 384 (6606), 270-272

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D. (1995). **Molekularbiologie der Zelle.** VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 3. Auflage

Amira, N., Cancel-Tassin, G., Bernardini, S., Cochand-Priollet, B., Bittard, H., Mangin, P., Fournier, G., Latil, A., Cussenot, O. (2004). **Expression in bladder transitional cell carcinoma by real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction array of 65 genes at the tumor suppressor locus 9q34.1-2: identification of 5 candidates tumor suppressor genes.** *Int J Cancer* 111(4), 539-542

- Anders H.-J., Banas, B., Schlöndorff, D. (2004). **Signaling danger: Toll-like receptors and their potential roles in kidney disease.** *J Am Soc Nephrol* 15, 854-867
- Bach, I., Carrière, C., Ostendorff, H.P., Andersen, B., Rosenfeld, M.G. (1997). **A family of LIM domain-associated cofactors confer transcriptional synergism between LIM and Otx homeodomain proteins.** *Genes Dev* 11, 1370-1380
- Bach, I., Rodriguez-Esteban, C., Carrière, C., Bhushan, A., Krones, A., Rose, D.W., Glass, C.K., Andersen, B., Belmonte, J.C.I., Rosenfeld, M.G. (1999). **RLIM inhibits functional activity of LIM homeodomain transcription factors via recruitment of the histone deacetylase complex.** *Nature Genet* 22, 394-399
- Banerjee-Basu, S., Baxevanis, A.D. (2001). **Molecular evolution of the homeodomain family of transcription factors.** *Nucleic Acids Res* 29, 3258-3269
- Barboux, S., Niaudet, P., Gubler, M.C., Grünfeld, J.P., Jaubert, F., Kuttann, F., Fékété, C.N., Souleyreau-Therville, N., Thibaud, E., Fellous, M., McElreavey, K. (1997). **Donor splice-site mutations in WT1 are responsible for Frasier syndrome.** *Nat Genet* 17, 467-470
- Barisoni, L., Kriz, W., Mundel, P., D'Agati, V. (1999). **The dysregulated podocyte phenotype: a novel concept in the pathogenesis of collapsing idiopathic focal segmental glomerulosclerosis and HIV-associated nephropathy.** *J Am Soc Nephrol* 10, 51-61
- Barker D.F., Hostikka, S.L., Zhou, J., Chow, L.T., Oliphant, A.R., Gerken, S.C., Gregory, MC., Skolnick, M.H., Atkin, C.L., Tryggvason, K. (1990). **Identification of mutations in the COL4A5 collagen gene in Alport syndrome.** *Science* 248, 1224-1227
- Bellido, T., O'Brien, C.A., Roberson, P.K., Manolagas, S.C. (1998). **Transcriptional activation of the p21(WAF1,CIP1,SDI1) gene by interleukin-6 type cytokines. A prerequisite for their pro-differentiating and anti-apoptotic effects on human osteoblastic cells.** *J Biol Chem* 273, 21137-21144
- Ben-Bassat, M., Cohen, L., Rosenfeld, J. (1971). **The glomerular basement membrane in the nail patella syndrome.** *Arch Pathol* 92, 350-355

Berger, L.C., Hawley, R.G. (1997). **Interferon- β interrupts interleukin-6-dependent signaling events in myeloma cells.** *Blood* 89, 261-271

Biron, C.A.(2001). **Interferons α and β as immune regulators – A new look.** *Immunity* 14, 661-664

Bongers, E.M.H.F., Gubler, M.-C., Knoers, N.V.A.M. (2002). **Nail-patella syndrome. Overview on clinical and molecular findings.** *Pediatr Nephrol* 17, 703-712

Bongers, E.M., Huysmans, F.T., Levtchenko, E., de Rooy, J.W., Blickman, J.G., Admiraal, R.J., Huygen, P.L., Cruysberg, J.R., Toolens, P.A., Prins, J.B., Krabbe, P.F., Borm, G.F., Schoots, J., van Bokhoven, H., van Remortele, A.M. Hoefsloot, L.H., van Kampen, A., Knoers, N.V. (2005). **Genotype-phenotype studies in nail-patella syndrome show that LMX1B mutation location is involved in the risk of developing nephropathy.** *Eur J Hum Genet* 13, 935-946

Bonizzi, G., Karin, M. (2004). **The two NF- κ B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity.** *Trends Immunol* 25, 280-288

Boone, D.L., Lee, E.G., Libby, S., Gibson, P.J., Chien, M., Chan, F., Madonia, M., Burkett, P.R., Ma, A. (2002). **Recent advances in understanding NF- κ B regulation.** *Inflamm Bowel Dis* 8, 201-212

Boute, N., Gribouval, O., Roselli, S., Benessy, F., Lee, H., Fuchshuber, A., Dahan, K., Gubler, M.C., Niaudet, P., Antignac, C. (2000). **NPHS2, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome.** *Nat Genet* 24, 349-354

Bradbury, L.E., Kansas, G.S., Levy, S., Evans, R.L, Tedder, T.F. (1992). **The CD19/CD21 signal transducing complex of human B lymphocytes includes the target of antiproliferative antibody-1 and Leu-13 molecules.** *J Immunol* 149, 2841-2850

Brem, R., Oroszlan-Szovik, K., Foser, S., Bohrmann, B., Certa, U. (2003). **Inhibition of proliferation by 1-8U in interferon- α -responsive and non-responsive cell lines.** *Cell Mol Life Sci* 60, 1235-1248

Bustin, S.A. (2000). **Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays.** *J Mol Endocrinol* 25, 169-193

Carey, M. (1998). **The enhanceosome and transcriptional synergy.** *Cell* 92, 5-8

Cedzich, A. (2000). **Charakterisierung des polyzystischen Nierenproteins PKD2 und seiner L703-Deletionsmutante in permanenten Zelllinien.** Biologische Dissertation, Universität Heidelberg

Chen, H., Lun, Y., Ovchinnikov, D., Kokubo, H., Oberg, K.C., Pepicelli, C.V., Gan, L., Lee, B., Johnson, R.L. (1998). **Limb and kidney defects in Lmx1b mutant mice suggest an involvement of LMX1B in human nail patella syndrome.** *Nat Genet* 19, 51-55

Chen, L.-F., Greene, W.C. (2003). **Regulation of distinct biological activities of the NF-kappa B transcription factor complex by acetylation.** *J Mol Med* 81, 549-557

Chen, L.-F., Greene, W.C. (2004). **Shaping the nuclear action of NF-kB.** *Nature Rev Mol Cell Biol* 5, 392-401

Clough, M.V., Hamlington, J.D., McIntosh, I. (1999). **Restricted distribution of loss-of-function mutations within the LMX1B genes of nail patella syndrome patients.** *Hum Mutat* 14, 459-465

Cozzi, A., Corsi, B., Levi, S., Santambrogio, P., Albertini, A., Arosio, P. (2000). **Overexpression of wild type and mutated human ferritin H-chain in HeLa-cells.** *J Biol Chem* 275, 25122-25129

Curtiss, J., Heilig, J.S. (1998). **DeLIMiting development.** *Bioessays* 20, 58-69

- Cygan, J., Johnson, R., McMahon, A. (1997). **Novel regulatory interactions revealed by studies of murine limb pattern in Wnt-7a and En-1 mutants.** *Development* 124, 5021-5032
- Dawid, I.B., Toyama, R., Taira, M. (1995). **LIM domain proteins.** *C R Acad Sci III* 318, 295-306
- Dawson, M.J., Trapani, J.A. (1995). **IFI 16 gene encodes a nuclear protein whose expression is induced by interferons in human myeloid leukaemia cell lines.** *J Cell Biochem* 57, 39-51
- D’Cunha, J., Ramanujam, S., Wagner, R.J., Witt, P.L., Knight, E. Jr., Borden, E.C. (1996). **In vitro and in vivo secretion of human ISG15, an IFN-induced immunomodulatory cytokine.** *J Immunol* 157, 4100-4108
- DeGregori, J. (2004). **The Rb network.** *J Cell Science* 117, 3411-3413
- Delhalle, S., Blasius, R., Dicato, M., Diederich, M. (2004). **A beginner’s guide to NF-kB signaling pathways.** *Ann NY Acad Sci* 1030, 1-13
- del Pozo, E., Lapp, H. (1970). **Ultrastructure of the kidney in the nephropathy of the nail patella syndrome.** *Am J Clin Pathol* 54, 845-851
- Der, S.D., Zhou, A., Williams, B.R.G., Silverman, R.H. (1998). **Identification of genes differentially regulated by interferon a, b, or g using oligonucleotide array.** *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 15623-15628
- Desjardins, M., Bendayan, M. (1991). **Ontogenesis of glomerular basement membrane: Structural and functional properties.** *J Cell Biol* 113, 689-700
- de Veer, M.J., Holko, M., Frevel, M., Walker, E., Der, S., Paranjape, J.M., Silverman, R.H., Williams, B.R.G. (2001). **Functional classification of interferon-stimulated genes identified using microarrays.** *J Leukocyte Biol* 69, 912-920

- Dimberg, A., Karlberg, I., Nilsson, K., Öberg, F. (2003). **Ser727/Tyr701-phosphorylated Stat1 is required for the regulation of c-Myc, cyclins, and p27Kip1 associated with ATRA-induced G0/G1 arrest of U-937 cells.** *Blood* 102, 254-261
- Donzé, O., Deng, J., Curran, J., Sladek, R., Picard, D., Sonenberg, N. (2004). **The protein kinase PKR: a molecular clock that sequentially activates survival and death programs.** *EMBO J* 23, 564-571
- Donzé, O., Jagus, R., Koromilas, A.E., Hershey, J.W., Sonenberg, N. (1995). **Abrogation of translation initiation factor eIF-2 phosphorylation causes malignant transformation of NIH 3T3 cells.** *EMBO J* 14, 3828-3834
- Dotto, G.P. (2000). **p21/WAF1/Cip1): more than a break to the cell cycle?** *Biochim Biophys Acta* 1471, M43-M56
- Dreyer, S.D., Morello, R., German, M.S., Zabel, B., Winterpacht, A., Lustrum, G.P., Horton, W.A., Ober, K.C., Lee, B. (2000). **LMX1B transactivation and expression in nail-patella-syndrome.** *Hum Mol Genet* 9, 1067-1074
- Dreyer, S.D., Zhou, G., Baldini, A., Winterpacht, A., Zabel, B., Cole, W., Johnson, R.L., Lee, B. (1998). **Mutations in LMX1B cause abnormal skeletal patterning and renal dysplasia in nail patella syndrome.** *Nat Genet* 19, 47-50
- Dulic, V., Stein, G.H., Far, D.F., Reed, S.I. (1998). **Nuclear accumulation of p21Cip1 at the onset of mitosis: a role at the G2/M-phase transition.** *Mol Cell Biol* 18, 546-557
- Dunne, A., O'Neill, L.A. (2003). **The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal transduction during inflammation and host defense.** *Sci STKE* RE3
- Dunston, J.A., Hamlington, J.D., Zaveri, J., Sweeney, E., Sibbring, J., Tran, C., Malbroux, M., O'Neill, J.P., Mountford, R., McIntosh, I. (2004). **The human LMX1B gene: transcription unit, promoter, and pathogenic mutations.** *Genomics* 84, 565-576

Dunston, J.A., Reimschisel, T., Ding, Y.-Q., Sweeney, E., Johnson, R.L., Chen, Z.-F., McIntosh, I. (2005). **A neurological phenotype in nail-patella syndrome (NPS) patients illuminated by studies of murine Lmx1b expression.** *Eur J Hum Genet* 13, 330-335

Einat, M., Resnitzky, D., Kimchi, A. (1985). **Close link between reduction of c-myc expression by interferon and G0/G1 arrest.** *Nature* 313, 597-600

Einhorn, S., Strander, H. (1993). **Interferon treatment of human malignancies - a short review.** *Med Oncol Tumor Pharmacother* 10, 25-29

Eremina, V., Quaggin, S.E. (2004). **The role of VEGF-A in glomerular development and function.** *Curr Opin Nephrol Hypertens* 13, 9-15

Evan, G.I., Lewis, G.K., Ramsay, G., Bishop, J.M. (1985). **Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc proto-oncogene product.** *Mol Cell Biol* 5, 3610-3616

Evans, S.S., Collea, R.P., Leasure, J.A., Lee, D.B. (1993). **IFN- α induces homotypic adhesion and Leu-13 expression in human B lymphoid cells.** *J Immunol* 150, 736-747

Eyaid, W.M., Clough, M.V., Root, H., Scott, K.M., McCormick, M.K., Zhang, X., Lisitsyn, N.A., Kearns, W.G., Francomano, C.A., Richards, J.E., McIntosh, I. (1998). **Physical mapping of the nail patella syndrome interval at 9q34: ordering of STS and ESTs.** *Hum Genet* 103, 525-526

Feuerstein, R., Wang, X., Song, D., Cook, N.E., Liebhaber, S.A. (1994). **The LIM/double zinc-finger motif functions as a protein dimerization domain.** *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 10655-10659

Fichtner-Feigl, S., Fuss, I.J., Preiss, J.C., Strober, W., Kitani, A. (2005). **Treatment of murine Th1- and Th2-mediated inflammatory bowel disease with NF- κ B decoy oligonucleotides.** *J Clin Invest* 115, 3057-3071

Fong, E.E. (1946). **"Iliac horns" (symmetrical bilateral central posterior iliac processes): a case report.** *Radiology* 47, 517-518

Friend, S.H., Bernards, R., Rogelj, S., Weinberg, R.A., Rapaport, J.M., Albert, D.M., Dryla, T.P. (1986). **A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma.** *Nature* 323, 643-646

Freyd, G., Kim, S.K., Horvitz, H.R. (1990). **Novel cystein-rich motif and homeodomain in the product of the *Caenorhabditis elegans* cell-lineage gene *lin-11*.** *Nature* 344, 876-879

Fu, X.Y., Kessler, D.S., Veals, S.A., Levy, D.E., Darnell Jr., J.E. (1990). **ISGF3, the transcriptional activator induced by interferon alpha, consists of multiple interacting polypeptide chains.** *Proc Natl Acad Sci USA* 87, 8555-8559

Fujiuchi, N., Aglipay, J.A., Ohtsuka, T., Maehara, N., Sahin, F., Su, G.H., Lee, S.W., Ouchi, T. (2004). **Requirement of IFI16 for the maximal activation of p53 induced by ionizing radiation.** *J Biol Chem* 279, 20339-20344

Gartel, A.L., Radhakrishnan, S.K. (2005). **Lost in transcription: p21 repression, mechanisms, and consequences.** *Cancer Res* 65, 3980-3985

Gartel, A.L., Shchors, K. (2003). **Mechanisms of c-myc-mediated transcriptional repression of growth arrest genes.** *Exp Cell Res* 283, 17-21

Gartel, A.L., Tyner, A.L. (1998). **The growth-regulatory role of p21 (WAF1/CIP1).** *Prog Mol Subcell Biol* 20, 43-71

Gartel, A.L., Tyner, A.L. (1999). **Transcriptional regulation of the p21^(WAF1/CIP1) gene.** *Exp Cell Res* 246, 280-289

Gehring, W.J., Affolter, M., Burglin, T. (1994). **Homeodomain proteins.** *Annu Rev Biochem* 63, 487-526

German, M.S., Wang, J., Chadwick, R.B., Rutter, W.J. (1992). **Synergistic activation of the insulin gene by a LIM-homeo domain protein and a basic helix-loop-helix protein: building a functional insulin minienhancer complex.** *Genes Dev* 6, 2165-2176

- Giandomenico, V., Vaccari, G., Fiorucci, G., Percario, Z., Vannuchi, S., Matarrese, P., Malorni, W., Romeo, G., Affabris, G.R. (1998). **Apoptosis and growth inhibition of squamous carcinoma cells treated with interferon-alpha, IFN-beta and retinoic acid are associated with induction of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21.** *Eur Cytokine Netw* 9, 619-631
- Gibson, U.E, Heid, C.A., Williams, P.M. (1996). **A novel method for real time quantitative RT-PCR.** *Genome Res* 6, 995-1001
- Gossen, M., Bujard, H. (1992). **Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters.** *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 5547-5551
- Gresser, I., Bourali, C., Levy, J.P., Fontaine-Brouty-Boye, D., Thomas, M.T. (1969). **Increased survival in mice inoculated with tumor cells and treated with interferon preparations.** *Proc Natl Acad Sci USA* 63, 51-57
- Griffin, S.V., Petermann, A.T., Durvasula, R.V., Shankland, S.J. (2003). **Podocyte proliferation and differentiation in glomerular disease: role of cell-cycle regulatory proteins.** *Nephrol Dial Transplant* 18, vi8-vi13
- Groffen, A.J.A., Hop, F.W.H., Tryggvason, H., Dijkman, H., Assmann, K.H.M., Veerkamp, J.H., Monnens, L.A.H., van den Heuvel, L.P.W.J. (1997). **Evidence for the existence of multiple heparan sulfate proteoglycans in the human glomerular basement membrane and mesangial matrix.** *Eur J Biochem* 247, 175-182
- Grubb, G.R., Yun, K., Williams, B.R.G., Eccles, M.R., Reeve, A.E. (1994). **Expression of WT1 protein in fetal kidneys and Wilms tumors.** *Lab Invest* 71, 472-479
- Guijarro, C., Egido, J. (2001). **Transcription factor-kB (NF-kB) and renal disease.** *Kidney Int* 59, 415-424
- Guo, J., Hui, D.J., Merrick, W.C., Sen, G.C. (2000). **A new pathway of translational regulation mediated by eukaryotic initiation factor 3.** *EMBO J* 19, 6891-6899

Haber, D.A., Buckler, A.J., Glaser, T., Call, K.M., Pelletier J., Sohn, R.L., Douglass, E.C., Housman, D.E. (1990). **An internal deletion within an 11p13 zinc finger gene contributes to the development of Wilms' tumor.** *Cell* 61, 1257-1269

Hamlington, J.D., Jones, C, McIntosh, I. (2001). **Twenty-two novel LMX1B mutations identified in nail patella syndrome (NPS) patients.** *Hum Mutat* 18, 458-460

Hansen, K., Abrass, C.K. (1999). **Role of laminin isoforms in glomerular structure.** *Pathobiology* 67, 84-91

Harada, H., Taniguchi, T., Tanaka, N. (1998). **The role of interferon regulatory factors in the interferon system and cell growth control.** *Biochimie* 80, 641-650

Harada, H., Willison, K., Sakakibara, J., Miyamoto, M., Fujita, T., Taniguchi, T. (1990). **Absence of the type I IFN system in EC cells: transcriptional activator (IRF-1) and repressor (IRF-2) genes are developmentally regulated.** *Cell* 63, 303-312

Haraldsson, B., Sörensson, J. (2004). **Wy do we not all have proteinuria? An update of our current understanding of the glomerular barrier.** *News Physiol Sci* 19, 7-10

Harper, J.W., Elledge, S.J., Keyomarsi, K., Dynlacht, B., Tsai, L., Zhang, P., Dobtowolski, S., Bai, C., Connell-Crowley, L., Swindell, E., Fox, M.P., Wei, N. (1995). **Inhibition of cyclin-dependent kinases by p21.** *Mol Biol Cell* 6, 387-40

Hayden, M.S., Gosh, S. (2004). **Signaling to NF- κ B.** *Genes & Dev* 18, 2195-2224

Heidet, L., Bongers, E.M.H.F., Sich, M., Zhang, S.-Y., Loirat, C., Meyrier, A., Broyer, M., Landthaler, G., Faller, B., Sado, Y., Knoers, N.V.A.M., Gubler, M.C. (2003). **In vivo expression of putative LMX1B targets in nail-patella syndrome kidneys.** *Am J Pathol* 163, 145-155

Herron, B.J., Rao, C., Liu, S., Laprade, L., Richardson, J.A., Olivieri, E., Semsarian, C., Millar, S.E., Stubbs, L., Beier, D.R. (2005). **A mutation in *NFκB* interacting protein 1 results in cardiomyopathy and abnormal skin development in *wa3* mice.** *Hum Mol Genet* *14*, 667-677

Hertzog, P.J., O'Neill, L.A., Hamilton, J.A. (2003). **The interferon in TLR signaling: more than just antiviral.** *Trends Immunol* *24*, 534-538

Hiromura, K., Haseley, L.A., Zhang, P., Monkawa, T., Durvasula, R., Petermann, A.T., Alpers, C.E., Mundel, P., Shankland, S.J. (2001). **Podocyte expression of the CDK-inhibitor p57 during development and disease.** *Kidney Int* *60*, 2235-2246

Hiscott, J., Alper, D., Cohen, L., Leblanc, J.F., Sportza, L., Wong, A., Xanthoudakis, S. (1989). **Induction of human interferon gene expression is associated with a nuclear factor that interacts with the NF-kappa B site of the human immunodeficiency virus enhancer.** *J Virol* *63*, 2557-2566

Hiscott, J., Marois, J., Garoufalidis, J., D'Addario, M., Roulston, A., Kwan, I., Pepin, N., Lacoste, J., Nguyen, H., Bensi, G., Fenton, M. (1993). **Characterization of a functional NF-κB site in the human interleukin 1b promoter: evidence for a positive autoregulatory loop.** *Mol Cell Biol* *13*, 6231-6240

Hobeika, A.C., Subramaniam, P.S., Johnson, H.M. (1997). **IFN alpha induces the expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in human prostate cancer cells.** *Oncogene* *14*, 1165-1170

Hobert, O., Westphal, H. (2000). **Functions of LIM-homeobox genes.** *Trends Genet* *16*, 75-83

Honda, K., Yanai, H., Takaoka, A., Taniguchi, T. (2005). **Regulation of type I IFN induction: a current view.** *Int Immunol* *17*, 1367-1378

Huang, H., Colella, S., Kurrer, M., Yonekawa, Y., Kleihues, P., Ohgaki, H. (2000). **Gene expression profiling of low-grade diffuse astrocytomas by cDNA arrays.** *Cancer Res* 60, 6868-6874

Huber, T.B., Benzing, T. (2005). **The slit diaphragm: a signaling platform to regulate podocyte function.** *Curr Opin Nephrol Hypertens* 14, 211-216

Huber, T.B., Simons, M., Hartleben, B., Sernetz, L., Schmidts, M., Gundlach, E., Saleem, M.A., Walz, G., Benzing, T. (2003). **Molecular basis of the functional podocin-nephrin complex: mutations in the *NPHS2* gene disrupt nephrin targeting to lipid raft microdomains.** *Hum Mol Genet* 12, 3397-3405

Hudson, B.G., Tryggvason, K., Sundaramoorthy, M., Neilson, E.G. (2003). **Alport's syndrome, Goodpasture's syndrome, and type IV collagen.** *N Engl J Med* 348, 2543-2556

Ikezoe, T., Yang, Y., Bandobashi, K., Saito, T., Takemoto, S., Machida, H., Togitani, K., Koeffler, H.P., Taguchi, H. (2005). **Oridonin, a diterpenoid purified from *Rabdosia rubescens*, inhibits the proliferation of cells from lymphoid malignancies in association with blockade of the NF-kappa B signal pathways.** *Mol Cancer Ther* 4, 578-586

Isaacs, A., Lindenmann, J. (1957). **Virus interference. I. The interferon.** *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 147, 258-267.

Isaacs, A., Lindenmann, J., Valentine, R.C. (1957). **Virus interference. II. Some properties of interferon.** *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 147, 268-273

Jennette, J.C., Thomas, D.B. (2001). **Crescentic glomerulonephritis.** *Nephrol Dial Transplant* 16, 80-82

Johnson, J.D., Zhang, W., Rudnick, A., Rutter, W.J., German, M.S. (1997). **Transcriptional synergy between LIM-homeodomain proteins and basic helix-loop-helix proteins: the LIM2 domain determines specificity.** *Mol Cell Biol* 17, 3488-3496

Junqueira, L.C., Carneiro, J., Kelley, R.O. (2002). **Histologie**. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 5. Auflage

Jurata, L.W., Gill, G.N. (1997). **Functional analysis of the nuclear LIM domain interactor NLI**. *Mol Cell Biol* 17, 5688-5698

Jurata, L.W., Kenny, D.A., Gill, G.N. (1996). **Nuclear LIM interactor, a rhombotin and LIM homeodomain interacting protein, is expressed early in neuronal development**. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 11693-11698

Kamijo, R., Harada, H., Matsuyama, T., Bosland, M., Gerecitano, J., Shapiro, D., Le, J., Koh, S.J., Kimura, T., Green, S.J., Mak, T.W., Taniguchi, T., Vilcek, J. (1994). **Requirement for transcription factor IRF-1 in NO synthase induction in macrophages**. *Science* 263, 1612-1615

Kamimura, D., Ishihara, K., Hirano, T. (2003). **IL-6 signal transduction and its physiological roles: the signal orchestration model**. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 149, 1-38

Kanungo, J., Pratt, S.J., Marie, H., Longmore, G.D. (2000). **Ajuba, a cytosolic LIM protein, shuttles into the nucleus and affects embryonal cell proliferation and fate decisions**. *Mol Biol Cell* 11, 3299-3313

Karlsson, O., Thor, S., Norberg, T., Ohsson, H., Edlund, T. (1990). **Insulin gene enhancer binding protein Isl-1 is a member of a novel class of proteins containing both a homeo- and a Cys-His domain**. *Nature* 344, 879-882

Kassel, O., Schneider, S., Heilbock, C., Litfin, M., Göttlicher, M., Herrlich, P. (2004). **A nuclear isoform of the focal adhesion LIM-domain protein Trip6 integrates activating and repressing signals at AP-1- and NF- κ B-regulated promoters**. *Genes Dev* 18, 2518-2528

Kastner, J. (2004). **Charakterisierung des wachstumsinhibitorischen Effekts des LIM-Homöobox-Transkriptionsfaktors 1 Beta (LMX1B)**. Diplomarbeit zur Erlangung des Grades eines Diplombiologen. Institut für molekulare und zelluläre Anatomie der Naturwissenschaftlichen Fakultät III der Universität Regensburg

Kato, A., Homma, T., Batchelor, J., Hashimoto, N., Imai, S., Wakiguchi, H., Saito, H., Matsumoto, K. (2003). **Interferon- α /b receptor-mediated selective induction of a gene cluster by CpG oligodeoxynucleotide 2006**. BMC Immunol 2003 4

Katz, A., Fish, A.J., Kleppel, M.M., Hagen, S.G., Michael, A.F., Butkowski R.J. (1991). **Renal entactin (nidogen): Isolation, characterization and tissue distribution**. Kidney Int 40, 643-652

Katze, M.G. (1995). **Regulation of the interferon-induced PKR: can viruses cope?** Trends Microbiol 3, 75-78

Kessler, D.S., Veals, S.A., Fu, X.Y., Levy, D.E. (1990). **Interferon-alpha regulates nuclear translocation and DNA-binding affinity of ISGF3, a multimeric transcriptional activator**. Genes Dev 4, 1753-1765

Kestilä, M., Lenkkeri, U., Männikkö, M., Lamerdin, J., McCready, P., Putaala, H., Ruotsalainen, V., Morita, T., Nissinen, M., Herva, R., Kashtan, C.E., Pelton, L., Holmberg, C., Olsen, A., Tryggvason, K. (1998). **Positionally cloned gene for a novel glomerular protein – nephrin – is mutated in congenital nephrotic syndrome**. Mol Cell 1, 575-582

Kim, J.M., Oh, Y.-K., Kim, Y.-J., Cho, S.J., Ahn, M.-H., Cho, Y.-J. (2001). **Nuclear factor-kappa B plays a major role in the regulation of chemokine expression of HeLa cells in response to *Toxoplasma gondii* infection**. Parasitol Res 87, 758-763

Kim, T., Kim, T.Y., Lee, W.G., Yim, J., Kim, T.K. (2000). **Signaling pathways to the assembly of an interferon- β enhanceosome**. J Biol Chem 275, 16910-16917

- Kim, Y.G., Alpers, C.E., Brugarolas, J., Johnson, R.J., Couser, W.G., Shankland, S.J. (1999). **The cyclin kinase inhibitor p21 Cip1/WAF1 limits glomerular epithelial cell proliferation in experimental glomerulonephritis.** *Kidney Int* 55, 2349-2361
- Kimchi, A. (1992). **Cytokine triggered molecular pathways that control cell cycle arrest.** *J Cell Biochem* 50, 1-9
- Kimura, T., Kadokawa, Y., Harada, H., Matsumoto, M., Sato, M., Kashiwazaki, Y., Tarutani, M., Tan, R.S., Takasugi, T., Matsuyama, T., Mak, T.W., Noguchi, S., Taniguchi, T. (1996). **Essential and non-redundant roles of p48 (ISGF3-g) and IRF-1 in both type I and type II interferon responses, as revealed by gene targetting studies.** *Genes Cells* 1, 115-124
- Kirchhoff, S., Koromilas, A.E., Schaper, F., Grashoff, M., Sonenberg, N., Hauser, H. (1995). **IRF-1 induced cell growth inhibition and interferon induction requires the activity of the protein kinase PKR.** *Oncogene* 11, 439-445
- Kirchhoff, S., Wilhelm, D., Angel, P., Hauser, H. (1999). **NFkB activation is required for interferon regulatory factor-1-mediated interferon b induction.** *Eur J Biochem* 261, 546-554
- Kita, K., Sugaya, S., Zhai, L., Wu, Y.P, Wano, C., Chigira, S., Nomura, J., Takahashi, S., Ichinose, M., Suzuki, N. (2003). **Involvement of LEU13 in interferon-induced refractoriness of human RSa cells to cell killing by X rays.** *Radiat Res* 160, 302-308
- Knippers, R. (1997). **Molekulare Genetik.** Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, 7. Auflage
- Knoers, N.V.A.M., Bongers, E.M.H.F., van Beersum, S.E.C., Lommen, E.J.P., van Bokhoven, H., Hol, F.A. (2000). **Nail-patella syndrome: identification of mutations in the LMX1B gene in Dutch families.** *J Am Soc Nephrol* 11, 1762-1766

- Koromilas, A.E., Roy, S., Barber, G.N., Katze, M.G., Sonenberg, N. (1992). **Malignant transformation by a mutant of the IFN-inducible dsRNA-dependent protein kinase.** *Science* 257, 1685-1689
- Koshiji, M., Kageyama, Y., Pete, E.A., Horikawa, I., Barrett, J.C., Huang, L.E. (2004). **HIF-1 α induces cell cycle arrest by functionally counteracting Myc.** *EMBO J* 23, 1949-1956
- Kriz, W. (1996). **Progressive renal failure-inability of podocytes to replicate and the consequences for development of glomerulosclerosis.** *Nephrol Dial Transplant* 11, 1738-1742
- Kunsch, C., Rosen, C.A. (1993). **NF-kappa B subunit-specific regulation of the interleukin-8 promoter.** *Mol Cell Biol* 13, 6137-6146
- Kuo, M.H., Allis, C.D. (1999). **In vivo cross-linking and immunoprecipitation for studying dynamic Protein:DNA associations in a chromatin environment.** *Methods* 19, 425-433
- Kwak, J.C., Ongusaha, P.P., Ouchi, T., Lee, S.W. (2003). **IFI16 as a negative regulator in the regulation of p53 and p21^{Waf1}.** *J Biol Chem* 278, 40899-40904
- Le Hir, M. (2004). **Histopathology of humorally mediated anti-glomerular basement membrane (GBM) glomerulonephritis in mice.** *Nephrol Dial Transplant* 19, 1875-1880
- Lehtonen, A., Matikainen, S., Julkunen, I. (1997). **Interferons up-regulate STAT1, STAT2, and IRF family transcription factor gene expression in human peripheral blood mononuclear cells and macrophages.** *J Immunol* 159, 794-803
- Lenardo, M.J., Fan, C.M., Maniatis, T., Baltimore, D. (1989). **The involvement of NF-kappa B in beta-interferon gene regulation reveals its role as widely inducible mediator of signal transduction.** *Cell* 57, 287-294
- Levin, A.J. (1993). **The tumor suppressor genes.** *Annu Rev Biochem* 62, 623-651

- Lewin, A.R., Reid, L.E., McMahon, M., Stark, G.R., Kerr, I.M. (1991). **Molecular analysis of a human interferon-inducible gene family.** *J Biochem* 199, 417-423
- Li, H., Wu, X. (2004). **Histone deacetylase inhibitor, Trichostatin A, activates p21^(WAF1/CIP1) expression through down-regulation of c-myc and release of c-myc from the promoter in human cervical cancer cells.** *Biochem Biophys Res Commun* 324, 860-867
- Li, L., Bin, L.-H., Li, F., Liu, Y., Chen, D., Zhai, Z., Shu, H.-B. (2004). **TRIP6 is a RIP2-associated common signaling component of multiple NF- κ B activation pathways.** *J Cell Sci* 118, 555-563
- Li, Q., Verma, I.M. (2002). **NF- κ B regulation in the immune system.** *Nature Rev Immunol* 2, 725-734
- Liebermann, T.A., Baltimore, D. (1990). **Activation of interleukin-6 gene expression through the NF-kappa B transcription factor.** *Mol Cell Biol* 10, 2327-2334
- Lin, J., Reichner, C., Wu, X., Levine, A.J. (1996). **Analysis of wild-type and mutant p21 WAF-1 gene activities.** *Mol Cell Biol* 16, 1786-1793
- Loeb, K.R., Haas, A.L. (1992). **The interferon-inducible 15-kDa ubiquitin homolog conjugates to intracellular proteins.** *J Biol Chem* 267, 7806-7813
- Looij, B.J. Jr., Te Slaa, R.L., Hogewind, B.L., van de Kamp, J.J.P. (1988). **Genetic counselling in hereditary osteo-onychodysplasia (HOOD, nail-patella-syndrome) with nephropathy.** *J Med Genet* 25, 682-686
- Lu, G., Reinert, J.T., Pitha-Rowe, I., Okumura, A., Kellum, M., Knobloch, K.P., Hassel, B., Pitha, P.M. (2006). **ISG15 enhances the innate antiviral response by inhibition of IRF-3 degradation.** *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 52, 29-41
- Ludlow, L.E.A., Johnstone, R.W., Clarke, C.J.P. (2005). **The HIN-200 family: More than interferon-inducible genes?** *Exp Cell Res* 308, 1-17

- Ly, J., Alexander, M., Quaggin, S.E. (2004). **A podocentric view of nephrology.** *Curr Opin Nephrol Hypertens* 13, 299-305
- Malakhov, M.P., Kim, K.I., Malakhova, O.A., Jacobs, B.S., Borden, E.C., Zhang, D.E. (2003). **High-throughput immunoblotting. Ubiquitin-like protein ISG15 modifies key regulators of signal transduction.** *J Biol Chem* 278, 16608-16613
- Malmgaard, L. (2004). **Induction and regulation of IFNs during viral infections.** *J Interferon Cytokine Res* 24, 439-454
- Maniatis, T., Falvo, J.V., Kim, T.H., Kim, T.K., Lin, C.H., Parekh, B.S., Wathelet, M.G. (1998). **Structure und function of the interferon- β enhanceosome.** *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 63, 609-620
- Matthews, J.M., Visvader, J.E. (2003). **LIM-domain-binding protein 1: a multifunctional cofactor that interacts with diverse proteins.** *EMBO reports* 4, 1132-1137
- McCarthy, K.J. (1997). **Morphogenesis of the glomerular filter: The synchronous assembly and maturation of two distinct extracellular matrices.** *Microsc Res Tech* 39, 233-253
- McConnell, M.J., Chevallier, N., Berkofsky-Fessler, W., Giltneane, J.M., Malani, R.B., Staudt, L.M., Licht, J.D. (2003). **Growth suppression by acute promyelocytic leukemia-associated protein PLZF is mediated by repression of c-myc expression.** *Mol Cell Biol* 23, 9375-9388
- McGinnis, W., Levine, M.S., Hafen, E., Kuroiwa, A., Gehring, W.J. (1984). **A conserved DNA sequence in homeotic genes of the *Drosophila* antennapedia and bithorax complexes.** *Nature* 308, 428-433
- McIntosh, I., Clough, M.V., Schaffer, A.A. Puffenberger, E.G., Horton, V.K., Perts, K., Abbott, M.H., Roig, C.M., Cutone, S., Ozelius, L., Kwaiatkowski, D.J., Pyeritz, R.E., Brown, L.J., Pauli, R.M., McCormick, M.K., Francomano, C.A. (1997). **Fine mapping of the nail-patella syndrome locus at 9q34.** *J Hum Genet* 60, 133-142

- McIntosh, I., Dreyer, S.D., Clough, M.V., Dunston, J.A., Eyaid, W., Roig, C.M., Montgomery, T., Ala-Mello, S., Kaitila, I., Winterpacht, A., Zabel, B., Frydman, M., Cole, W.G., Francomano, C.A., Lee, B. (1998). **Mutation analysis of LMX1B gene in nail-patella syndrome patients.** *Am J Hum Genet* 63, 1651-1658
- McIntosh, I., Dunston, J.A., Liu, L., Hoover-Fong, J.E., Sweeney, E. (2005). **Nail patella syndrome revisited: 50 years after linkage.** *Ann Hum Genet* 69, 349-363
- McNeil, C.M., Musgrove, E.A. (2006). **Review of: c-Myc suppresses p21WAF1/CIP1 expression during oestrogen signalling and antioestrogen resistance in human breast cancer cells.** *Breast Cancer Online*, 1-4
- Meurs, E., Chong, K., Galabru, J., Thomas, N.S., Kerr, I.M., Williams, B.R., Hovanessian, A.G. (1990). **Molecular cloning and characterization of the human double-stranded RNA-activated protein kinase induced by interferon.** *Cell* 27, 379-390
- Michelsen, J.W., Schmeichel, K.L., Beckerle, M.C., Winge, D.R. (1993). **The LIM motif defines a specific zinc-binding protein domain.** *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 4404-4408
- Miettinen, M., Sareneva, T., Julkunen, I., Matikainen, S. (2001). **IFNs activate toll-like receptor gene expression in viral infections.** *Genes Immunity* 2, 349-355
- Miner, J.H., Morello, R., Andrews, K.L., Li, C., Antignac, C., Shaw, A.S., Lee, B. (2002). **Transcriptional induction of slit diaphragm genes by Lmx1b is required in podocyte differentiation.** *J Clin Invest* 109, 1065-1072
- Mitani, Y., Takaoka, A., Kim, S.H., Kato, Y., Yokochi, T., Tanaka, N., Taniguchi, T. (2001). **Cross talk of the interferon- α/β signalling complex with gp130 for effective interleukin-6 signalling.** *Genes to Cells* 6, 631-640
- Mitchell, K.O., El-Deiry, W.F. (1999). **Overexpression of c-Myc inhibits p21WAF1/CIP1 expression and induces S-phase entry in 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-sensitive human cancer cells.** *Cell Growth Differ* 10, 223-230

Miyao, N., Tsai, Y.C., Lerner, S.P., Olumi, A.F., Spruck, C.H. 3rd, Gonzalez-Zulueta, M., Nichols, P.W., Skinner, D.G., Jones, P.A. (1993). **Role of chromosome 9 in human bladder cancer.** *Cancer Res* 53, 4066-4070

Mogensen, T.H., Paludan, S.R. (2005). **Reading the viral signature by Toll-like receptors and other pattern recognition receptors.** *J Mol Med* 83, 180-192

Morello, R., Zhou, G., Dreyer, S.D., Harvey, S.J., Ninomiya, Y., Thorner, P.S., Miner, J.H., Cole, W., Winterpacht, A., Zabel, B., Oberg, K.C., Lee, B. (2001). **Regulation of glomerular basement membrane collagen expression by LMX1B contributes to renal disease in nail patella syndrome.** *Nat Genet* 27, 205-208

Morgan, D.O. (1995). **Principles of CDK regulation.** *Nature* 374, 131-134

Moriguchi, T., Hamada, M., Morito, N., Terunuma, T., Hasegawa, K., Zhang, C., Yokomizo, T., Esaki, R., Kuroda, E., Yoh, K., Kudo, T., Nagata, M., Greaves, D.R., Engel, J.D., Yamamoto, M., Takahashi, S. (2006). **MafB is essential for renal development and F4/80 expression in macrophages.** *Mol Cell Biol* 26, 5715-5727

Moynagh, P.N. (2005). **TLR signalling and activation of IRFs: revisiting old friend from the NF- κ B pathway.** *Trends Immunol* 26, 469-476

Mundlos, S., Pelletier, J., Darveau, A., Bachmann, M., Winterpacht, A., Zabel, B. (1993). **Nuclear localization of the protein encoded by the Wilm's tumor gene WT1 in embryonic and adult tissues.** *Development* 119, 1329-1341

Nagahama, H., Hatakeyama, S., Nakayama, K., Nagata, M., Tomita, K., Nakayama, K. (2001). **Spatial and temporal expression patterns of the cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitors p27Kip1 and p57Kip2 during mouse development.** *Anat Embryol* 203, 77-87

Niculescu, A.B. 3rd, Chen, X., Smeets, M., Hengst, L., Prives, C., Reed, S.I. (1998). **Effects of p21 (Cip1/Waf1) at both the G1/S and the G2/M cell cycle transitions: pRb is a critical determinant in blocking DNA replication and in preventing endoreduplication.** *Mol Cell Biol* 18, 629-643

Obaya, A.J., Sedivy, J.M. (2002). **Regulation of cyclin-Cdk activity in mammalian cells.** *Cell Mol Life Sci* 59, 126-142

Ostendorff, H.P., Peirano, R.I., Peters, M.A., Schlüter, A., Bossenz, M., Scheffner, M., Bach, I. (2002). **Ubiquitination-dependent cofactor exchange on LIM homeodomain transcription factors.** *Nature* 416, 99-103

Pagano, M. (Herausgeber) (1995). **Cell cycle – Materials and methods (Springer Lab Manuals).** Springer-Verlag, New York, 1. Auflage

Pahl, H.L. (1999). **Activators and target genes of Rel/NF- κ B transcription factors.** *Oncogene* 18, 6853-6866

Panne, D., Maniatis, T., Harrison, S.C. (2004). **Crystal structure of ATF-2/c-Jun and IRF-3 bound to the interferon- β enhancer.** *EMBO J* 23, 4384-4393

Parmar, S., Plataniias, L.C. (2003). **Interferons: mechanisms of action and clinical applications.** *Curr Opin Oncol* 15, 431-439

Paucker, K., Cantell, K., Henle, W. (1962). **Quantitative studies on viral interference in suspended L cells. III. Effect of interfering viruses and interferon on the growth rate of cells.** *Virology* 17, 324-334

Pavenstädt, H., Kriz, W., Kretzler, M. (2003). **Cell biology of the glomerular podocyte.** *Physiol Rev* 83, 253-307

Pelletier, J., Bruening, W., Kashtan, C.E., Mauer, S.M., Manivel, J.C., Striegel, J.E., Houghton, D.C., Junien, C., Habib, R., Fouser, L., Fine, R.N., Silverman, B.L., Haber, D.A., Housman, D. (1991). **Germline mutations in the Wilms' tumor suppressor gene are associated with abnormal urogenital development in Denys-Drash syndrome.** *Cell* 67, 437-447

Perez-Roger, I., Kim, S.H., Griffiths, B., Sewing, A., Land, H. (1999). **Cyclins D1 and D2 mediate myc-induced proliferation via sequestration of p27(Kip1) and p21(Cip1).** EMBO J 18, 5310-5320

Pestka, S., Krause, C.D., Walter, M.R. (2004). **Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors.** Immunol Reviews 202, 8-32

Pfaffl M.W. (2001). **A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR.** Nucleic Acids Res 29, e45

Pfaffl, M.W., Hageleit, M (2001). **Validities of mRNA quantification using recombinant RNA and recombinant DNA external calibration curves in real-time RT-PCR.** Biotechnology Letters 23, 275-282

Platanias, L.C., Fish, E.N. (1999). **Signaling pathways activated by interferons.** Exp Hematol 27, 1583-1592

Pokrovskaja, K., Panaretakis, T., Grandér, D. (2005). **Alternative signaling pathways regulating type I interferon-induced apoptosis.** J Interferons Cytokine Res 25, 799-810

Porter, A.C.G., Chernajovsky, Y., Dale, T.C., Gilbert, C.S., Stark, G.R., Kerr, I.M. (1988). **Interferon response element of the human gene 6-16.** EMBO J 7, 85-92

Pressmann, C.L., Chen, H., Johnson, R.L. (2000). **Lmx1b, a LIM-homeodomain class transcription factor, is necessary for normal development of multiple tissues in the anterior segment of the murine eye.** Genesis 26, 15-25

Prestel, J. (2003). **Charakterisierung des LIM-Homöobox-Transkriptionsfaktors 1 Beta (LMX1) in induzierbaren Zelllinien.** Inauguraldissertation zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades. Institut für Anatomie und Zellbiologie I der Medizinischen Fakultät Heidelberg der Ruprecht-Karls-Universität

- Rani, M.R., Leaman, D.W., Han, Rani, M.R., Leaman, D.W., Han, Y., Legung, S., Croze, E. (1999). **Catalytically active TYK2 is essential for interferon-beta-mediated phosphorylation of STAT3 and interferon-alpha receptor 1 (IFNAR-1) but not for activation of phosphoinositol 3-kinase.** *J Biol Chem* 274, 32507-32511
- Rasclé, A., Suleiman, H., Neumann, T., Witzgall, R. (2007). **Role of transcription factors in podocytes.** *Nephron Exp Nephrol* 106, e60-e66
- Rasmussen, R. (2001). **Quantification on LightCycler.** Rapid Cycle Real-time PCR, Methods and Applications, Springer Press Heidelberg
- Renwick, J.H., Lawler, S.D. (1955). **Genetical linkage between the AB0 and nail-patella loci.** *Ann Hum Genet* 19, 312-331
- Rétaux, S., Bachy, I. (2002). **A short history of LIM-domains (1993-2002): from protein interaction to degradation.** *Mol Neurobiol* 26, 269-281
- Rohr, C., Prestel, J., Heidet, L., Hosser, H., Kriz, W., Johnson, R.L., Antignac, C., Witzgall, R. (2002). **The LIM-homeodomain transcription factor Lmx1b plays a crucial role in podocytes.** *J Clin Invest* 109, 1073-1082
- Roos, G.T., Leandersson, T., Lundgren, E. (1984). **Interferon-induced cell cycle changes in human hemopoietic cell lines and fresh leukemic cells.** *Cancer Res* 44, 5358-5362
- Rossi, A., Kapahi, P., Natoli, G., Takahashi, T., Chen, Y., Karin, M., Santoro, M.G. (2000). **Anti-inflammatory cyclopentenone prostaglandins are direct inhibitors of I κ B kinase.** *Nature* 403, 103-108
- Rothwarf, D.M., Karin, M. (1999). **The NF-kappa B activation pathway: a paradigm in information transfer from membrane to nucleus.** *Sci STKE* vol. 1999, RE1
- Sadl, V.S., Jin, F., Yu, J., Cui, S., Holmyard, D., Quaggin, S.E., Barsh, G.S., Cordes, S.P. (2002). **The mouse kreisler (Krm11/MafB) segmentation gene is required for differentiation of glomerular visceral epithelial cells.** *Dev Biol* 249, 16-29

- Sakaguchi, S., Negishi, H., Asagiri, M., Nakajima, C., Mizutani, T., Takaoka, A., Honda, K., Taniguchi, T. (2003). **Essential role of IRF-3 in lipopolysaccharide-induced interferon-beta gene expression and endotoxin shock.** *Biochem Biophys Res Commun* 306, 860-866
- Saleem, M.A. (2003). **Biology of the human podocyte.** *Nephron Exp Nephrol* 85, e87-e92
- Sanchez-Carbayo, M., Socci, N.D., Charytonowicz, E., Lu, M., Prystowsky, M., Childs, G., Cordon-Cardo, C. (2002). **Molecular profiling of bladder cancer using cDNA microarrays: defining histogenesis and biological phenotypes.** *Cancer Res* 62, 6973-6980
- Sangfelt, O., Erickson, S., Castro, J., Heiden, T., Gustafsson, A., Einhorn, S., Grandér, D. (1999). **Molecular mechanisms underlying interferon-alpha-induced G0/G1 arrest: CKI-mediated regulation of G1 Cdk-complex and activation of pocket proteins.** *Oncogene* 18, 2798-2810
- Sangfelt, O., Erickson, S., Eichhorn, S., Grandér, D. (1997). **Induction of Cip/Kip and Ink4 cyclin dependent kinase inhibitors by interferon-alpha in hematopoietic cell lines.** *Oncogene* 14, 415-423
- Sato, M., Suemori, H., Hata, N., Asagiri, M., Ogasawara, K., Nakao, K., Nakaya, T., Katsuki, M., Noguchi, S., Tanaka, M., Taniguchi, T. (2000). **Distinct and essential roles of transcription factors IRF-3 and IRF-7 in response to viruses for *IFN-a/b* gene induction.** *Immunity* 13, 539-548
- Schleutermann, D.A., Bias, W.B., Murdoch, J.L., McKusick (1969). **Linkage of the loci for the nail-patella syndrome and adenylate kinase.** *Am J Hum Genet* 21, 606-630
- Schnare, M., Röllinghoff, M., Qureshi, S. (2006). **Toll-like receptors: sentinels of host defence against bacterial infection.** *Int Arch Allergy Immunol* 139, 75-85
- Schroder, K., Hertzog, P.J., Ravasi, T., Hume, D.A. (2004). **Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions.** *J Leukocyte Biol* 75, 163-189

Sears, R.C., Nevins, J.R. (2002). **Signaling networks that link cell proliferation and cell fate.** *J Biol Chem* 277, 11617-11620

Sen, G.C. (2001). **Viruses and interferons.** *Annu Rev Microbiol* 55, 255-281

Senger, K., Merika, M., Agaloti, T., Tie, J., Excalante, C.R., Chen, G., Aggarwal, A.K., Thanos, D. (2000). **Gene repression by coactivator repulsion.** *Mol Cell* 6, 931-937

Setogawa, T., Shinozaki-Yabana, S., Masuda, T., Matsuura, K., Akiyama T. (2006). **The tumor suppressor LKB1 induces 21 expression in collaboration with LMO4, GATA-6, and Ldb1.** *Biochem Biophys Res Comm* 343, 1186-1190

Shankland, S.J. (2006). **The podocyte's response to injury: Role in proteinuria and glomerulosclerosis.** *Kidney Int* 69, 2131-2147

Shankland, S.J., Eitner, F., Hudkins, K.L, Goodpaster, T., D'Agati, V., Alpers, C.E. (2000). **Differential expression of cyclin-dependent kinase inhibitors in human glomerular disease: role in podocyte proliferation and maturation.** *Kidney Int* 58, 674-683

Shankland, S.J., Wolf, G. (2000). **Cell cycle regulatory proteins in renal disease: role in hypertrophy, proliferation and apoptosis.** *Am J Physiol Renal Physiol* 278, 515-529

Sherr, C.J. (2004). **Principles of tumor suppression.** *Cell* 116, 235-246

Sherr, C.J., Roberts, J.M. (1999). **CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression.** *Genes Dev* 13, 1501-1512

Shimizu, H., Mitomo, K., Watanabe, T., Okamoto, S., Yamamoto, K. (1990). **Involvement of NF-kappa B-like transcription factor in the activation of the interleukin-6 gene by inflammatory lymphokines.** *Mol Cell Biol* 10, 561-568

Shin, H.M., Kim, M.H., Kim, B.H., Jung, S.H., Kim, Y.S., Park, H.J., Hong, J.T., Min, K.R., Kim, Y. (2004). **Inhibitory action of novel aromatic diamine compound on lipopolysaccharide-induced nuclear translocation of NF-kappaB without affecting IkappaB degradation.** *FEBS Lett* 571, 50-54

Smith, R.C., Branellec, D., Gorski, D.H., Guo, K., Perlman, H., Dedieu, J.F., Pastore, C., Mahfoudi, A., Deneffe, P., Isner, J.M., Walsh, K. (1997). **p21CIP1-mediated inhibition of cell proliferation by overexpression of the *gax* homeodomain gene.** *Genes Dev* 11, 1674-1689

Sobotta, J., Welsch, U. (2003). **Lehrbuch Histologie.** Urban & Fischer Verlag München, Jena, 1. Auflage

Stark, G.R., Kerr, I.M., Williams, B.R.G., Silverman R.H., Schreiber, R.D. (1998). **How cells respond to interferons.** *Annu Rev Biochem* 67, 227-264

Stöhr, R., Krieg R.C., Knüchel, R., Hofstädter, F., Pilarsky, C., Zaak, D., Schmitt, R., Hartmann, A. (2002). **No evidence for involvement of β -catenin ad APC in urothelial carcinomas.** *Int J Oncol* 20, 905-911

Subramaniam, P.S., Johnson, H.M. (1997). **A role for the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in the G1 cell cycle arrest mediated by the type I interferons.** *J Interferon Cytokine Res* 17, 11-15

Suleiman, H., Heudobler, D., Raschta, A.S., Zhao, Y., Zhao, Q., Hertting, I., Vitzthum, H., Moeller, M.J., Holzman, L.B., Rachel, R., Johnson, R., Westphal, H., Rasche, A., Witzgall, R. (2007). **The podocyte-specific inactivation of *Lmx1b*, *Ldb1* and *E2a* yields new insight into a transcriptional network in podocytes.** *Dev Biol* 304, 701-712

Sweeney, E, Fryer, A., Mountford, R., Green, A., McIntosh, I. (2003). **Nail-patella syndrome: a review of the phenotype aided by developmental biology.** *J Med Genet* 40, 153-162

Tahara, E., Jr., Tahara, H., Kanno, M., Naka, K., Takeda, Y., Matsuzaki, T., Yamazaki, R., Ishihara, H., Yasui, W., Barrett, J.C., Ide, T., Tahara, E. (2005). **G1P3, an interferon inducible gene 6-16, is expressed in gastric cancers and inhibits mitochondrial-mediated apoptosis in gastric cancer cell line TMK-1 cell.** *Cancer Immunol Immunother* 54, 729-740

Takaoka, A., Taniguchi, T. (2003). **New aspects of IFN- α /b signalling in immunity, oncogenesis and bone metabolism.** *Cancer Sci* 94, 405-411

Takaoka, A., Yanai, H. (2006). **Interferon signalling network in innate defence.** *Cell Microbiol* 8, 907-922

Takeda, K., Akira, S. (2004). **TLR signaling pathways.** *Semin Immunol* 16, 3-9

Takemoto, M., He, L., Norlin, J., Patrakka, J., Xiao, Z., Petrova, T., Bondjers, C., Asp, J., Wallgard, E., Sun, Y., Samuelsson, T., Mostad, P., Lundin, S., Miura, N., Sado, Y., Alitalo, K., Quaggin, S.E., Tryggvason, K., Betsholtz, C. (2006). **Large-scale identification of genes implicated in kidney glomerulus development and function.** *EMBO J* 25, 1160-1174

Tanaka, N., Kawakami, T., Taniguchi, T. (1993). **Recognition DNA sequences of interferon regulatory factor 1 (IRF-1) and IRF-2, regulators of cell growth and the interferon system.** *Mol Cell Biol* 13, 4531-4538

Taniguchi, T., Ogasawara, K., Takaoka, A., Tanaka, N. (2001). **IRF family of transcription factors as regulators of host defense.** *Annu Rev Immunol* 19, 623-655

Taniguchi, T., Takaoka, A. (2002). **The interferon- α /b system in antiviral responses: a multimodal machinery of gene regulation by the IRF family of transcription factors.** *Curr Opin Immunol* 14, 111-116

Thomas, N.S., Pizzey, A.R., Tiwari, S., Williams, C.D., Yang, J. (1998). **p130, p107, and pRb are differentially regulated in proliferating cells during the cell cycle arrest by alpha-interferon.** *J Biol Chem* 273, 23659-23667

Tiefenbrun, N., Melamed, D., Levy, N., Resnitzky, D., Hoffman, I., Reed, S.I., Kimchi, A. (1996). **Alpha interferon suppresses the cyclin D3 and cdc25A genes, leading to a reversible G0-like arrest.** *Mol Cell Biol* 16, 3934-3944

Tipping, P.G., Holdsworth, S.R. (2003). **T cells in glomerulonephritis.** *Springer Semin Immunopathol* 24, 377-393

Tliba, O., Panettieri, R.A., Jr., Tliba, S., Walseth, T.F., Amrani, Y. (2004). **Tumor necrosis factor- α differentially regulates the expression of proinflammatory genes in human airway smooth muscle cells by activation of interferon- β -dependent CD38 pathway.** *Mol Pharmacol* 66, 322-329

Tomita, N., Morishita, R., Tomita, S., Yamamoto, K., Aoki, M., Matsushita, H., Hayashi, S., Higaki, J., Ogihara, T. (1998). **Transcription factor decoy for nuclear factor- κ B inhibits tumor necrosis factor- α -induced expression of interleukin-6 and intracellular adhesion molecule-1 in endothelial cells.** *J Hypertens* 16, 993-1000

Tomita, N., Ogihara, T., Morishita, R. (2003). **Transcription factors as molecular targets: molecular mechanisms of decoy ODN and their design.** *Curr Drug Targets* 4, 603-608

Trigiante, G., Lu, X. (2006). **ASPP and cancer.** *Nat Rev Cancer* 6, 217-226

Tryggvason, K., Patrakka, J., Wartiovaara, J. (2006). **Hereditary proteinuria syndromes and mechanisms of proteinuria.** *N Engl J Med* 354, 387-401

Turner, J.W. (1933). **An hereditary arthrodysplasia associated with hereditary dystrophy of the nails.** *J A M A* 100, 882-884

Vidalain, P.O., Laine, D., Zaffran, Y., Azocar, O., Servet-Delprat, C., Wild, T.F., Roubourdin-Combe, C., Valentin, H. (2002). **Interferons mediate terminal differentiation of human cortical thymic epithelial cells.** *J Virol* 76, 6415-6424

- Vollrath, D., Jaramillo-Babb, V.L., Clough, M.V., McIntosh, I., Scott, K.M., Lichter, P.R., Richards, J.E. (1998). **Loss-of-function mutations in the LIM-homeodomain gene, *LMX1B*, in nail patella syndrome.** Hum Mol Genet 7, 1091-1098
- Waga, S., Hannon, G.J., Beach, D., Stillman, B. (1994). **The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interacting with PCNA.** Nature 369, 574-578
- Wagner, N., Wagner, K.D., Xing, Y., Scholz, H., Schedl, A. (2004). **The major podocyte protein nephrin is transcriptionally activated by the Wilms' tumor suppressor WT1.** J Am Soc Nephrol 15, 3044-3051
- Wang, X.H., Yan, G.T., Wang, L.H., Hao, X.H., Zhang, K., Xue, H. (2004). **The mediating role of cPLA2 in IL-1 β and IL-6 release in LPS-induced HeLa cells.** Cell Biochem Funct 22, 41-44
- Way, J.C., Chalfie, M. (1988). **Mec-3, a homeobox-containing gene that specifies differentiatio of the touch receptor neurons.** Cell 54, 5-16
- Weissenbach, J., Chernajovsky, Y., Zeevi, M., Shulman, L., Soreq, H., Nir, U., Wallach, D., Perricaudet, M., Tiollais, P., Revel, M. (1980). **Two interferon mRNAs in human fibroblasts: in vitro translation and *Escherichia coli* cloning studies.** Proc Natl Acad Sci USA 77, 7152-7156
- Wong, M.L., Medrano, J.F. (2005). **Real-time PCR for mRNA quantitation.** BioTechn 39, 1-11
- Yamamoto, H., Lamphier, M.S., Fujita, T., Taniguchi, T., Harada, H. (1994). **The oncogenic transcription factor IRF-2 possesses a transcriptional repression and a latent activation domain.** Oncogene 9, 1423-1428
- Yan, R., Qureshi, S., Zhong, Z., Wen, Z., Darnell, J.E., Jr. (1995). **The genomic structure of the STAT genes: multiple exons in coincident sites in Stat1 and Stat2.** Nucleic Acids Res 23, 459-463

- Yang C.H., Murti, A. Pfeffer, L.M. (2005). **IFN induces NIK/TRAF-dependent NF- κ B activation to promote cell survival.** *J Biol Chem* 280, 31530-31536
- Yang, J.-P., Hori, M., Sanda, T., Okamoto, T. (1999). **Identification of a novel inhibitor of nuclear factor- κ B, RelA-associated inhibitor.** *J Biol Chem* 274, 15662-15670
- Yi, J., Beckerle, M.C. (1998). **The human TRIP6 gene encodes a LIM domain protein and maps to chromosome 7q22, a region associated with tumorigenesis.** *Genomics* 49, 314-316
- Zamanian-Daryoush, M. Mogensen, T.H., DiDonato, J.A., Williams, B.R. (2000). **NF- κ B activation by double-stranded-RNA-activated protein kinase (PKR) is mediated through NF- κ B-inducing kinase and I κ B kinase.** *Mol Cell Biol* 20, 1278-1290
- Zarembek, K.A., Godowski, P.J. (2002). **Tissue expression of human toll-like receptors and differential regulation of toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products and cytokines.** *J Immunol* 168, 554-561
- Zenker, M., Aigner, T., Wendler, O., Tralau, T., Müntefering, H., Fenski, R., Pitz, S., Schumacher, V., Royer-Pokora, B., Wuhl, E., Cochat, P., Bouvier, R., Kraus, C., Mark, K., Madlon, H., Dotsch, J., Rascher, W., Maruniak-Chudek, I., Lennert, T., Neumann, N.M., Reis, A. (2004). **Human laminin beta2 deficiency causes congenital nephrosis with mesangial sclerosis and distinct eye abnormalities.** *Mol Genet* 13, 2625-2632
- Zhao, C., Denison, C., Huibregtse, J.M., Gygi, S., Krug, R.M. (2005). **Human ISG15 conjugation targets both IFN-induced and constitutively expressed proteins functioning in diverse cellular pathways.** *PNAS* 102, 10200-10205

7. Veröffentlichungen

Rasclé, A., **Neumann, T.**, Raschta, A.S., Neumann, A., Heining, E., Kastner, J., Witzgall, R. (2009). **The LIM-homeodomain transcription factor LMX1B regulates expression of NF-kappa B target genes.** *Exp Cell Res* 315, 76-96

Rasclé, A., Suleiman, H., **Neumann, T.**, Witzgall, R. (2007). **Role of transcription factors in podocytes.** *Nephron Exp Nephrol* 106, e60-e66



ELSEVIER

available at www.sciencedirect.comwww.elsevier.com/locate/yexcr

Research Article

The LIM-homeodomain transcription factor LMX1B regulates expression of NF-kappa B target genes

Anne Rascle^{*1}, Tanja Neumann¹, Anne-Sarah Raschta¹, Astrid Neumann¹, Eva Heining², Juergen Kastner, Ralph Witzgall^{*}

Institute for Molecular and Cellular Anatomy, University of Regensburg, Universitaetsstrasse 31, 93053, Regensburg, Germany

ARTICLE INFORMATION

Article Chronology:

Received 4 September 2008

Revised version received

14 October 2008

Accepted 15 October 2008

Available online 28 October 2008

Keywords:

LMX1B

Gene expression profiling

NF-κB

ChIP assay

Transcription

siRNA-mediated knock-down

Chromatin

Knock-out mouse

Tet-off expression system

Luciferase reporter assay

ABSTRACT

LMX1B is a LIM-homeodomain transcription factor essential for development. Putative LMX1B target genes have been identified through mouse gene targeting studies, but their identity as direct LMX1B targets remains hypothetical. We describe here the first molecular characterization of LMX1B target gene regulation. Microarray analysis using a tetracycline-inducible LMX1B expression system in HeLa cells revealed that a subset of NF-κB target genes, including *Il-6* and *Il-8*, are upregulated in LMX1B-expressing cells. Inhibition of NF-κB activity by short interfering RNA-mediated knock-down of p50 impairs, while activation of NF-κB activity by TNF-α synergizes induction of NF-κB target genes by LMX1B. Chromatin immunoprecipitation demonstrated that LMX1B binds to the proximal promoter of *Il-6* and *Il-8* *in vivo*, in the vicinity of the characterized κB site, and that LMX1B recruitment correlates with increased NF-κB DNA association. *Il-6* promoter-reporter assays showed that the κB site and an adjacent putative LMX1B binding motif are both involved in LMX1B-mediated transcription. Expression of NF-κB target genes is affected in the kidney of *Lmx1b*^{-/-} knock-out mice, thus supporting the biological relevance of our findings. Together, these data demonstrate for the first time that LMX1B directly regulates transcription of a subset of NF-κB target genes in cooperation with nuclear p50/p65 NF-κB.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

LIM-homeodomain (LIM-HD) proteins are transcription factors that belong to the family of LIM proteins, originally named for the LIM domain-containing transcription factors *Lin11*, *Is11*, and *Mec3*. To date, at least 12 LIM-HD transcription factors have been characterized in mammals (*LHX1–9*, *ISL1–2*, *LMX1A* and *LMX1B*). They play key regulatory functions in cell-type specification during development, and many of them are associated with human diseases (reviewed in [1,2]). LIM-HD proteins feature two LIM

domains in their amino termini and a central homeodomain (HD). The HD is a highly conserved 60 amino acid domain that mediates the binding to specific DNA elements within target genes. The majority of the characterized HD recognizes AT-rich elements containing a 5'-TAAT-3' core motif (or ATTA on the other strand) (reviewed in [3,4]). The LIM domain is a conserved cysteine- and histidine-rich zinc-coordinating domain of approximately 50–60 amino acids, consisting of two tandemly repeated zinc fingers. The LIM domain is a multifunctional protein-protein interaction domain. It mediates interactions with other transcription factors

^{*} Corresponding authors. Fax: +49 (0)941 943 2868.

E-mail addresses: anne.rascle@vkl.uni-regensburg.de (A. Rascle), ralph.witzgall@vkl.uni-regensburg.de (R. Witzgall).

¹ Authors contributed equally to this work.

² Present address: Institute for Biochemistry, Free University of Berlin, 14195, Berlin, Germany.

bound in the vicinity, as well as with transcriptional cofactors that do not bind to DNA (reviewed in [1]), and is thus responsible for positively or negatively regulating the transcriptional activity of LIM-HD proteins. Several cofactors of LIM-HD have been described, including the CLIM coactivators (CLIM1/LDB2 and CLIM2/LDB1/NLI) and the corepressor R LIM. LDB1 is a cofactor of multiple LIM-containing proteins, and plays essential functions in development (reviewed in [5]). It regulates transcription through protein interactions via its C-terminal LIM interaction domain (LID) [6–9]. The RING H2 zinc finger protein R LIM is a negative transcriptional regulator of LIM domain-containing factors, through recruitment of histone deacetylase (HDAC) as well as through its ubiquitin ligase activity that targets both LDB1 and LIM-HD proteins for degradation [10,11].

The LIM-HD transcription factor LMX1B is expressed in multiple tissues, including kidney, brain, developing limb and eye, and cranial mesenchyme [12–21] (also reviewed in [2,22]). Gene targeting studies in mouse uncovered numerous functions of LMX1B. *Lmx1b* homozygous knock-out mice display limb defects, including dorsal-to-ventral conversion of the limbs and a lack of patella and nails [13]. These mice also display kidney defects, in particular abnormalities in the glomerular basement membrane, and impaired differentiation and maintenance of the podocytes, the cells specifically expressing LMX1B in the kidney [23], resulting in severe proteinuria and death [13,24–26]. In the brain, LMX1B is involved in the development of mesencephalic dopaminergic neurons [21] and of serotonergic neurons [17], and in the differentiation and migration of afferent sensory neurons [27]. It is also essential for the development of the tectum and the cerebellum [18]. Finally, LMX1B is required for the development of multiple tissues of the anterior segment of the murine eye [19].

Interestingly, the *Lmx1b* null mouse model mimics the human disease associated with *LMX1B* heterozygous mutations, nail-patella syndrome (NPS), also known as hereditary osteo-onychodysplasia (HOOD) and Fong's Disease. NPS is a rare autosomal dominant disorder characterized by various skeletal dysplasia (nail dysplasia, hypoplastic or missing patella, elbow dysplasia) in 70–90% of NPS patients, podocyte-associated nephropathy in 40% of NPS cases, open angle glaucoma in 10% of NPS patients, and often neuropathy (reviewed in [2,22,28]). Mutations in *LMX1B* concentrate within the exons encoding the LIM domains (LIM1 44%, LIM2 38%) and the HD (18%) [28], strongly supporting a role of LMX1B as a transcription factor and the importance of LIM domain-interacting cofactors.

LMX1B interacts through its LIM domains with the bHLH transcription factor E47 on the *insulin* gene minienhancer, resulting in synergistic gene activation [29,30]. LMX1B also interacts with the LDB1 cofactor *in vitro* [6–8,26,31]. Overexpression of LDB1 inhibits the synergistic activation by LMX1B and E47 in a reporter assay [7,32], very likely by competing for interaction to LMX1B LIM domains. We recently showed that LDB1 is essential for podocyte function *in vivo*, possibly as a cofactor of LMX1B transcriptional activity [26]. By contrast, E47 has no essential function in podocyte *in vivo*, and is thus an unlikely cofactor of LMX1B in the kidney [26]. Given LDB1 broad *in vivo* expression pattern and its role as a multifunctional adaptor protein, one would predict that specific cofactors of LMX1B exist *in vivo*, to regulate the tissue-specific expression of LMX1B target genes. However, tissue- and cell-specific LMX1B cofactors have not been identified thus far.

Immunohistochemical, *in situ* hybridization, and microarray analyses of *Lmx1b* null mice identified genes with deregulated expression (at RNA and/or protein level) in the various LMX1B-expressing tissues [13,18,19,24,25,33–35]. Thus, in the developing eye of *Lmx1b*^{-/-} mice, *Foxc1* and *Foxc2* are upregulated and *keratocan* is absent [19]. In the developing tectum and cerebellum of *Lmx1b* null mice, expression of *Wnt1*, *En1*, *Pax2* and *Gbx2* is reduced while expression of *Fgf8* is abolished [18]. In the developing limb, loss of dorsoventral asymmetry is associated with an altered expression pattern of the *sfrp2*, *Six1* and *Six2* genes [33] and with up- and downregulation of multiple genes [34]. In the kidney of newborn *Lmx1b*^{-/-} mice, expression of *Nphs2* (encoding podocin) is abolished, while expression of *Col4a3* and *Col4a4* (encoding the $\alpha(3)$ and $\alpha(4)$ chains of type IV collagen) and of *Cd2ap* is downregulated [13,24,25,35]. A/T-rich, so-called FLAT elements (FLAT-E: TAATTA, FLAT-F: TTAATA or TATTAA on the other strand) present in the promoter regions or introns of the genes encoding podocin, collagen IV α 3 and IV α 4, and CD2AP bind recombinant LMX1B *in vitro* [24,25,35], and drive LMX1B-mediated transcription of a reporter gene when present as multiple copies [24,35] but not from the native promoter [25]. In addition, expression of the genes encoding podocin, collagen IV α 3 and IV α 4, and CD2AP is not affected in the kidney of NPS patients [36]. Therefore, in the absence of *in vivo* molecular characterization of their regulation by LMX1B, it remains unclear whether deregulation of these genes in *Lmx1b* null mice is the consequence of an impaired or blocked differentiation program, or whether they represent *bona fide* LMX1B direct target genes.

We describe here the first molecular characterization of LMX1B target gene regulation *in vivo*. To identify putative LMX1B target genes, human LMX1B was expressed in HeLa cells using a tet-off inducible system. Genome-wide and quantitative RT-qPCR expression studies revealed that several NF- κ B target genes (*IL-6*, *IL-8*, *IL-1 β* , *IFN- β* , ...) and multiple interferon-stimulated genes (ISGs) were upregulated upon LMX1B expression. We found that while ISGs were induced in response to IFN- β , NF- κ B target genes were directly activated by LMX1B. Chromatin immunoprecipitation assays demonstrated that LMX1B protein is recruited to the promoter of the NF- κ B target genes *IL-6* and *IL-8*. Using NF- κ B p65-specific siRNAs, we showed that induction of NF- κ B target genes by LMX1B requires a functional p50/p65 NF- κ B transcription factor. Interestingly, gene expression analysis in *Lmx1b* null mice revealed that the NF- κ B targets induced by LMX1B in HeLa cells were upregulated in the kidney of *Lmx1b*^{-/-} mice, suggesting LMX1B-mediated transcriptional repression of these genes in murine kidney, whereas they remained unaffected in a kidney tubuli-derived cell line (LLC-PK₁) upon LMX1B expression. Our data thus demonstrate for the first time that LMX1B regulates transcription of a subset of NF- κ B target genes in cooperation with p50/p65 NF- κ B, probably through recruitment of cell-specific LIM-interacting cofactors.

Materials and methods

Plasmids

The human LMX1B pcDNA3-derived (Invitrogen) expression vector (p3M/myc-LMX1B) used for co-transfection in luciferase reporter assays has been described [26]. The pUHD10-3/myc-

LMX1B expression vector was generated by subcloning the myc tagged-LMX1B cDNA isolated from p3M/myc-LMX1B into the XbaI site of pUHD10-3 (a kind gift from H. Bujard, ZMDH, Heidelberg, Germany; [37]). The pUHD10-3/myc-LMX1B C95F construct was generated by introducing a single nucleotide change (TGC to TTC) within LMX1B cDNA, using the QuickChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene), resulting in a single amino acid substitution (cysteine to phenylalanine) at position 95 of the corresponding LIM2 domain. The human wild-type and NF- κ B mutated motif-containing IL-6 promoter (-1168/+11) fused to the *Firefly* luciferase reporter gene (designated IL-6P.wt-Luc and IL-6P.NF- κ B-Luc respectively; [38]) were obtained from the BCCM/LMBP plasmid collection (accession number LMBP 4495 and LMBP 4496 respectively). Site-directed mutagenesis of the FLAT element at position -146 relative to the transcription start site (TTAATA to TCGAGA) was performed on both IL-6P.wt-Luc and IL-6P.NF- κ B-Luc plasmids using the QuickChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene) according to manufacturer's instructions, generating plasmids IL-6P.FLAT-Luc and IL-6P.FLAT.NF- κ B-Luc respectively. The promoter-less Δ IL-6P-Luc *Firefly* luciferase reporter control was obtained by excising the entire human IL-6 promoter region (-1168/+11) from plasmid IL-6P.wt-Luc using HindIII. The (NF- κ B)₄-Luc *Firefly* luciferase reporter (pNF- κ B-Luc, Clontech) contains 4 copies of the canonical κ B site upstream of a TATA-like minimal *HSV-TK* promoter. Vector backbones of (NF- κ B)₄-Luc and IL-6P-Luc *Firefly* luciferase reporters are identical, as revealed by sequence alignment using the Vector NTI software (Invitrogen). The internal control pRL-null *Renilla* luciferase reporter was from Promega.

Cells

To establish the tet-off human HeLa (HtTA) cell lines expressing the human wild-type LMX1B protein (HtTA-LMX1B wt) and its mutated counterpart LMX1B C95F (HtTA-LMX1B C95F), the parental HtTA-1 cell line (a kind gift from H. Bujard, ZMDH, Heidelberg, Germany; [37]) was transfected with plasmids pUHD10-3/myc-LMX1B wt and pUHD10-3/myc-LMX1B C95F respectively. Stable transfection was performed using Poly-*t*-Ornithin [39], in the presence of a plasmid conferring resistance to either hygromycin (pWE4; HtTA-LMX1B wt) or puromycin (pWE3; HtTA-LMX1B C95F) [40]. Antibiotic-resistant clones were isolated and tested for proper LMX1B expression in doxycycline-free medium. HtTA-LMX1B wt clone #34 and HtTA-LMX1B C95F clone #351 were chosen for this study. The tet-off porcine kidney tubuli-derived LLC-PK₁ (LtTA) cell line expressing human wild-type LMX1B protein (LtTA-LMX1B wt, clone #16) was established by stably transfecting plasmid pUHD10-3/myc-LMX1B wt into the parental LtTA-2.22 [41], as described above for the HtTA-LMX1B wt cell line. HtTA- and LtTA-derived cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM high glucose with L-Glutamine; PAA) containing 10% FBS (Gibco/Invitrogen), 200 μ g/ml Geneticin (PAA), 30 ng/ml doxycycline (SIGMA) and either 300 μ g/ml Hygromycin B (PAA) (HtTA- and LtTA-LMX1B wt cells) or 500 ng/ml Puromycin (PAA) (HtTA-LMX1B C95F cells). Medium was changed every 2 days. For induction of LMX1B expression, about 2×10^5 cells were seeded in a 6-well Petri dish and incubated in doxycycline-free medium at 37 °C, 5% CO₂ for the indicated times (up to 4 days). For single time-point experiments, cells were harvested 4 days after doxycycline removal. Stimulation with

recombinant human TNF- α (20 ng/ml; ImmunoTools) was performed for either 1 h (RT-qPCR and ChIP analyses) or 8 h (luciferase assay). For the IFN- β neutralizing antibody experiment, cells were incubated for 4 days in doxycycline-free medium in the presence of increasing amounts (0.2–1.8 μ g/ml) of anti-human IFN- β neutralizing antibody (AF814, R&D Systems). Antibody-containing medium was replaced after 2 days. Transient transfections were performed using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) in the absence of serum and antibiotics. These were added to the medium 4–5 h post-transfection, as recommended by the manufacturer.

DNA microarray analyses

Two biological replicates of non-expressing HtTA-LMX1B cells (grown in doxycycline-containing medium) and of LMX1B-expressing HtTA-LMX1B cells (grown for 4 days in doxycycline-free medium), and three kidney samples from wild-type and *Lmx1b*^{-/-} knock-out mice were processed for gene expression array analyses, using an Affymetrix (human HtTA-LMX1B cells) or an Agilent (mouse kidneys) platform. Total RNAs were isolated as described below. Quality control of the isolated RNA samples and sample processing for microarray analysis were performed at a regional German Affymetrix Service Provider and Microarray Core Facility, "KFB – Center of Excellence for Fluorescent Bioanalytics" (www.kfb-regensburg.de). For hybridization on Affymetrix Human Gene 1.0 ST Arrays, sample preparation was carried out in accordance with the Affymetrix GeneChip™ Whole Transcript (WT) Sense Target Labeling Assay Manual (Rev. 2). Three-hundred nanograms of DNase-treated total RNA were used to generate Biotin-labeled sense strand (ss) DNA. Following fragmentation and terminal labeling, ssDNA products (5.5 μ g) were hybridized to the array for 16 h at 45 °C at 60 rpm in a rotating chamber. Hybridized arrays were washed and stained in an Affymetrix Fluidics Station FS450, and the fluorescent signals were measured with an Affymetrix GeneChip™ Scanner 3000-7G. Signal intensity calculation was performed using the RMA algorithm as implemented in the Affymetrix Expression Console 1.1 software. For mouse expression arrays, DNase-treated total RNA (1 μ g) was synthesized into Cyanine 3 labeled cRNA (One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis Protocol, version 1.0.1, Agilent Technologies). Labeled cRNA (1.5 μ g) from each sample was hybridized onto Agilent Whole Mouse Genome 4 \times 44 K Expression Arrays, washed and scanned using an Agilent DNA Microarray Scanner according to manufacturer's instructions. Microarray data was extracted using Agilent Feature Extraction Software. For both human and mouse analyses, a significance analysis was performed with ArrayAssist Software (Agilent). Transcripts showing a fold change above 2-fold and a p-value below 0.05 were considered as significantly regulated. The microarray data discussed in this publication have been deposited in NCBI's Gene Expression Omnibus (GEO, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) and are accessible through GEO Series accession number GSE12008.

mRNA analysis

Total RNAs were isolated using the Nucleospin RNA II kit (Macherey-Nagel), including an on-column DNase I treatment to eliminate genomic DNA contamination, following the manufacturer's recommendations. For RT-qPCR analyses, 1 μ g RNA was used

for cDNA synthesis with the iScript cDNA synthesis kit (BioRad) following the manufacturer's protocol. Quantitative real-time PCR was performed on a RotorGene 3000 (Corbett Research) with SYBR Green I and HotStarTaq (Qiagen). Data were normalized to either human Lamin A/C mRNA (H1TA-derived cell lines) or S9 ribosomal mRNA (mouse kidney and LtTA-LMX1B wt cell line), and expressed as relative mRNA levels, as previously described [42–44]. Human-specific forward and reverse real-time PCR primers used in this study are as follows. Lamin A/C: TGCGTACGGCTCTCATCAACT and CTCGTCTCTCAACCACAGT; LMX1B: GTGTGAACGGCAGCTACGC and TCATCTCTCTCTTCCACGG; ISG15: GCTGGTGTGGACAAATGC and CCGCCCTTGTATTCTCTAC; GIP3: GCAGAAGCGGTATCGCTT and TCTTACCTGCCTCCACCCC; IL-6: CTGCGCAGCTTTAAGGAGTTC and CTGAGGTGCCCATGCTACATT; IL-8: CTGCAGCTCTGTGTGAAGTG and TCTGTGTGGCCGAGTGTG; IL-1 β : CCTGAGCTCCG-CAGTGAAA and CAGAGGT-CCAGGTCTGTGAA; IFN- β : TCAGAAGCTCTGTGGCAATT and GTTCATCTGTCTTGAGGCA; NF- κ B p50: GGCTACACCGAAGCAATTGAA and GAGTGGGCTGAGAGGTGG; NF- κ B p65: GATCTGCCGAGTGAACCGA and GATCTCATCCCCACCGAGG; IFNAR1: ACACCATTTCCGAAAGCTCAG and TTAACCATCCAAAGCCACA; κ B- α : CTGTGATCCTGAGCTCCGAGA and GGTGTGTGCAGGACTGAGTC; STAT1: CCGCACCTT-CAGTCTTTCC and ATGCAG- GGCTGTCTTTCCAC; PKD2: GGAAAG-CAGCACTAACCGAGA and GCCGTAGTCAAGATGCACA. Murine-specific forward and reverse real-time PCR primers used in this study are as follows. Podocin: GCGAGCGACCAGAGGAAG and GAGGCGAGGACAAGAAGCC; ISG15: TTGCCGAGAAGATTGGTGTG and GGTAAGACCGTCTCGAGCA; IL-6: TTGGGACTGATGCTGGTGAC and TCAGAATTGCCATTGCACAAC. The porcine-specific forward and reverse real-time PCR primers for IL-6 were GAACTCCCTCTCCA-CAAGCG and GGCAGTAGCCATCACCAGAAG respectively. Primers specific for S9 and mouse LMX1B have been already described [26,43]. Real-time PCR primers specific for additional investigated genes presented in Table 1 are available upon request.

Protein analysis

For whole cell extract analysis, cells were lysed in Brij lysis buffer as already described [42–44]. For nuclear and cytosolic lysates, cells were lysed in buffer A (10 mM HEPES [pH 7.9], 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM dithiothreitol, 10 μ g/ml leupeptin, 10 μ g/ml aprotinin, and 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride) containing 0.525% NP-40, centrifuged at 17,000 \times g for 20 s and the supernatant harvested (cytosolic fraction). The nuclei were washed once in buffer A and nuclear proteins were extracted for 1 h under vigorous shaking in buffer C (20 mM HEPES [pH 7.9], 400 mM KCl, 5 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol, 10% glycerol, 10 μ g/ml leupeptin, 10 μ g/ml aprotinin, and 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride). Nuclear membranes were eliminated by centrifugation (15 min at 17,000 \times g) and the supernatant harvested (nuclear fraction). Cell lysates were analyzed by Western blot as previously described [26,42–44]. LMX1B protein detection was performed using the formerly described mouse hybridoma supernatant 193-67 (diluted 1:10) [26]. NF- κ B p65 antibody was from Santa Cruz Biotechnology (sc-372; diluted 1:1000). Quality of the nuclear and cytosolic extraction was verified with an antibody directed against the nuclear protein HDAC1 (Upstate Biotechnology, 05-614; diluted 1:1000). Equal protein loading of whole cell extracts was verified with an anti-actin antibody (SIGMA A-2066; diluted 1:5000).

Short interfering RNA (siRNA)-mediated knock-down

NF- κ B p65 and non-specific scramble 1 (Sc1) siRNA duplexes were synthesized using the Silencer siRNA Construction Kit (Ambion #1620), as formerly described [42,44]. Absence of non-specific stimulation of the interferon response upon siRNA transfection [45] was verified by RT-qPCR (not shown). siRNA sequences for NF- κ B p65 (REL1096) and Sc1 have been described [44,46]. siRNAs were transfected using Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Briefly, 2×10^5 H1TA-LMX1B wt cells were seeded on a 6-well Petri dish in the absence or presence of doxycycline. The next day, cells were transfected with 5 nM siRNA and 2 μ l Lipofectamine 2000 following the manufacturer's recommendations. Transfection in the absence of siRNA was performed in parallel. TNF- α stimulation (20 ng/ml; ImmunoTools) was performed 1 h before harvest as indicated. Cells were harvested 72 h post-transfection (and thus 4 days post-doxycycline removal) for protein and RNA analysis. No siRNA-transfected and Sc1-transfected control cells behaved identically (not shown) and thus only the Sc1 data are shown.

Chromatin immunoprecipitation (ChIP)

ChIP assays were performed as previously described [42–44] on 3.3×10^6 H1TA- or LtTA-LMX1B wt cells grown for 4 days in the absence or presence of doxycycline, using the formerly described LMX1B-specific rabbit polyclonal antiserum BMO8 (20 μ l; [26]), the NF- κ B p65 antibody from Santa Cruz Biotechnology (30 μ l or 6 μ g; sc-372), or no antibody (protein A-sepharose; GE Healthcare) as a control. Immunoprecipitated genomic DNA was analysed by real-time PCR as previously described [42–44] and data were expressed as a percentage of input DNA. For LMX1B ChIPs, the no antibody control yielded the same background level as the +Dox control performed in the presence of antibody, and thus in some figures only the +Dox control is shown. Forward and reverse real-time PCR primers used in this study to amplify human genomic DNA are as follows. IL-6 (-1237): TGGTTTCAGCCTGAAGCCAT and ACTAG-TTGTCCTCCAGTCTCC; IL-6 (-921): CCTCCTTTGACATCCCCAAC and GTCTCCTGGAGCCCTGAAAT; IL-6 (-536): TCACAGGAGACC-CAGAACA and CCCAAGCCTGGATTATGAA; IL-6 (-151): GCCATGC-TAAAGGACGTCACA and GGGCTGATTGGAAACCTTATTAAGAT; IL-6 (+1046): TTCTGCCAAACCAGCCTTGT and GCAGTCCAGAGGTGG-TAGGGA; IL-8 (-2572): TTTTCCGCTTAAGCCATT and AAGATAAC-CATTGAGTCTCTGCATA; IL-8 (-114): CAAATAGGAAGTG-TGATGACTCAGG and TTTGCAACTGATGGCCCAT. Forward and reverse real-time PCR primers specific for porcine genomic DNA are as follows. IL-6 (-25): CCCACCTCCAAACAAGA and TCCT-GGAGGGCAGATGGA; LamA/C (+108): ATCACCCGGCTACAGGA-GAAG and GGTCCGATGTAACCGCCAAG. Numbers in brackets indicate the mean position of the generated amplicon (relative to the transcription start site or in the case of porcine LamA/C relative to the translation start site).

Luciferase reporter assays

H1TA-1 cells were transfected using Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Briefly, 1×10^5 cells were seeded on a 24-well Petri dish in doxycycline-containing medium. The next day, cells were transfected with 0.4 μ l Lipofectamine 2000 and the following plasmids: *firefly* luciferase reporter (0.2 μ g), *Renilla* luciferase reporter (15 ng), and either the LMX1B-expressing vector (0.1 μ g) or the

Table 1 – Selected ISGs and NF- κ B target genes upregulated in HtTA-LMX1B cells^a (A) and in the kidney of *Lmx1b* knock-out mice^b (B)

Gene description	Gene symbol	Accession	Reference	A. HtTA-LMX1B		B. Mouse kidney	
				Fold induction ^c Array	RT-qPCR	Fold induction ^c Array	RT-qPCR
LIM homeobox transcription factor 1, beta	<i>LMX1B</i>	NM_002316	-	31.06	273	n.a.	n.a.
Interferon-stimulated genes (ISGs)							
Dickkopf homolog 1 (<i>Xenopus laevis</i>)	<i>DKK1</i>	NM_012242	[72]	18.63	31.0	3.11	n.d.
Interferon, alpha-inducible protein 27	<i>IFI27</i>	NM_005532	[65]	15.41	n.d.	4.10	n.d.
2'-5'-oligoadenylate synthetase 2, 69/71 kDa	<i>OAS2 (OAS3)</i>	NM_002535	[72]	13.17	n.d.	4.19	n.d.
myxovirus (influenza virus) resistance 2 (mouse)	<i>MX2</i>	NM_002463	[65]	12.07	n.d.	3.65	n.d.
2'-5'-oligoadenylate synthetase 1, 40/46 kDa	<i>OAS1</i>	NM_016816	[72]	11.06	n.d.	3.16	n.d.
Interferon, alpha-inducible protein 6	<i>IF16 (G1P3)</i>	NM_022872	[65]	8.30	17.3	-	n.d.
Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1	<i>IFIT1 (IFI56)</i>	NM_001548	[64]	5.58	9.66	6.33	n.d.
Interferon induced with helicase C domain 1	<i>IFIH1 (MDA5)</i>	NM_022168	[70]	5.36	n.d.	2.86	n.d.
Interferon-induced protein 44-like	<i>IF44L</i>	NM_006820	[72]	4.53	n.d.	-	n.d.
Complement component 4 binding protein, alpha	<i>C4BPB (C4BPB)</i>	NM_000715	[65]	4.18	n.d.	-	n.d.
Signal transducer and activator of transcription 1, 91 kDa	<i>STAT1</i>	NM_007315	[85]	4.18	738	2.28	n.d.
Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2	<i>IFIT2</i>	NM_001547	[65]	4.16	n.d.	n.s.	n.d.
5'-nucleotidase, ecto	<i>NTSE (CD73)</i>	NM_002526	[71]	4.13	2.75	n.s.	1.75
Interferon-stimulated transcription factor 3, gamma 48 kDa	<i>ISGF3G (IRF9)</i>	NM_006084	[65]	4.02	4.30	2.28	1.98
Dual specificity phosphatase 6	<i>DUSP6</i>	NM_001946	[72]	3.96	n.d.	n.s.	n.d.
Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3	<i>IFIT3</i>	NM_001031683	[65]	3.95	n.d.	3.01	n.d.
CD274 molecule	<i>CD274 (B7-H1)</i>	NM_014143	[80]	3.89	n.d.	n.s.	n.d.
ISG15 ubiquitin-like modifier	<i>ISG15</i>	NM_005101	[65]	3.86	745	6.12	3.19
Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 5	<i>IFIT5 (RIS8)</i>	NM_012420	[77]	3.84	n.d.	-	n.d.
Interferon induced transmembrane protein 1 (9–27)	<i>IFITM1</i>	NM_003641	[65]	3.49	n.d.	n.s.	n.d.
Signal transducer and activator of transcription 2, 113 kDa	<i>STAT2</i>	NM_005419	[85]	3.31	6.00	2.34	n.d.
Interferon-induced protein 35	<i>IF35</i>	NM_005533	[63]	3.21	n.d.	n.s.	n.d.
Interferon, gamma-inducible protein 16	<i>IF16 (m: IF204)</i>	NM_005531	[65]	3.06	1.79	2.46	n.d.
SP100 nuclear antigen	<i>SP100</i>	NM_001080391	[67]	2.97	n.d.	n.s.	n.d.
Complement component 1, s subcomponent	<i>C1S</i>	NM_201442	[66]	2.77	n.d.	n.s.	n.d.
2'-5'-oligoadenylate synthetase-like	<i>OASL</i>	NM_003733	[72]	2.66	n.d.	6.84	n.d.
Dual specificity phosphatase 5	<i>DUSP5</i>	NM_004419	[72]	2.55	n.d.	-	n.d.
Toll-like receptor 3	<i>TLR3</i>	NM_003265	[75]	2.52	2.55	n.s.	n.d.
Interferon-induced protein 44	<i>IF44</i>	NM_006417	[72]	2.33	n.d.	n.s.	n.d.
Complement factor H	<i>CFH</i>	NM_000186	[72]	2.21	n.d.	n.s.	n.d.
Toll-like receptor 4	<i>TLR4</i>	NM_138554	[75]	2.16	2.77	n.s.	n.d.
Promyelocytic leukemia	<i>PML</i>	NM_033240	[67]	2.02	n.d.	n.s.	n.d.
Complement component 1, r subcomponent	<i>C1R</i>	NM_001733	[65]	2.01	n.d.	n.s.	1.35
Interferon regulatory factor 7	<i>IRF7</i>	NM_004031	[65]	1.68	72.0	4.93	2.34
Interferon stimulated exonuclease gene 20 kDa	<i>ISG20</i>	NM_002201	[65]	1.65	n.d.	n.s.	n.d.
NF-κB target genes							
Chemokine (C-X-C motif) ligand 10	<i>CXCL10 (IP-10)</i>	NM_001565	[78]	9.94	n.d.	2.50	n.d.
Interleukin 6 (interferon, beta 2)	<i>IL6</i>	NM_000600	[74]	8.20	12	n.s.	2.84
Chemokine (C-C motif) ligand 5	<i>CCL5 (RANTES)</i>	NM_002985	[76]	5.13	n.d.	n.s.	n.d.
Interleukin 8	<i>IL8</i>	NM_000584	[73]	5.28	51	-	n.d.
B-cell CLL/lymphoma 6 (zinc finger protein 51)	<i>BCL6</i>	NM_001706	[79]	1.88	n.d.	n.s.	n.d.
Chemokine (C-X-C motif) ligand 11	<i>CXCL11</i>	NM_005409	[82]	1.82	n.d.	n.s.	n.d.
Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	<i>NFKBIA</i>	NM_020529	[81]	1.71	1.02	n.s.	n.d.
Chemokine (C-X-C motif) ligand 2	<i>CXCL2 (MIP-2)</i>	NM_002089	[84]	1.68	n.d.	n.s.	n.d.
Chemokine (C-X-C motif) receptor 4	<i>CXCR4</i>	NM_001008540	[68]	1.66	n.d.	n.s.	n.d.
Interleukin 1, beta	<i>IL1B</i>	NM_000576	[69]	1.54	21	3.91	3.90
Interferon, beta 1	<i>IFNB1</i>	NM_002176	[51]	1.21	24	n.s.	no signal
Chemokine (C-C motif) ligand 2	<i>CCL2 (MCP-1)</i>	NM_002982	[83]	1.05	0.65	5.76	n.d.

^a Fold induction in HtTA-LMX1B cells grown for 4 days in the absence of doxycycline relative to doxycycline-treated cells.

^b Fold induction in *Lmx1b*^{-/-} relative to *Lmx1b*^{+/+} mice.

^c Fold induction ≥ 2 are in bold; - gene is absent from mouse array; n.s. not significant (array); n.d. not determined (RT-qPCR); n.a. not applicable.

corresponding empty pcDNA3 vector (0.1 μ g) to adjust to equal DNA amount. Twenty-four hours post-transfection, cells were treated with TNF- α (20 ng/ml) for 8 h, as indicated, washed with PBS and

lysed in PLB buffer (Promega). Protein concentration was determined by a Bradford-based quantification method (Roti-Quant, ROTH) and luciferase activity determined using the Dual-luciferase reporter

assay system (Promega), following the manufacturer's protocol, and the Centro XS³ LB 960 microplate luminometer (2 s delay and 10 s measurement time; Berthold Technologies). Transient transfections and luciferase assays were performed each time in duplicate. Data were captured with the Berthold MikroWin 2000 software. *Firefly* luciferase activity was normalized to *Renilla* luciferase activity, and corrected for the promoter-less Δ IL-6P-Luc reporter-mediated basal activity. Data were expressed relative to the promoter activity in unstimulated pDNA3-transfected cells (arbitrarily set to 1). Identical results were obtained in the HtTA-LMX1B wt cell line maintained in the presence of doxycycline (not shown).

Mice

Conventional *Lmx1b* knock-out mice have been described [25]. *Lmx1b*^{-/-} homozygous mice die soon after birth. Therefore, on the day of birth, offspring was killed, kidneys were removed and snap-frozen in liquid nitrogen, and genomic DNA was isolated from the head for genotyping. Total RNA was isolated from a half kidney of three wild-type homozygous and three *Lmx1b*^{-/-} homozygous mice using the Nucleospin RNA II kit (Macherey-Nagel), for RT-qPCR and microarray analyses (kidney), as described above.

Results

NF- κ B target genes and interferon-stimulated genes are upregulated in LMX1B-expressing HeLa cells

To identify putative LMX1B target genes, LMX1B was expressed in HeLa cells using a tetracycline-dependent inducible (tet-off) system (HtTA-LMX1B wt cells; [37]). Upon withdrawal of the tetracycline antibiotic doxycycline, LMX1B expression in HtTA-LMX1B wt cells was detected after ~1–2 days at the RNA level (Fig. 1A, -Dox and data not shown) and after ~3 days at the protein level (Fig. 1B, middle panel). LMX1B protein levels in HtTA-LMX1B wt cells reached a plateau after 4 days in doxycycline-free medium (Fig. 1B).

To identify LMX1B-regulated genes, a gene expression profiling study was performed on LMX1B-expressing cells grown for 4 days in the absence of doxycycline. The same cells grown in the presence of doxycycline were used as a control. Total RNAs were isolated and used to hybridize a whole human genome array. Upon LMX1B expression, two main classes of genes were induced: (i) interferon-stimulated genes (ISGs) such as *ISG15*, *GIP3*, *STAT1*, *STAT2*, *IRF7*, *IRF9*, *TLR3* or *TLR4*, and (ii) NF- κ B target genes including *IL-6*, *IL-8* and *IL-1 β* (Table 1, section A). Induction of these genes was validated by real-time RT-PCR (Fig. 1A and Table 1A).

Induction of NF- κ B targets and interferon-stimulated genes by LMX1B requires a functional LIM2 domain

Induction of ISGs and NF- κ B target genes in LMX1B-expressing HeLa cells is dependent on LMX1B protein and is not the consequence of a non-specific effect of doxycycline removal, since expression of these genes remained unaffected in the parental HtTA-1 cells grown for 4 days in the absence of doxycycline (Figs. 1B and C). Similarly, no upregulation of ISGs and NF- κ B targets was detected in an HtTA cell line expressing the unrelated protein H-ferritin [47] (data not shown), demonstrating that this gene expression pattern is not an

artefact of protein overexpression. Moreover, induction of these genes by LMX1B is dependent on a functional LIM2 domain, since ISGs and NF- κ B targets were no longer induced upon doxycycline withdrawal in a HeLa tet-off cell line expressing comparable levels of the LMX1B C95F mutant protein (Figs. 1B and C, HtTA-LMX1B C95F). This single cysteine to phenylalanine mutation within the LIM2 domain of LMX1B was identified in a patient with nail-patella syndrome [28,48] and is expected to disrupt its zinc finger structure [49] and thus its functionality. These data hence demonstrate that LMX1B specifically upregulates expression of ISGs and NF- κ B target genes in HeLa cells, and that this activating effect requires a functional LIM protein interaction domain.

IFN- β expression is induced by LMX1B and is responsible for induction of interferon-stimulated genes

Interestingly, several well-known NF- κ B target genes such as *NFKBIA* (encoding the NF- κ B inhibitor κ B- α), *CCL2* (MCP-1), or the NF- κ B subunits *p50* and *p65*, were not induced following LMX1B expression (Fig. 1A, Table 1A, and data not shown), suggesting that LMX1B regulates expression of a subset of NF- κ B target genes. By contrast, multiple ISGs were induced, suggesting a more global effect. This prompted us to investigate whether one of the interferon genes was upregulated in LMX1B-expressing HeLa cells. We found that expression of *IFN- β* (Fig. 1A and Table 1A) but not of *IFN- α* or *IFN- γ* (not shown) was induced upon LMX1B expression. This observation hence suggests that induction of *IFN- β* , possibly as a NF- κ B target gene [50,51], is responsible for the downstream induction of ISGs. In support to this idea, the IFN- β receptor chains *IFNAR1* and *IFNAR2* [52] were expressed at the RNA level in HtTA-LMX1B wt cells (Fig. 1A and data not shown).

To experimentally explore whether IFN- β induction is accountable for ISG upregulation, expression of ISGs and NF- κ B target genes was monitored in HtTA-LMX1B wt cells grown for 4 days in doxycycline-free medium in the absence or presence of increasing amounts (0.2–1.8 μ g/ml) of IFN- β neutralizing antibodies. The specific blockade of the IFN- β signalling pathway prevented induction of the ISGs by LMX1B (Fig. 2A, *GIP3*, *STAT1*) without affecting LMX1B-dependent induction of the NF- κ B target genes (Fig. 2A, *IL-6*). Interestingly, induction of the *IFN- β* gene itself was partially inhibited by the presence of IFN- β neutralizing antibodies in the medium (Fig. 2A), in agreement with the observation that IFN- β regulates its own expression [52], and confirming that it is also regulated independently of the IFN- β pathway, likely as a NF- κ B target. These results therefore demonstrate that (i) the LMX1B-dependent induction of NF- κ B target genes (*IL-6*, *IL-8*, *IL-1 β* , *IFN- β*) occurs upstream of the ISG induction, (ii) the NF- κ B target *IFN- β* is responsible for the induction of ISGs as a secondary response, and (iii) IFN- β itself regulates its own expression, generating an auto-amplification loop (Fig. 2B).

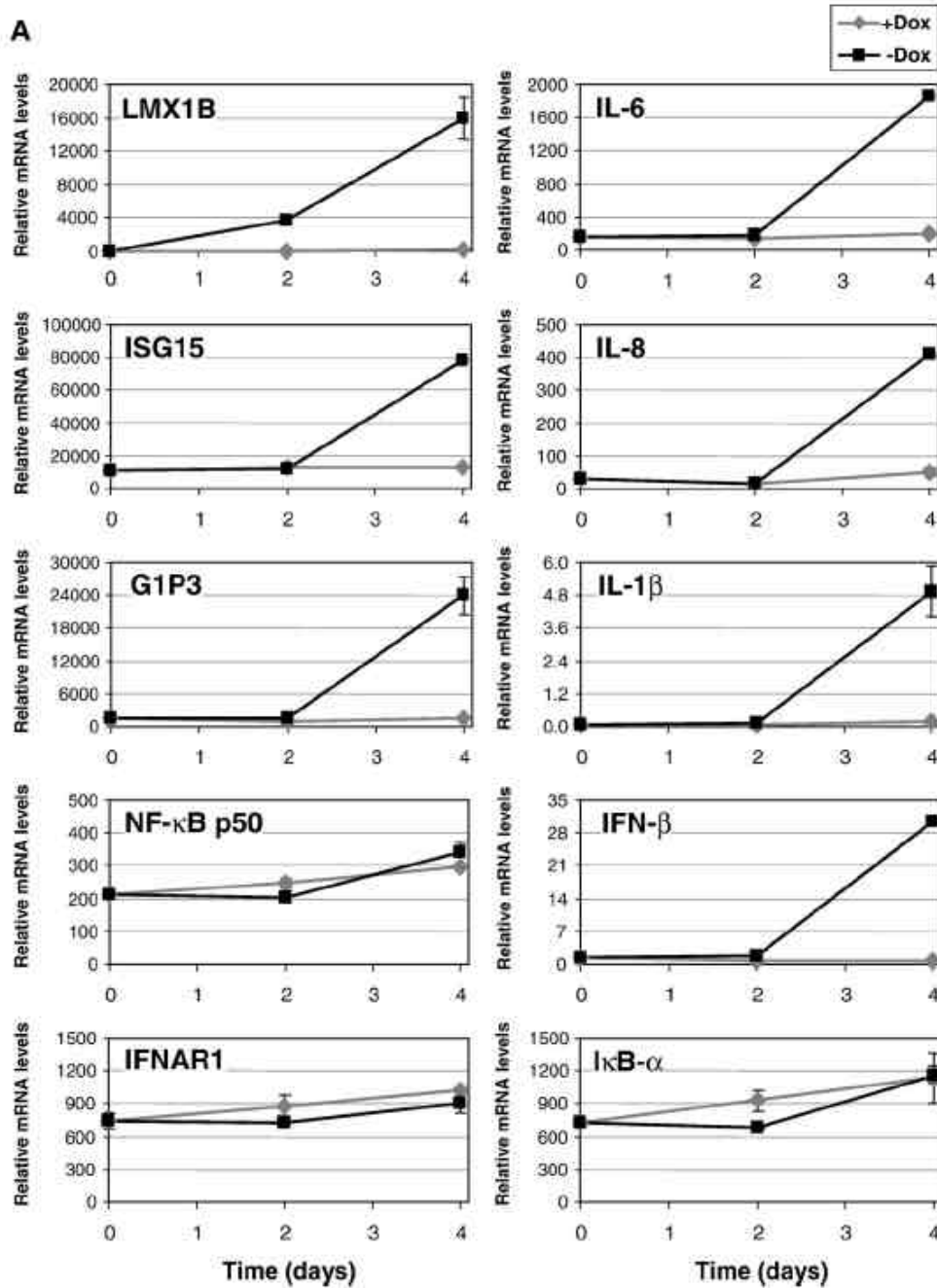
LMX1B directly regulates NF- κ B target gene expression, in cooperation with p50/p65 NF- κ B

Our finding that induction of NF- κ B target genes occurs upstream of the IFN pathway in LMX1B-expressing cells raises the possibility of a direct transcriptional regulation by LMX1B. NF- κ B target genes are normally induced in response to numerous extracellular stimuli by the NF- κ B family of transcription factors. This family consists of 5 members: p50, p52, p65 (RelA), RelB and c-Rel, that regulate

transcription as homo- and heterodimers. Their activity is controlled by a family of inhibitory κ B proteins which control their nuclear translocation and DNA binding activity to specific κ B sites [5'-GG(A/G)N(A/T)(C/T)(C/T)CC-3'] (reviewed in [53]). Two major signalling pathways have been characterized, the classical (or canonical) NF- κ B signalling pathway, and the alternative (or non-canonical) NF- κ B pathway. The classical pathway is induced mainly in response to pathogens and pro-inflammatory cytokines such as TNF- α or IL-1 β . It results in the activation and nuclear translocation of p50/p65 NF- κ B dimers, and in the downstream transcription of genes encoding chemokines and pro-inflammatory cytokines (IL-6,

IL-8, IL-1 β , ...) (reviewed in [54]). By contrast, the alternative pathway is induced by a distinct set of cytokines (LT β R, CD40L and BAFF) and results in the activation of p52/RelB NF- κ B heterodimers, which regulate transcription of genes involved in development and maintenance of secondary lymphoid organs, and in B cell maturation (reviewed in [54]). The specific induction of various pro-inflammatory cytokines and chemokines by LMX1B (Table 1 and Fig. 1) strongly suggests that these genes are induced through the p50/p65-dependent classical NF- κ B pathway [46,55,56].

We therefore explored the possible implication of p50/p65 NF- κ B in the activation of NF- κ B target genes by LMX1B. We first



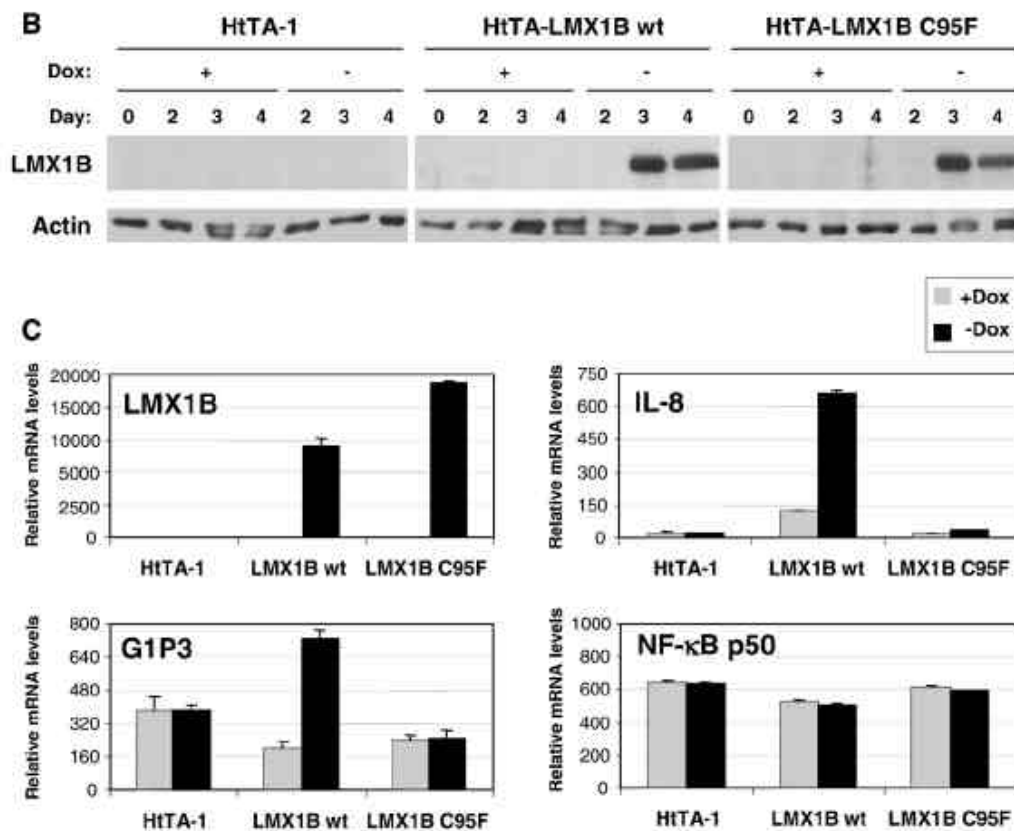


Fig. 1 – NF- κ B target genes and interferon-stimulated genes (ISGs) are upregulated in LMX1B-expressing HeLa cells. (A) RNAs were isolated from HtTA-LMX1B wt cells grown for the indicated times in the presence (+Dox) or absence (-Dox) of doxycycline, and analyzed by RT-qPCR using primers specific for NF- κ B target genes (IL-6, IL-8, IL-1 β , IFN- β , NF- κ B p50 and κ B- α), interferon-stimulated genes (ISG15 and G1P3), and the IFN- β receptor gene (IFNAR1) as a control. (B) Equal amounts of whole cell protein lysates from parental HtTA-1, HtTA-LMX1B wt and HtTA-LMX1B C95F cell lines grown in the presence or absence of doxycycline for the indicated times, were subjected to Western blot analysis using an antibody directed against either LMX1B or actin as a loading control. (C) Induction of NF- κ B targets and ISGs is dependent on a functional LMX1B protein. HtTA-1, HtTA-LMX1B wt and HtTA-LMX1B C95F cells were grown for 4 days in the presence (+Dox) or absence (-Dox) of doxycycline and mRNA levels were analyzed by RT-qPCR, as described above.

determined whether LMX1B is acting directly at the nuclear level, or indirectly for instance by upregulating a component of the cytosolic activation pathway, leading to p50/p65 nuclear translocation. Nuclear and cytosolic fractions from non-induced and 4 day-induced HtTA-LMX1B wt cells were analyzed by Western blot using NF- κ B p65-specific antibodies. While nuclear translocation of NF- κ B p65 could be readily detected upon stimulation of non-induced cells by TNF- α , a classical activator of the NF- κ B pathway [57] (Fig. 3, compare lane 4 to lane 3), nuclear p65 protein levels remained unchanged upon LMX1B expression (Fig. 3, compare lane 8 to lane 7). Similar results were obtained at earlier time points of LMX1B induction (1 to 3 days of doxycycline removal; not shown). This observation argues against an indirect activation of the upstream NF- κ B signalling pathway by LMX1B, and rather suggests a regulation at the nuclear level.

We next addressed whether regulation of NF- κ B target gene expression by LMX1B is dependent on NF- κ B itself. Expression of the p65 subunit of NF- κ B was knocked down using RNA

interference. Seventy-two hours after transfection of p65-specific or non-specific (Sc1) siRNAs into HtTA-LMX1B wt cells, a maximum reduction in p65 protein levels was achieved (Fig. 4A), corresponding to a ~70% reduction at the RNA level (Fig. 4B). In both LMX1B-expressing cells and TNF- α -stimulated cells as a control, NF- κ B p65 knock-down resulted in a ~50% decrease in NF- κ B target gene induction (Fig. 4B, IL-6, IL-8 and IFN- β). This effect was specific for NF- κ B target genes, since mRNA levels of an unrelated gene remained unaffected upon NF- κ B p65 siRNA transfection (Fig. 4B, PKD2). These results therefore demonstrate that induction of NF- κ B target genes by LMX1B requires a functional p50/p65 NF- κ B transcription factor. It also suggests a possible functional interaction between LMX1B and NF- κ B.

To address whether LMX1B functionally cooperates with NF- κ B, the stimulating effect of TNF- α on expression of NF- κ B target genes was evaluated in HtTA-LMX1B wt cells expressing LMX1B. TNF- α stimulation of LMX1B-expressing cells resulted in a synergistic increase in mRNA levels of the NF- κ B target genes regulated by

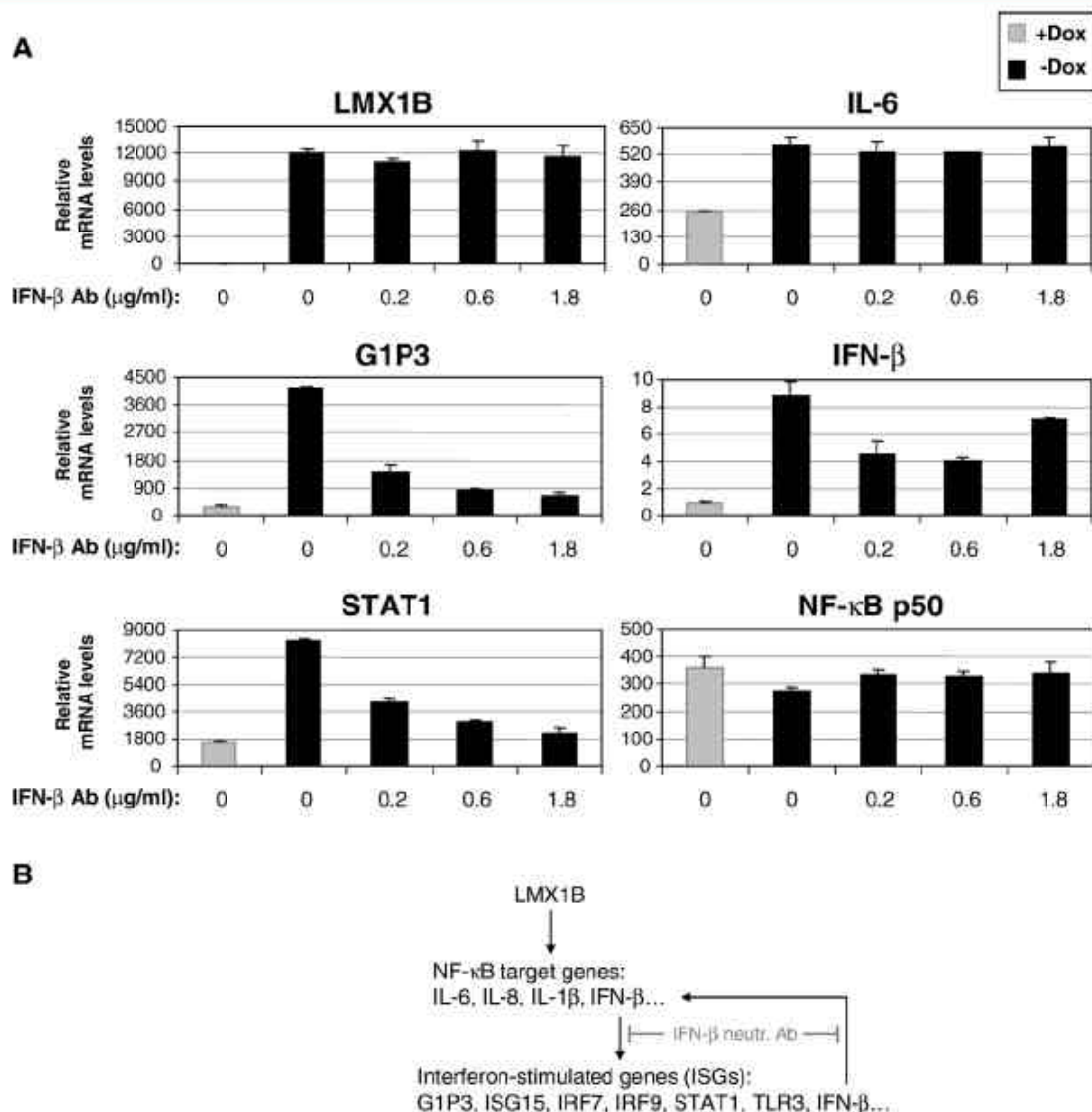


Fig. 2 – Interferon-stimulated genes are induced in response to IFN-β. (A) Doxycycline-treated (+Dox) and untreated (-Dox) HcTA-LMX1B wt cells were grown for 4 days in the presence or absence of increasing amounts of IFN-β neutralizing antibodies (IFN-β Ab), and mRNA levels were analyzed by RT-qPCR, as described in legend to Fig. 1. (B) Model of regulation of NF-κB target genes and interferon-stimulated genes (ISGs) by LMX1B in HcTA-LMX1B wt cells. LMX1B induces expression of several NF-κB targets, including IFN-β which in turn induces expression of ISGs, as well as its own expression. IFN-β neutralizing antibodies prevent both LMX1B-mediated ISG induction and IFN-β-mediated auto-amplification loop.

LMX1B (Fig. 4C, *IL-6*, *IL-8*, *IL-1β* and *INF-β*, compare +Dox to -Dox). Importantly, this cooperative effect was not observed upon TNF-α stimulation of a NF-κB target not regulated by LMX1B (Fig. 4C, *NF-κB p50*; see also Fig. 1 and 2) and is thus LMX1B-dependent. Altogether, these data demonstrate that LMX1B functionally cooperates with NF-κB to activate expression of a subset of NF-κB target genes. No physical interaction between LMX1B and NF-κB proteins could be however evidenced in co-immunoprecipitation assays (data not shown), suggesting that functional cooperation does not take place at the protein level.

LMX1B binds to the promoter of the NF-κB target genes *IL-6* and *IL-8* in vivo

To investigate whether LMX1B/NF-κB functional interaction takes place at the chromatin level, we examined the ability of LMX1B and NF-κB to bind to the NF-κB target genes *in vivo* using chromatin immunoprecipitation (ChIP). Promoter sequence analysis of the investigated NF-κB target genes revealed the presence of one or more consensus FLAT (5'-TAAT-3' core-containing) motif(s) in the vicinity of the characterized κB sites within the proximal promoters of the

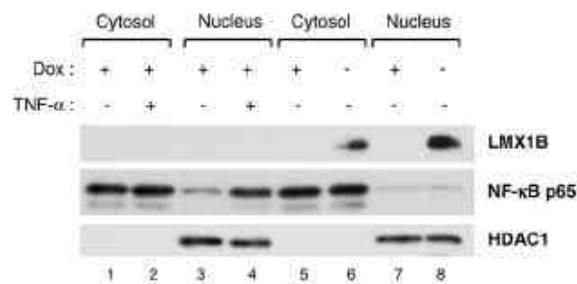


Fig. 3 – LMX1B does not affect NF- κ B nuclear translocation. HtTA-LMX1B wt cells were grown for 4 days in the presence or absence of doxycycline (Dox), or stimulated with TNF- α for 1 h to activate the NF- κ B signalling pathway as a control. Nuclear and cytosolic lysates were subjected to Western blot analysis using antibodies specific for LMX1B, NF- κ B p65 and the nuclear protein HDAC1 to check for nuclear and cytosolic extraction integrity. Comparable results were obtained after 1, 2 or 3 days of doxycycline removal (not shown).

human *IL-6* and *IL-8* genes (Fig. 5A). In addition, the FLAT element within the *IL-6* promoter was conserved in sequence and position between several species (Fig. 5A), suggesting functional conservation. ChIP assays were first performed using LMX1B-specific antibodies on HtTA-LMX1B wt cells grown for 4 days in the absence or presence of doxycycline. Immunoprecipitated genomic DNA was analyzed by real-time PCR using primers amplifying the proximal promoter region of the human *IL-6* and *IL-8* genes that contains the conserved FLAT element(s) along with the κ B site (Figs. 5B and C, positions -151 and -114 relative to the transcription start site respectively), as well as upstream and downstream control primers (Figs. 5B and C). LMX1B was strongly and exclusively associated with the proximal region of the *IL-6* (Fig. 5B, position -151) and *IL-8* (Fig. 5C, position -114) promoters. This association was specific since no significant signal was detected in doxycycline-treated cells (Figs. 5B and C, +Dox) and in ChIP assays performed in the absence of LMX1B antibodies (Fig. 5C, No Ab). In addition, LMX1B overexpression did not lead to ubiquitous FLAT element binding *in vivo*, since no signal was detected within the second intron of the *IL-6* gene that contains two adjacent consensus FLAT elements (Fig. 5B, position +1046). These data thus demonstrate that LMX1B is specifically recruited to the *IL-6* and *IL-8* proximal promoters, possibly through binding to the FLAT element flanking the κ B site.

We next monitored NF- κ B association with the *IL-6* and *IL-8* promoters by ChIP using antibodies directed against the p65 subunit of NF- κ B (Fig. 5C). A control ChIP experiment was performed on TNF- α -stimulated HtTA-LMX1B wt cells in the absence of LMX1B (+Dox), and revealed the expected recruitment of NF- κ B to its binding site (Fig. 5D, upper graph, position -114). NF- κ B p65 binding was specific since it was neither detected over the upstream control region (Fig. 5D, upper graph, position -2572), nor in the no-antibody control ChIP (Fig. 5D, upper graph, No Ab). We then asked whether LMX1B recruitment in HtTA-LMX1B wt cells grown in the absence of doxycycline is accompanied by an increase in NF- κ B binding, possibly explaining the requirement for NF- κ B p65 for LMX1B-mediated transactivation and the cooperative effect of both transcription factors on target gene expression described above. Upon doxycycline withdrawal, a slight increase in NF- κ B

binding was specifically detected on its recognition site (Fig. 5D, lower panel, -Dox, compare position -114 to -2572). Such increase was not detected in the no-antibody control ChIP (Fig. 5D, lower panel, No Ab). This enhanced NF- κ B p65 DNA binding was however moderate, being approximately 10-fold below the binding detected upon TNF- α stimulation (Fig. 5D, upper graph). Although a weaker signal could be due to a reduced antibody accessibility in the ChIP assay in LMX1B-expressing cells compared to TNF- α -stimulated cells, it most likely reflects the low level of nuclear p65 proteins in LMX1B-expressing cells (Fig. 3, lane 8) [58]. Yet, NF- κ B recruitment tightly correlated with LMX1B association to the same promoter region (Fig. 5C), hence suggesting a LMX1B-dependent DNA association. Similar results were obtained on the human *IL-6* promoter (data not shown). Together, these ChIP data demonstrate that LMX1B binds to the proximal promoter region of human *IL-6* and *IL-8* *in vivo*, and that LMX1B recruitment results in a slight increase in NF- κ B p65 binding to its nearby recognition site.

The conserved FLAT and κ B elements within the *IL-6* proximal promoter are both involved in LMX1B-mediated transcription

Functional assays were then carried out to determine whether LMX1B and NF- κ B DNA binding to the *IL-6* promoter *in vivo* is required for transcriptional gene activation. Luciferase reporter assays were performed using reporter constructs bearing the human *IL-6* promoter (-1168/+11; [38]), either wild-type or mutated within the proximal FLAT element (-146) and/or κ B site (-74) (Fig. 6A). Transcriptional effect of LMX1B and NF- κ B was evaluated in HtTA-1 cells upon co-transfection of a LMX1B expression plasmid and TNF- α stimulation respectively.

In the absence of co-transfected LMX1B, TNF- α stimulation of HtTA-1 cells resulted in a 4-fold activation of the wild-type *IL-6* promoter (Fig. 6B, IL-6P.wt, -LMX1B, black bar), in accordance with published data [38]. Mutation of the FLAT element did not affect NF- κ B-mediated transcriptional activation of the *IL-6* promoter (Fig. 6B, IL-6P.FLAT, -LMX1B, black bar). By contrast and as expected [38], mutation of the κ B site abolished NF- κ B-mediated transcription (Fig. 6B, IL-6P.NF- κ B and IL-6P.NF- κ B.FLAT, -LMX1B, black bars).

LMX1B co-transfection resulted in a 3-fold activation of the wild-type *IL-6* promoter (Fig. 6B, IL-6P.wt, +LMX1B, grey bar), demonstrating the ability of LMX1B to activate transcription from the *IL-6* promoter. By contrast, the control (NF- κ B)₄-luciferase reporter containing four κ B sites in tandem fused to a minimal promoter, but no FLAT motif, was not stimulated by LMX1B (Fig. 6B, (NF- κ B)₄, +LMX1B, grey bar). Mutation of the FLAT element strongly inhibited activation of the *IL-6* promoter by LMX1B (Fig. 6B, IL-6P.FLAT, +LMX1B, grey bar), indicating that transactivation of the *IL-6* promoter by LMX1B is mainly mediated by the proximal FLAT element. Mutation of the κ B site alone did not influence activation by LMX1B (Fig. 6B, IL-6P.NF- κ B, +LMX1B, grey bar). However, mutation of both FLAT and κ B elements completely abolished LMX1B-mediated transactivation (Fig. 6B, IL-6P.FLAT.NF- κ B, +LMX1B, grey bar), suggesting that the κ B site might play some minor role in LMX1B-mediated transactivation.

TNF- α stimulation in the presence of LMX1B resulted in a slightly enhanced transactivation of the wild-type *IL-6* promoter (Fig. 6B, IL-6P.wt, +LMX1B, black bar). In contrast to the cooperative effect observed *in vivo* in the context of chromatin (Fig. 4) however, this positive effect was only additive, hence revealing that regulatory

components are missing in the reporter assay to achieve cooperative transactivation. As expected, this additive effect was dependent on LMX1B binding to its FLAT element since it was lost upon mutation of the FLAT motif (Fig. 6B, IL-6P:FLAT, +LMX1B, black bar).

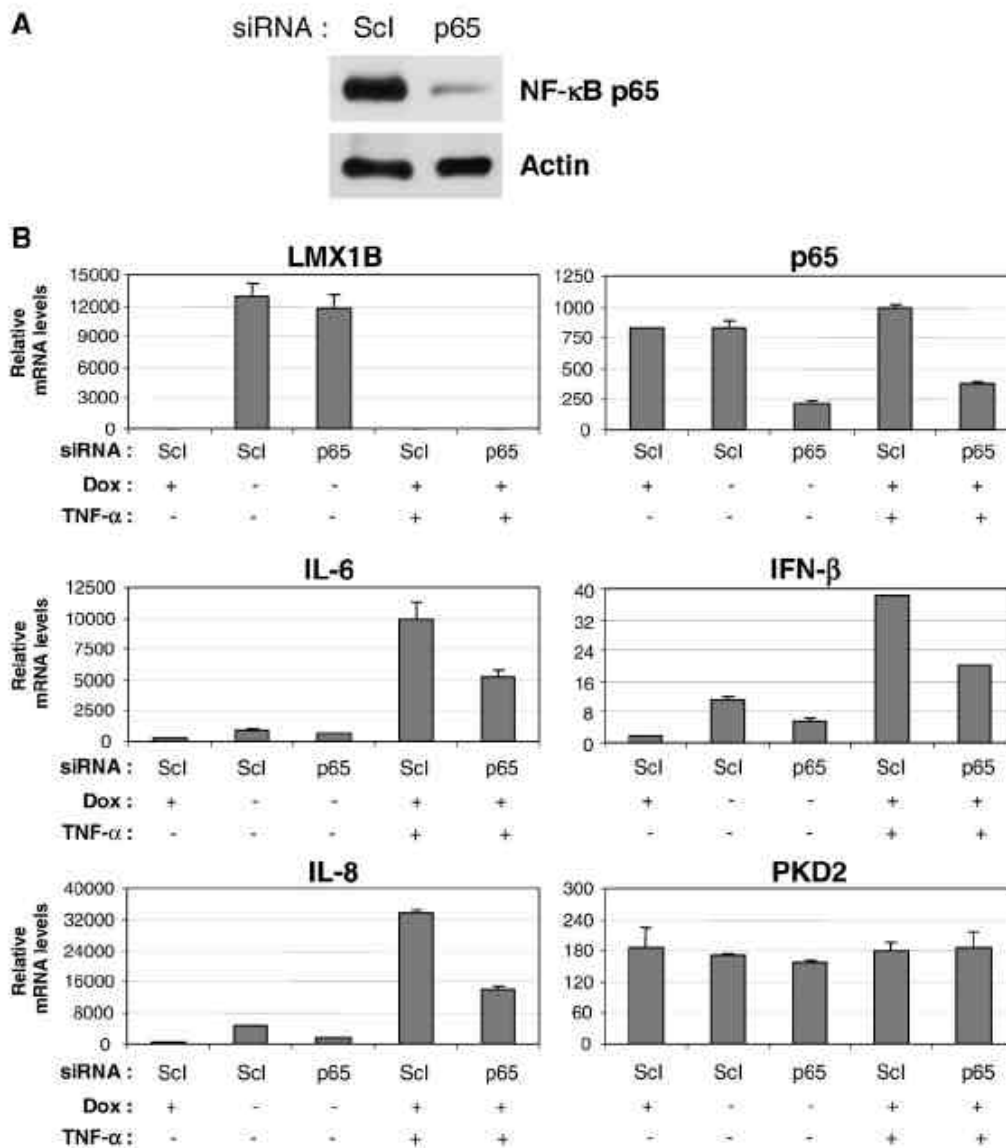
Intriguingly, mutation of the κ B motif not only inhibited NF- κ B-mediated transcription, it also impaired LMX1B-mediated transactivation of the IL-6 promoter (Fig. 6B, IL-6P:NF- κ B, +LMX1B, black bar). This observation suggests that transactivation by LMX1B involves a cofactor also required for NF- κ B-mediated transcription. This common cofactor would become limiting following the massive nuclear translocation of NF- κ B upon TNF- α stimulation, while hindered from binding to DNA (mutated κ B site). If correct, this proposition would predict that reciprocally LMX1B overexpression would impair NF- κ B-mediated transactivation of a reporter non-responsive to LMX1B. Indeed, NF- κ B-mediated transactivation of the (NF- κ B)₄-luciferase reporter was significantly inhibited upon LMX1B overexpression (Fig. 6B, (NF- κ B)₄,

+LMX1B, black bar), hence supporting the idea that both LMX1B and NF- κ B recruit a common coactivator required for their activity.

Altogether, these luciferase reporter assays demonstrate that LMX1B can activate transcription from the IL-6 promoter mainly through the proximal FLAT element flanking the κ B site. These assays also indicate the possible recruitment of a common coactivator by LMX1B and NF- κ B, and suggest that chromatin components are likely involved in the functional cooperation observed between both transcription factors *in vivo*.

Expression of NF- κ B target genes and interferon-stimulated genes is upregulated in the kidney of Lmx1b^{-/-} knock-out mice

We showed that in HeLa cells LMX1B directly activates expression of a subset of NF- κ B target genes, leading to the indirect upregulation of multiple interferon-stimulated genes (ISGs). We also showed that



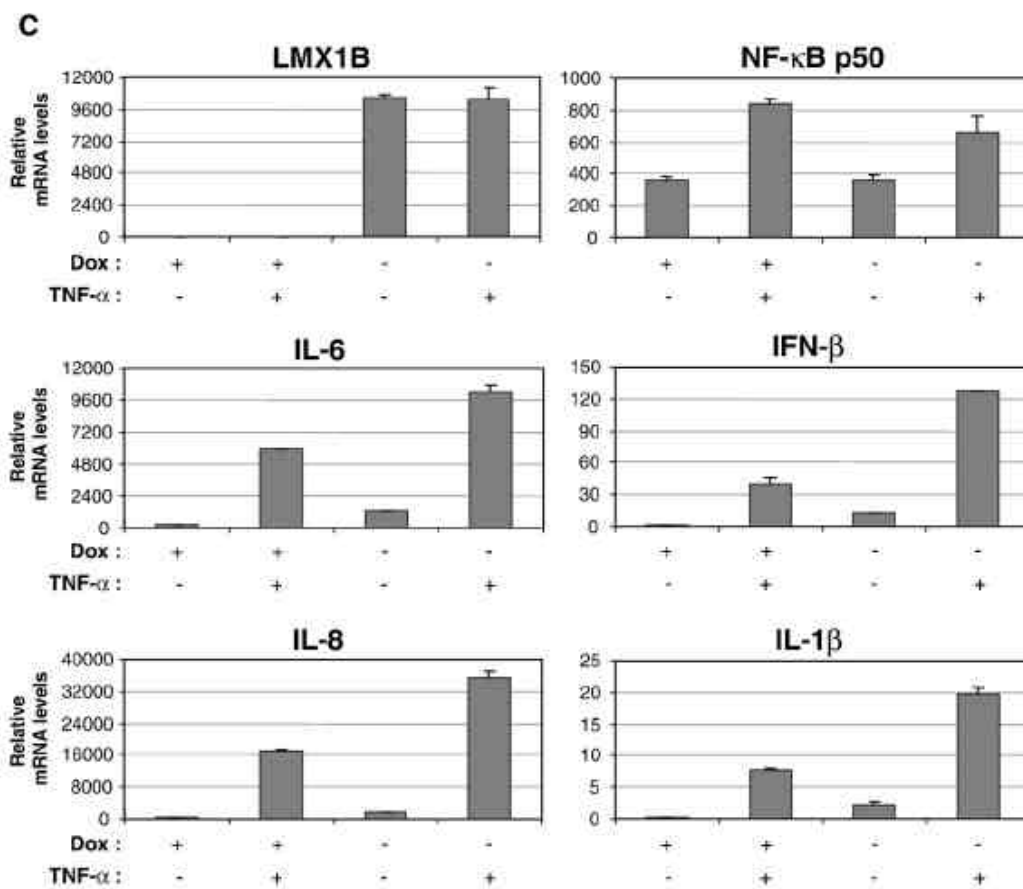


Fig. 4 – NF- κ B is required and cooperates with LMX1B to regulate expression of NF- κ B target genes. (A, B) LMX1B-mediated induction of NF- κ B targets is dependent on NF- κ B. HcTA-LMX1B wt cells grown in the presence or absence of doxycycline (Dox) were transfected at day 1 with either a non-specific (Scl) or a NF- κ B p65-specific siRNA. Seventy-two hours later, cells were stimulated with TNF- α for 1 h or left unstimulated as indicated, and harvested for Western blot (A) or RT-qPCR (B) analysis. Non-transfected cells were processed in parallel and provided identical results as the Scl-transfected cells (not shown). (A) Whole cell lysates from doxycycline-treated transfected cells were immunoblotted against NF- κ B p65, as well as actin to control for equal protein loading. (B) RT-qPCR was performed using primers specific for NF- κ B target genes (IL-6, IL-8, IFN- β) and an unrelated control gene (PKD2). NF- κ B p65 mRNA levels were reduced by ~70% upon siRNA transfection (p65) while LMX1B mRNA levels remained unaffected (LMX1B). (C) LMX1B and NF- κ B functionally cooperate to induce NF- κ B target genes. HcTA-LMX1B wt cells were grown for 4 days in the presence or absence of doxycycline (Dox), and stimulated with TNF- α for 1 h to activate NF- κ B transcriptional activity or left unstimulated. RNAs were isolated and analyzed by RT-qPCR as described for Fig. 1, using primers specific for LMX1B as a control, and for LMX1B-dependent (IL-6, IL-8, IL-1 β and IFN- β) and -independent (NF- κ B p50) NF- κ B target genes.

activation of the NF- κ B target *IL-6* by LMX1B can be reproduced in a reporter assay in these cells. Since HeLa cells do not normally express LMX1B though, it raises the question of the biological significance of these observations. To address that question, *in vivo* expression studies were undertaken using conventional *Lmx1b* knock-out mice [25]. These mice display podocyte-associated nephropathy, leading to severe proteinuria and death soon after birth [13,24,25]. Total RNAs were isolated from kidneys of three newborn wild-type and *Lmx1b*^{-/-} knock-out mice and analysed by RT-qPCR and gene expression profiling array. In the kidney of *Lmx1b*^{-/-} knock-out mice, *Lmx1b* mRNAs were undetectable and expression of the putative LMX1B target gene *podocin* was abolished (Fig. 7A), as previously described [24,25]. Interestingly, gene expression profiling

revealed that a significant number of the ISGs and NF- κ B targets identified in HeLa cells were differentially expressed in the kidney of *Lmx1b*^{-/-} knock-out mice (Table 1, section B), supporting the biological relevance of our observations. Unexpectedly however, their expression was upregulated in the knock-out mice (Table 1B). Several of them, including *Isg15*, *Irf-7*, *Irf-9*, *IL-6* and *IL-1 β* were validated by real-time RT-PCR (Fig. 7A and Table 1B). These data suggest that the physiological function of LMX1B in the kidney is to repress expression of NF- κ B target genes and ISGs. A similar pattern was observed in other mouse tissues expressing LMX1B such as eye and limb (data not shown). This is in apparent contradiction with the data obtained in HcTA-LMX1B cells, in which expression of the same genes was induced by LMX1B (Fig. 1 and Table 1A). This is also in

apparent contradiction with our luciferase reporter assays demonstrating that LMX1B can activate transcription from the *IL-6* promoter (Fig. 6). Alternatively, these observations raise the

possibility that cell- and tissue-specific cofactors are implicated in transcriptional regulation by LMX1B, dictating either activation or inhibition of the target gene.

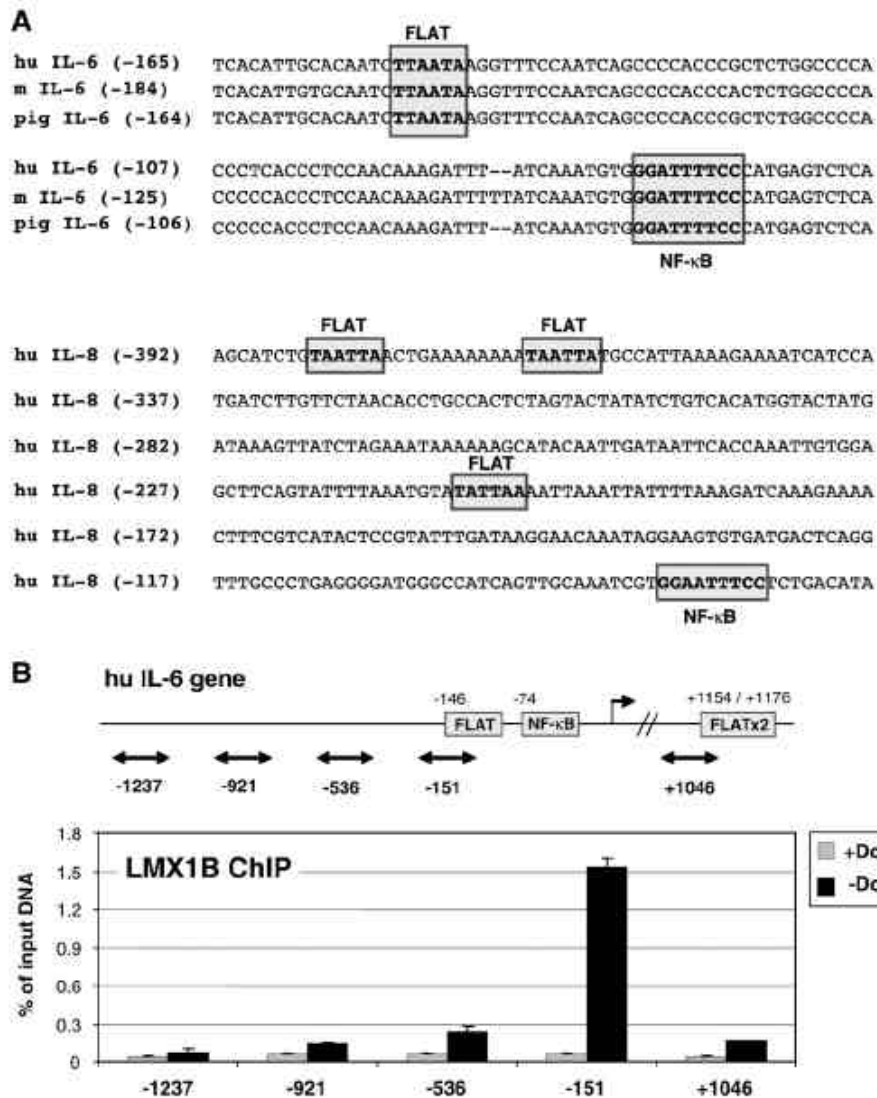
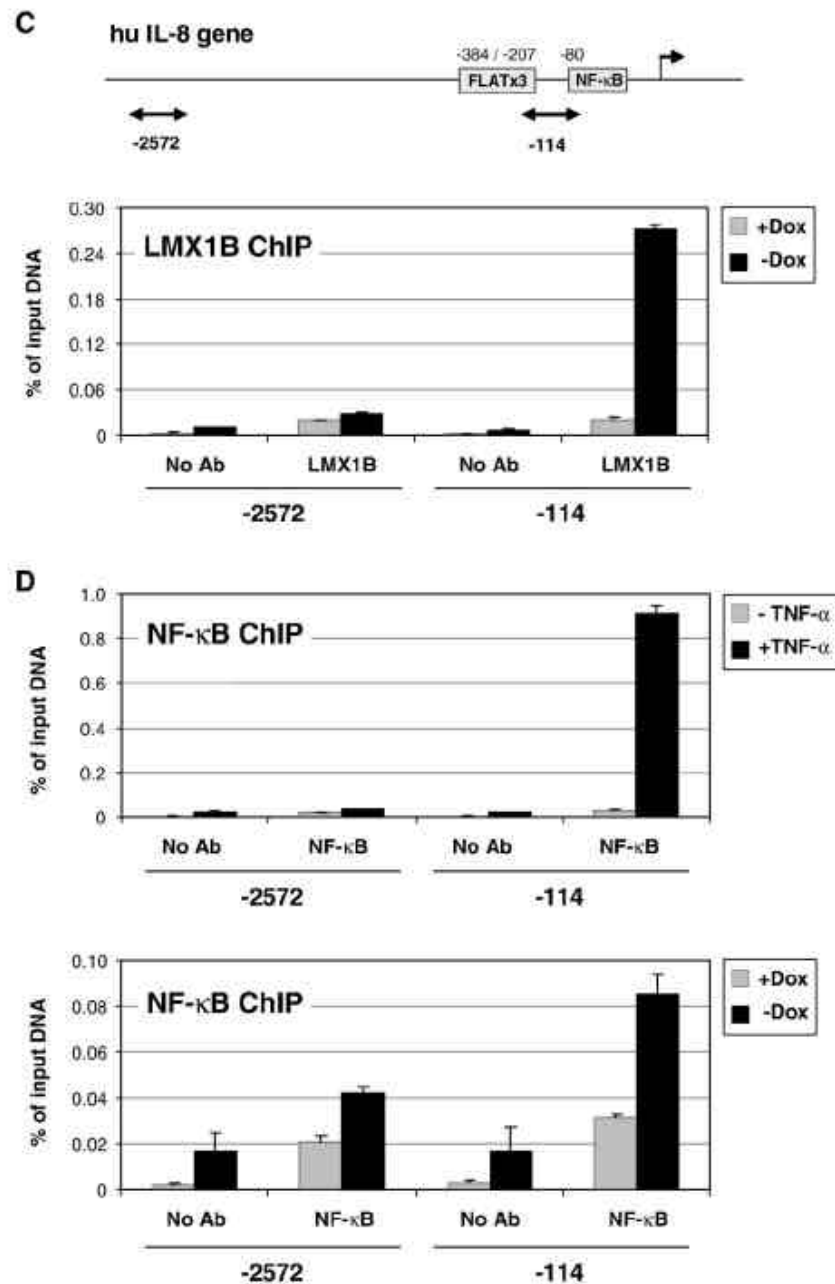


Fig. 5 – LMX1B is recruited to the human *IL-6* and *IL-8* promoters *in vivo*. (A) Nucleotide sequences of the human *IL-6* and *IL-8* promoters showing the conserved FLAT-F motif (TTAATA) within the *IL-6* promoter of several species (position -146 relative to the transcription start site of the human promoter), and the presence of 3 FLAT elements (TAATTA and TATTAA, between positions -384 and -207 relative to the transcription start site) within the human *IL-8* promoter. In both genes, the FLAT motifs are located in the vicinity of the identified κB site (positions -74 and -80 respectively relative to the transcription start site). (B–C) LMX1B chromatin immunoprecipitation (ChIP) was performed from doxycycline-treated (+Dox) and untreated (-Dox) HtTA-LMX1B wt cells as described in Materials and methods. Immunoprecipitated genomic DNA was analyzed by real-time PCR using primers specific for the human *IL-6* (B) and *IL-8* (C) genes. No-antibody control ChIPs yielded similar background signals as LMX1B ChIPs from doxycycline-treated cells, and are only shown in panel C for the sake of clarity. Upper panel shows a schematic representation of the gene, together with the FLAT and κB motifs (grey boxes) and the position (relative to the transcription start site) of the investigated amplicons. (D) Association of nuclear NF-κB with DNA is increased in LMX1B-expressing cells. NF-κB p65 ChIP was performed from unstimulated and TNF-α-stimulated HtTA-LMX1B wt cells grown in the presence of doxycycline as a control experiment (upper graph), and in doxycycline-treated (+Dox) and untreated (-Dox) HtTA-LMX1B wt cells (lower graph). Genomic DNA was analyzed using primers specific for the human *IL-8* promoter. The LMX1B and NF-κB ChIPs shown in panels (C) and (D) were performed from the same cross-linked cells for direct comparison.



LMX1B recruitment to the IL-6 promoter in LLC-PK₁ cells is not sufficient to mediate transcriptional activation *in vivo*

To explore the cell-specific regulation of LMX1B activity, expression of NF-κB target genes was investigated in a distinct cellular context. LMX1B was expressed in the porcine kidney tubuli-derived cell line LLC-PK₁ using the same tet-off inducible system as for HeLa cells (HrTA-LMX1B), generating the so-called LrTA-LMX1B cell line (Fig. 7B). Similarly to HeLa cells, LLC-PK₁ cells do not express endogenous LMX1B. Remarkably, expression of IL-6 and of none of the investigated NF-κB target genes and ISGs was regulated by LMX1B

in LLC-PK₁ cells (Fig. 7B and data not shown). Furthermore, a microarray analysis comparable to the one undertaken in HeLa cells (Table 1) revealed that few genes were differentially regulated by LMX1B in LLC-PK₁ cells (not shown). To exclude the possibility that absence of gene regulation was the consequence of a defect in LMX1B recruitment to its target genes in these cells, chromatin immunoprecipitation was performed and revealed that LMX1B was efficiently recruited to the IL-6 proximal promoter in LLC-PK₁ cells (Fig. 7C). These data therefore indicate that LMX1B binding to DNA is not sufficient to regulate expression of downstream target genes *in vivo*. They also imply that other factors are necessary, thus supporting our

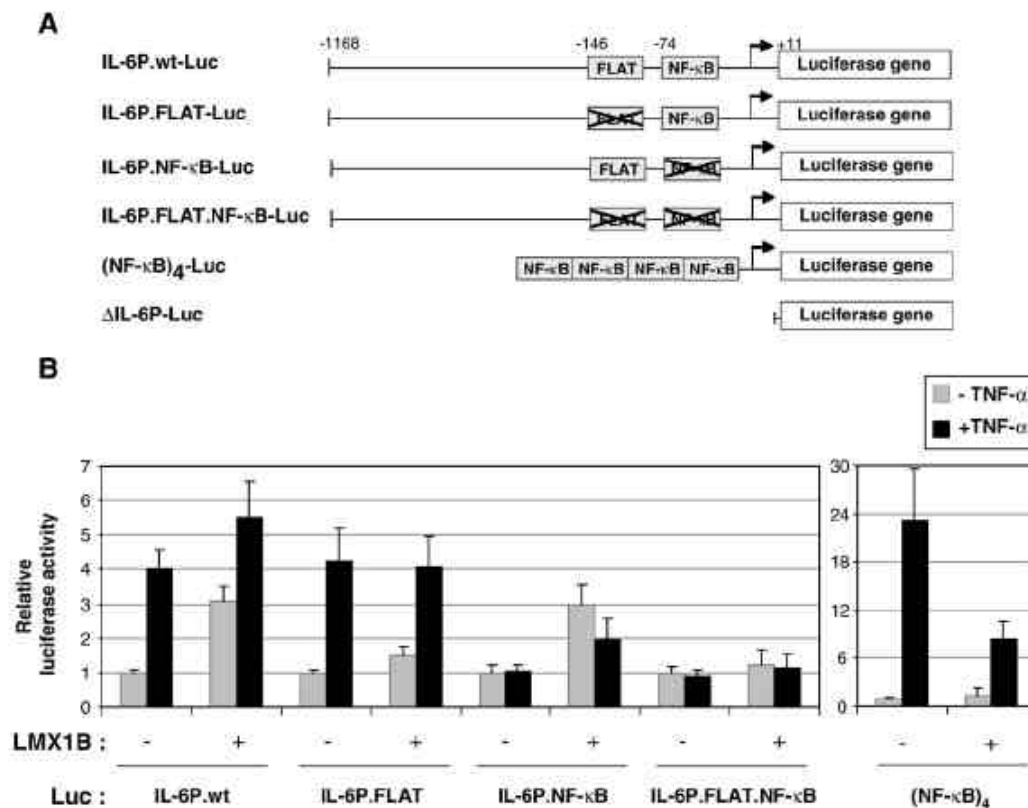


Fig. 6 – The FLAT and NF-κB recognition motifs are involved in transcriptional regulation of the human *IL-6* promoter by LMX1B and NF-κB. (A) Schematic representation of the *Firefly* luciferase reporter constructs used in this study. The proximal FLAT and κB motifs within the human *IL-6* promoter (grey boxes) were mutated (crossed grey box) individually or together (IL-6P-Luc derivatives), and transfected in parallel to control *Firefly* luciferase reporters containing either four κB sites fused to a minimal promoter [(NF-κB)₄-Luc] or a total deletion of the human *IL-6* promoter (ΔIL-6P-Luc). (B) HttA-1 cells were co-transfected with the indicated *Firefly* luciferase reporter plasmid (Luc) and a LMX1B-expression vector (or an equal amount of the corresponding empty control vector), as described in Materials and methods. Twenty-four hours later, cells were stimulated with TNF-α for 8 h (black bars) or left unstimulated (grey bars). Luciferase activity was monitored as described in Materials and methods and expressed relative to basal promoter activity (=1). Histograms represent an average of at least 3 independent experiments, each performed in duplicate.

proposition that differentially expressed cofactors are required for positively or negatively regulating LMX1B transcriptional activity in distinct cellular contexts (Fig. 8).

Discussion

Using various *in vitro* and *in vivo* approaches, we demonstrate for the first time that LMX1B directly regulates expression of several NF-κB target genes and, by inducing IFN-β, indirectly regulates expression of interferon-stimulated genes (ISGs).

LMX1B, transcriptional activator and repressor

Transcriptional activation by LMX1B was previously shown using reporter constructs containing multiple copies of a FLAT element fused to a minimal promoter [24,29,35], but to the best of our knowledge was never shown from a native promoter. We show here for the first time that in HeLa cells LMX1B activates

transcription of a luciferase reporter driven by the native human *IL-6* promoter (-1168/+11). Transcriptional activation of the endogenous *IL-6* gene in HeLa cells was confirmed by expressing LMX1B using a tet-off system and gene expression profiling, which identified a number of NF-κB target genes upregulated as well. We were therefore surprised to identify the same genes upregulated in the kidney of *Lmx1b* knock-out mice, supporting a repressive – rather than activating – effect of LMX1B. This apparent discrepancy might suggest that our tet-off expression system yields non-physiological observations. However, several pieces of evidences argue against such possibility. First, as discussed above, our data are in accordance with the previous description of transcriptional activation of luciferase reporters by LMX1B [24,29,35], and with reports of both positive and negative functions attributed to LIM-HD transcription factors [1,2]. Second, we demonstrated that the activating function of LMX1B in our tet-off expression system was neither the result of doxycycline treatment nor of aberrant protein overexpression. In that regard, LMX1B overexpression in another tet-off cell line (LL-CPK₁) was not sufficient to trigger induction of

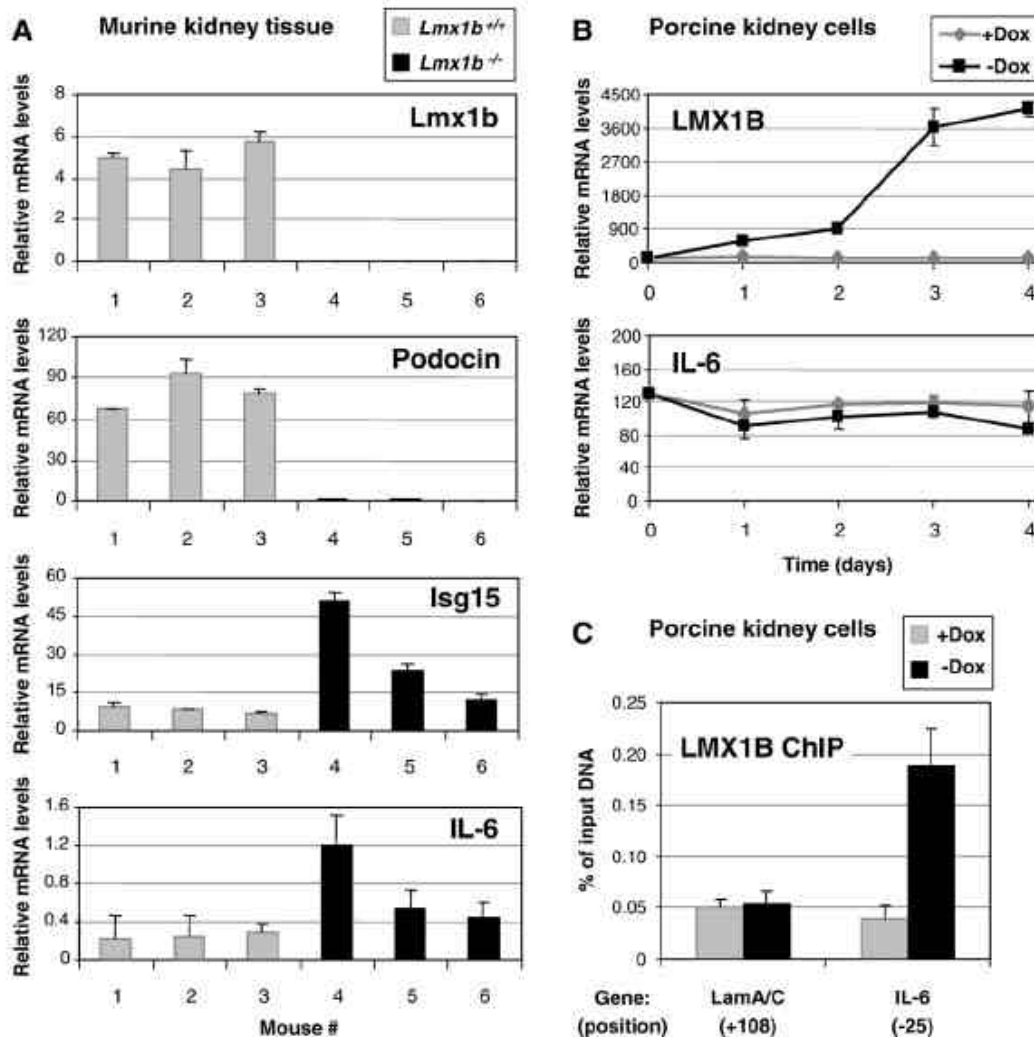


Fig. 7 – NF- κ B target genes and ISGs are upregulated in the kidney of *Lmx1b*^{+/−} knock-out mice but not in LLC-CPK₁ cells expressing LMX1B. (A) RNAs were isolated from the kidney of wild-type (*Lmx1b*^{+/+}) and homozygous knock-out (*Lmx1b*^{-/-}) mice, and analyzed by RT-qPCR using primers specific for mouse *Lmx1b* and the putative LMX1B target gene podocin as controls, as well as for the mouse NF- κ B target IL-6 and interferon-stimulated gene *Isg15*, as described above. (B) NF- κ B target genes and ISGs are not regulated by human LMX1B in the porcine LLC-CPK₁ cell line. Tet-off inducible L_TTA-LMX1B cells were grown in the absence (-Dox) or presence (+Dox) of doxycycline for the indicated times and RNAs were analyzed by RT-qPCR using human (LMX1B) and porcine (IL-6) specific primers. LMX1B expression was also verified at the protein level by Western blot analysis (not shown). (C) LMX1B is recruited to the *IL-6* promoter in LLC-CPK₁ cells. LMX1B ChIP was performed from doxycycline-treated (+Dox) and untreated (-Dox) L_TTA-LMX1B cells as described above for H_TTA-LMX1B cells. Immunoprecipitated genomic DNA was analyzed by real-time PCR using primers specific for the porcine *IL-6* proximal promoter (mean position -25 relative to the transcription start site). Due to limited porcine genomic sequence availability, control primers were designed within the *Lamin A/C* (*LamA/C*) coding sequence (mean position +108 relative to the translation start site).

NF- κ B target genes. Third, a point mutation within the LIM2 domain of LMX1B abrogated its activating function in HeLa cells, demonstrating the specificity of this effect and the importance of a functional LIM2 domain, in accordance with the literature [1]. We therefore strongly believe that the data obtained in the HeLa tet-off cell line are biologically relevant, and that they actually reveal a unique characteristic of LMX1B, as either a positive or negative transcriptional regulator depending on the cellular context.

LMX1B activity is regulated by cell-specific cofactors

We found that while LMX1B positively regulates expression of NF- κ B target genes in HeLa cells, it represses the same genes in the mouse kidney – likely in the podocytes exclusively expressing LMX1B [23] – but is not sufficient to regulate expression of these genes in the kidney tubuli-derived cell line LLC-CPK₁. A similar downregulation of NF- κ B target genes by LMX1B in mouse kidney

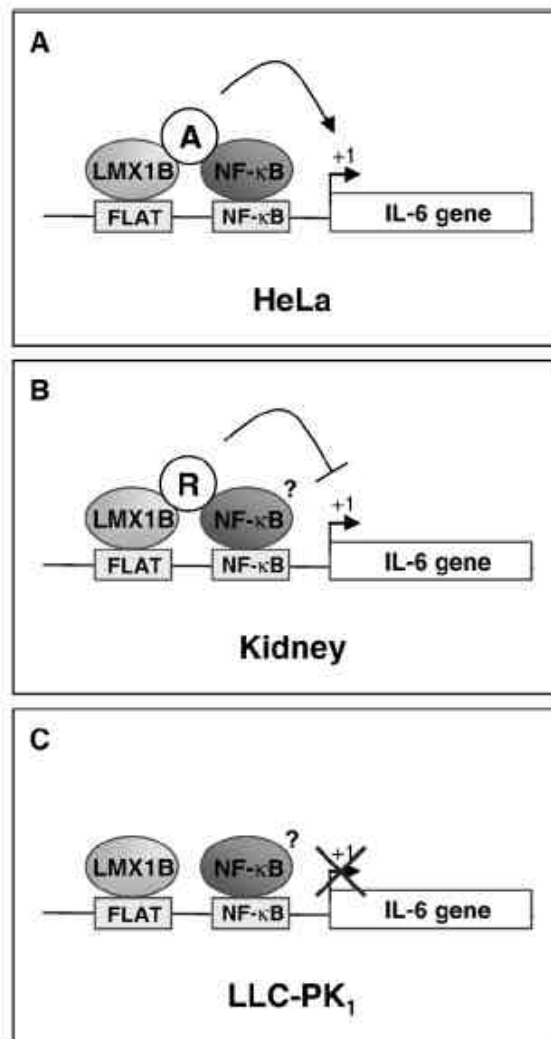


Fig. 8 – Model of cell-specific regulation of NF-κB target genes by LMX1B. (A) In HeLa cells, LMX1B binds to the FLAT element within the proximal promoter of NF-κB target genes such as *IL-6* and *IL-8*. LMX1B recruitment leads to an increase in nuclear p50/p65 NF-κB binding to its nearby recognition site, possibly through protein–DNA complex stabilization via recruitment of a common coactivator (“A”). NF-κB activation by TNF-α in LMX1B-expressing cells results in enhanced transcription of the target gene. By contrast, prohibiting either NF-κB or LMX1B association to DNA in TNF-α-stimulated cells (by mutating or in the absence of their recognition motif respectively) partially inhibits LMX1B- or NF-κB-mediated transcription respectively, probably through sequestration of coactivator “A” by nuclear NF-κB or LMX1B in excess. (B) In mouse kidney, absence of coactivator “A” and likely presence of corepressor “R” might result in inhibition of NF-κB target gene expression. Whether NF-κB is also involved in this repressive effect remains to be shown. (C) In the porcine kidney cell line LLC-PK₁, Although LMX1B binds to its recognition site in the context of chromatin, NF-κB target genes are not regulated by LMX1B, suggesting an absence of both coactivator “A” and corepressor “R”. Altogether, our data support a model of tissue-specific regulation of LMX1B target genes based on differential expression of specific cofactors. These tissue- and cell-specific cofactors remain to be identified.

was observed using podocyte-specific inducible *Lmx1b* knock-out adult mice (A.R., unpublished data). Although upregulation of NF-κB target genes was detected in other LMX1B-expressing tissues in the conventional *Lmx1b* knock-out mice, we cannot rule out that part of this expression pattern is the result of proteinuria-induced inflammation in the kidney. We are currently addressing that point through gene expression analysis of glomerulus preparations

isolated from podocyte-specific inducible *Lmx1b* knock-out mice, at early time points upon *Lmx1b* knock-out.

Collectively, our data support a model involving cell-specific cofactors positively or negatively regulating LMX1B transcriptional activity (Fig. 8). First, ChIP assays showed that while LMX1B is able to bind to the endogenous *IL-6* promoter in HeLa and LLC-PK₁ cells, it only supports transcriptional activation in HeLa cells. Absence of

regulation in LLC-PK₁ cells cannot be attributed to expression of human LMX1B in porcine cells since human and porcine LMX1B share 100% identity. Second, a functional LIM2 protein interaction domain is essential for LMX1B-mediated gene regulation [12]. Third, mutation of the NF- κ B recognition motif within the *IL-6* promoter–luciferase reporter partially impaired LMX1B-mediated transcription in the presence of TNF- α , and reciprocally LMX1B expression inhibited NF- κ B-mediated transcription of a reporter lacking a FLAT element. These observations suggest that both LMX1B and NF- κ B transcription factors require a common cofactor to activate transcription in HeLa cells. Although these assays suggest a competition for binding to this common cofactor, this factor might be involved in the LMX1B/NF- κ B synergy observed *in vivo* on expression of endogenous NF- κ B target genes. An alternative explanation for the observed reciprocal inhibition would be that LMX1B and NF- κ B directly interact with each other. However, we were unable to detect such interaction in co-immunoprecipitation experiments. Since intact DNA binding sites are necessary for LMX1B-mediated transcription, our data rather evoke the recruitment of a common cofactor or adaptor protein to pre-bound LMX1B and NF- κ B transcription factors. Such cofactor might stabilize the LMX1B/NF- κ B/chromatin complex, possibly explaining the increase in NF- κ B binding detected by ChIP. Since NF- κ B promoter occupancy directly correlates with transcriptional activity [58], an increase in NF- κ B binding would ultimately result in enhanced transcription of the target gene.

So far, the multifunctional and ubiquitously expressed protein LDB1 is the only characterized cofactor of LMX1B [6–8,26,31]. Cell-specific cofactors of LMX1B hence remain to be identified. One possible candidate is iASPP (also called Nkip1 or RAI), a nuclear protein directly interacting with and inhibiting the activity of NF- κ B p65 [59,60]. iASPP was identified in a yeast two-hybrid screen by our group as a possible interacting partner of LMX1B (R.W., unpublished data), raising the possibility that it might act as an adaptor protein between LMX1B and NF- κ B p65. Although both iASPP/LMX1B and iASPP/NF- κ B interactions could be confirmed by co-immunoprecipitation from eukaryotic cells, no complex containing all three proteins could be detected (not shown), suggesting that the interaction of iASPP with LMX1B and NF- κ B is mutually exclusive. In addition, iASPP did not significantly affect LMX1B-mediated expression of NF- κ B target genes in transient transfection assays, making iASPP an unlikely cofactor of LMX1B-mediated transcription. Our tet-off HeLa and LLC-PK₁ cell lines, as well as murine kidney tissues, represent valuable experimental systems to search for LMX1B-specific cofactors using biochemical approaches.

LMX1B/NF- κ B cooperation is regulated by chromatin

Inhibition of NF- κ B activity by RNA interference impeded while stimulation of NF- κ B activity by TNF- α enhanced LMX1B-mediated induction of NF- κ B target genes. This demonstrates that LMX1B and NF- κ B transcription factors functionally cooperate to regulate expression of these genes in HeLa cells. Other examples of functional cooperation involving either LMX1B or NF- κ B and other homeobox-containing proteins have been reported. The bHLH transcription factor E47 interacts with LMX1B bound in its vicinity on the *insulin* gene minienhancer, and synergistically activates transcription together with LMX1B [29,30]. On the other hand, the homeobox-containing protein HOXB7 functionally

cooperates with p50/p65 NF- κ B to activate transcription from an artificial reporter gene *in vitro* [61]. Although we showed that p50/p65 NF- κ B is involved in activation of NF- κ B target genes by LMX1B in HeLa cells, it remains to be determined whether it is also involved in LMX1B-mediated repression of these genes in the mouse kidney. Similarly, it remains to be shown whether the NF- κ B signalling pathway in LLC-PK₁ cells is functional. Impairment of p50/p65 NF- κ B activity might also explain, at least in part, the absence of induction of NF- κ B target genes noted in these cells.

A direct protein–protein interaction between LMX1B and NF- κ B could not be demonstrated by co-immunoprecipitation from whole cell extracts. Although a weak interaction might not be detectable in such conditions, our results suggest that LMX1B/NF- κ B functional cooperation in HeLa cells rather takes place at the chromatin level. In support to this, the possible common cofactor suggested by our reporter assays, while required, was not sufficient to support LMX1B/NF- κ B synergy in that assay. Furthermore, LMX1B recruitment to the *IL-6* and *IL-8* promoters *in vivo* correlated with an increased NF- κ B DNA association in cells with very low nuclear NF- κ B protein levels. Since NF- κ B DNA binding *in vivo* is a dynamic process in which NF- κ B only transiently binds to κ B sites [58], an increase in NF- κ B promoter occupancy therefore suggests a stabilization of the NF- κ B/chromatin complex or/and a greater chromatin accessibility. Correlation of the transcriptional state and chromatin accessibility (e.g. by Chromatin Accessibility by Real-Time PCR or CHART-PCR [43,44]) using our tet-off HeLa- and LLC-PK₁-derived cell lines would bring valuable information about differences in chromatin structure at these promoters and about the possibility of a LMX1B-induced chromatin reorganization. Indeed, although LMX1B was efficiently recruited to the porcine *IL-6* promoter in LLC-PK₁ cells, we cannot exclude that chromatin organization at this promoter impedes transcriptional initiation.

Regulation of NF- κ B target genes by LMX1B is promoter-specific

We found that in HeLa cells LMX1B binds to the promoter region of human *IL-6* and *IL-8* genes, in close proximity to the well-defined κ B site. DNA association is likely to occur via the identified FLAT element(s) adjacent to the NF- κ B motif, as demonstrated by our luciferase reporter assays. It should be mentioned that, by contrast to *IL-6* and *IL-8*, the promoter region of the NF- κ B target genes *IL-1 β* and *IFN- β* only contained degenerated FLAT elements in the vicinity of the κ B motif, and that only negligible LMX1B binding was detected by ChIP (not shown). Weaker binding to non-consensus FLAT elements combined with hindered antibody accessibility due to promoter occupancy for instance by enhanceosomes, as is the case for *IFN- β* [62], might explain this result. It remains therefore unclear at this point whether activation of the NF- κ B target genes *IL-1 β* and *IFN- β* by LMX1B follows the same molecular mechanism as for *IL-6* and *IL-8*. Our data however clearly showed that LMX1B does not regulate expression of all NF- κ B target genes, suggesting a promoter-specific mechanism of regulation.

Disease implications

Altogether, the data presented in this study support a model of cell-specific regulation of NF- κ B target genes by LMX1B, involving the binding of both LMX1B and NF- κ B p50/p65 transcription

factors to their respective recognition sites, and their stabilization through recruitment of specific cofactors, directing either activation or repression of transcription (Fig. 8). Besides spatial regulation of LMX1B activity, our observations imply that specific LMX1B cofactors are likely to play an essential role in the temporal regulation of LMX1B target genes during development.

The contribution of deregulation of NF- κ B target gene (and ISG) expression in the pathology of nail–patella syndrome (NPS) has not been evaluated thus far. There is to date no report of inflammatory- or immune-related disorder in NPS patients, as would be predicted from the present study. On the other hand, since our data suggest a tissue-specific regulation of NF- κ B target gene expression, no global exacerbation or attenuation of the inflammatory response would be expected. A more comprehensive study of a possible alteration of the immune-response in NPS patients would be necessary to address that point, and might open the door to novel therapeutic intervention in NPS with the use of pro- and anti-inflammatory drugs.

Acknowledgments

We thank Claudia Rohr for generating the HtTA- and LtTA-LMX1B cell lines, Thomas Stempfl and Christoph Moehle (“KFB – Center of Excellence for Fluorescent Bioanalytics”) for their assistance with microarray analyses, and Juergen Prestel and Christian Maercker for preliminary microarray studies. We are also grateful to Joachim Griesenbeck for thoughtful discussions and for critically reading the manuscript. This work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (Sonderforschungsbereich 699) and by institutional research funds (Foerderlinie C to A.R.).

REFERENCES

- [1] I. Bach, The LIM domain: regulation by association, *Mech. Dev.* 91 (2000) 5–17.
- [2] C.S. Hunter, S.J. Rhodes, LIM-homeodomain genes in mammalian development and human disease, *Mol. Biol. Rep.* 32 (2005) 67–77.
- [3] W.J. Gehring, M. Affolter, T. Burglin, Homeodomain proteins, *Annu. Rev. Biochem.* 63 (1994) 487–526.
- [4] W.J. Gehring, Y.Q. Qian, M. Billeter, K. Furukubo-Tokunaga, A.F. Schier, D. Resendez-Perez, M. Affolter, G. Otting, K. Wuthrich, Homeodomain–DNA recognition, *Cell* 78 (1994) 211–223.
- [5] J.M. Matthews, J.E. Visvader, LIM-domain-binding protein 1: a multifunctional cofactor that interacts with diverse proteins, *EMBO Rep.* 4 (2003) 1132–1137.
- [6] A.D. Agulnick, M. Taira, J.J. Breen, T. Tanaka, I.B. Dawid, H. Westphal, Interactions of the LIM-domain-binding factor Ldb1 with LIM homeodomain proteins, *Nature* 384 (1996) 270–272.
- [7] L.W. Jurata, G.N. Gill, Functional analysis of the nuclear LIM domain interactor NLI, *Mol. Cell Biol.* 17 (1997) 5688–5698.
- [8] L.W. Jurata, D.A. Kenny, G.N. Gill, Nuclear LIM interactor, a rhombotin and LIM homeodomain interacting protein, is expressed early in neuronal development, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93 (1996) 11693–11698.
- [9] L.W. Jurata, S.L. Pfaff, G.N. Gill, The nuclear LIM domain interactor NLI mediates homo- and heterodimerization of LIM domain transcription factors, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 3152–3157.
- [10] I. Bach, C. Rodriguez-Esteban, C. Carriere, A. Bhushan, A. Krones, D.W. Rose, C.K. Glass, B. Andersen, J.C. Izpisua Belmonte, M.G. Rosenfeld, RLIM inhibits functional activity of LIM homeodomain transcription factors via recruitment of the histone deacetylase complex, *Nat. Genet.* 22 (1999) 394–399.
- [11] H.P. Ostendorff, R.L. Peirano, M.A. Peters, A. Schluter, M. Bossenz, M. Scheffner, I. Bach, Ubiquitination-dependent cofactor exchange on LIM homeodomain transcription factors, *Nature* 416 (2002) 99–103.
- [12] C.H. Asbreuk, C.F. Vogelaar, A. Hellemons, M.P. Smidt, J.P. Burbach, CNS expression pattern of Lmx1b and coexpression with ptx genes suggest functional cooperativity in the development of forebrain motor control systems, *Mol. Cell Neurosci.* 21 (2002) 410–420.
- [13] H. Chen, Y. Lun, D. Ovchinnikov, H. Kokubo, K.C. Oberg, C.V. Pepicelli, L. Gan, B. Lee, R.L. Johnson, Limb and kidney defects in Lmx1b mutant mice suggest an involvement of LMX1B in human nail patella syndrome, *Nat. Genet.* 19 (1998) 51–55.
- [14] H. Chen, D. Ovchinnikov, C.L. Pressman, A. Aulehla, Y. Lun, R.L. Johnson, Multiple calvarial defects in Lmx1b mutant mice, *Dev. Genet.* 22 (1998) 314–320.
- [15] J.A. Cygan, R.L. Johnson, A.P. McMahon, Novel regulatory interactions revealed by studies of murine limb pattern in Wnt-7a and En-1 mutants, *Development* 124 (1997) 5021–5032.
- [16] J.X. Dai, Z.L. Hu, M. Shi, C. Guo, Y.Q. Ding, Postnatal ontogeny of the transcription factor Lmx1b in the mouse central nervous system, *J. Comp. Neurol.* 509 (2008) 341–355.
- [17] Y.Q. Ding, U. Marklund, W. Yuan, J. Yin, L. Wegman, J. Ericson, E. Deneris, R.L. Johnson, Z.F. Chen, Lmx1b is essential for the development of serotonergic neurons, *Nat. Neurosci.* 6 (2003) 933–938.
- [18] C. Guo, H.Y. Qiu, Y. Huang, H. Chen, R.Q. Yang, S.D. Chen, R.L. Johnson, Z.F. Chen, Y.Q. Ding, Lmx1b is essential for Fgf8 and Wnt1 expression in the isthmus organizer during tectum and cerebellum development in mice, *Development* 134 (2007) 317–325.
- [19] C.L. Pressman, H. Chen, R.L. Johnson, LMX1B, a LIM homeodomain class transcription factor, is necessary for normal development of multiple tissues in the anterior segment of the murine eye, *Genesis* 26 (2000) 15–25.
- [20] R.D. Riddle, M. Ensign, C. Nelson, T. Tsuchida, T.M. Jessell, C. Tabin, Induction of the LIM homeobox gene Lmx1 by WNT7a establishes dorsoventral pattern in the vertebrate limb, *Cell* 83 (1995) 631–640.
- [21] M.P. Smidt, C.H. Asbreuk, J.J. Cox, H. Chen, R.L. Johnson, J.P. Burbach, A second independent pathway for development of mesencephalic dopaminergic neurons requires Lmx1b, *Nat. Neurosci.* 3 (2000) 337–341.
- [22] I. McIntosh, J.A. Dunston, L. Liu, J.E. Hoover-Fong, E. Sweeney, Nail patella syndrome revisited: 50 years after linkage, *Ann. Hum. Genet.* 69 (2005) 349–363.
- [23] A. Rasche, H. Suleiman, T. Neumann, R. Witzgall, Role of transcription factors in podocytes, *Nephron, Exp. Nephrol.* 106 (2007) e60–e66.
- [24] J.H. Miner, R. Morello, K.L. Andrews, C. Li, C. Antignac, A.S. Shaw, B. Lee, Transcriptional induction of slit diaphragm genes by Lmx1b is required in podocyte differentiation, *J. Clin. Invest.* 109 (2002) 1065–1072.
- [25] C. Rohr, J. Prestel, L. Heidet, H. Hosser, W. Kriz, R.L. Johnson, C. Antignac, R. Witzgall, The LIM-homeodomain transcription factor Lmx1b plays a crucial role in podocytes, *J. Clin. Invest.* 109 (2002) 1073–1082.
- [26] H. Suleiman, D. Heudobler, A.S. Raschta, Y. Zhao, Q. Zhao, I. Hertting, H. Vitzthum, M.J. Moeller, L.B. Holzman, R. Rachele, R. Johnson, H. Westphal, A. Rasche, R. Witzgall, The podocyte-specific inactivation of Lmx1b, Ldb1 and E2a yields new insight into a transcriptional network in podocytes, *Dev. Biol.* 304 (2007) 701–712.
- [27] J.A. Dunston, T. Reimschisel, Y.Q. Ding, E. Sweeney, R.L. Johnson, Z.F. Chen, I. McIntosh, A neurological phenotype in nail patella syndrome (NPS) patients illuminated by studies

- of murine *Lmx1b* expression, *Eur. J. Hum. Genet.* 13 (2005) 330–335.
- [28] E.M. Bongers, M.C. Gubler, N.V. Knoers, Nail-patella syndrome. Overview on clinical and molecular findings, *Pediatr. Nephrol.* 17 (2002) 703–712.
- [29] M.S. German, J. Wang, R.B. Chadwick, W.J. Rutter, Synergistic activation of the insulin gene by a LIM-homeo domain protein and a basic helix-loop-helix protein: building a functional insulin minihenhancer complex, *Genes Dev.* 6 (1992) 2165–2176.
- [30] J.D. Johnson, W. Zhang, A. Rudnick, W.J. Rutter, M.S. German, Transcriptional synergy between LIM-homeodomain proteins and basic helix-loop-helix proteins: the LIM2 domain determines specificity, *Mol. Cell Biol.* 17 (1997) 3488–3496.
- [31] M. Marini, E.M. Bongers, R. Cusano, M. Di Duca, M. Seri, N.V. Knoers, R. Ravazzolo, Confirmation of CLIM2/LMX1B interaction by yeast two-hybrid screening and analysis of its involvement in nail-patella syndrome, *Int. J. Mol. Med.* 12 (2003) 79–82.
- [32] S.D. Dreyer, R. Morello, M.S. German, B. Zabel, A. Winterpacht, G.P. Lunstrum, W.A. Horton, K.C. Oberg, B. Lee, LMX1B transactivation and expression in nail-patella syndrome, *Hum. Mol. Genet.* 9 (2000) 1067–1074.
- [33] S.D. Dreyer, T. Naruse, R. Morello, B. Zabel, A. Winterpacht, R.L. Johnson, B. Lee, K.C. Oberg, *Lmx1b* expression during joint and tendon formation: localization and evaluation of potential downstream targets, *Gene Expr. Patterns* 4 (2004) 397–405.
- [34] D. Krawchuk, A. Kania, Identification of genes controlled by LMX1B in the developing mouse limb bud, *Dev. Dyn.* 237 (2008) 1183–1192.
- [35] R. Morello, G. Zhou, S.D. Dreyer, S.J. Harvey, Y. Ninomiya, P.S. Thorne, J.H. Miner, W. Cole, A. Winterpacht, B. Zabel, K.C. Oberg, B. Lee, Regulation of glomerular basement membrane collagen expression by LMX1B contributes to renal disease in nail patella syndrome, *Nat. Genet.* 27 (2001) 205–208.
- [36] I. Heidet, E.M. Bongers, M. Sich, S.Y. Zhang, C. Loirat, A. Meyrier, M. Broyer, G. Landthaler, B. Fallier, Y. Sado, N.V. Knoers, M.C. Gubler, In vivo expression of putative LMX1B targets in nail-patella syndrome kidneys, *Am. J. Pathol.* 163 (2003) 145–155.
- [37] M. Gossen, H. Bujard, Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89 (1992) 5547–5551.
- [38] W. Van den Berghe, S. Plaisance, E. Boone, K. De Bosscher, M.L. Schmitz, W. Fiers, G. Haegeman, p38 and extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase pathways are required for nuclear factor-kappaB p65 transactivation mediated by tumor necrosis factor, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 3285–3290.
- [39] Y. Dong, A.I. Skoultchi, J.W. Pollard, Efficient DNA transfection of quiescent mammalian cells using poly-L-ornithine, *Nucleic Acids Res.* 21 (1993) 771–772.
- [40] M.I. Cockett, R. Ochalski, K. Benwell, R. Franco, J. Wardwell-Swanson, Simultaneous expression of multi-subunit proteins in mammalian cells using a convenient set of mammalian cell expression vectors, *BioTechniques* 23 (1997) 402–407.
- [41] P. Koulen, Y. Cai, L. Geng, Y. Maeda, S. Nishimura, R. Witzgall, B.E. Ehrlich, S. Somlo, Polycystin-2 is an intracellular calcium release channel, *Nat. Cell Biol.* 4 (2002) 191–197.
- [42] B. Basham, M. Sathe, J. Grein, T. McDanahan, A. D'Andrea, E. Lees, A. Rasclé, In vivo identification of novel STAT5 target genes, *Nucleic Acids Res.* 36 (2008) 3802–3818.
- [43] A. Rasclé, J.A. Johnston, B. Amati, Deacetylase activity is required for recruitment of the basal transcription machinery and transactivation by STAT5, *Mol. Cell Biol.* 23 (2003) 4162–4173.
- [44] A. Rasclé, E. Lees, Chromatin acetylation and remodeling at the cis promoter during STAT5-induced transcription, *Nucleic Acids Res.* 31 (2003) 6882–6890.
- [45] C.A. Sledz, M. Holko, M.J. de Veer, R.H. Silverman, B.R. Williams, Activation of the interferon system by short-interfering RNAs, *Nat. Cell Biol.* 5 (2003) 834–839.
- [46] U.J. Lee, S.R. Choung, K.V. Prakash, E.J. Lee, M.Y. Lee, Y.J. Kim, C.W. Han, Y.C. Choi, Dual knockdown of p65 and p50 subunits of NF-kappaB by siRNA inhibits the induction of inflammatory cytokines and significantly enhance apoptosis in human primary synoviocytes treated with tumor necrosis factor-alpha, *Mol. Biol. Rep.* (2007).
- [47] A. Cozzi, B. Corsi, S. Levi, P. Santambrogio, A. Albertini, P. Arosio, Overexpression of wild type and mutated human ferritin H-chain in HeLa cells: in vivo role of ferritin ferroxidase activity, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 25122–25129.
- [48] D. Vollrath, V.L. Jaramillo-Babb, M.V. Clough, I. McIntosh, K.M. Scott, P.R. Lichter, J.E. Richards, Loss-of-function mutations in the LIM-homeodomain gene, LMX1B, in nail-patella syndrome, *Hum. Mol. Genet.* 7 (1998) 1091–1098.
- [49] J.W. Michelsen, A.K. Sewell, H.A. Louis, J.I. Olsen, D.R. Davis, D. R. Winge, M.C. Beckerle, Mutational analysis of the metal sites in an LIM domain, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 11108–11113.
- [50] T. Agalioti, S. Lomvardas, B. Parekh, J. Yie, T. Maniatis, D. Thanos, Ordered recruitment of chromatin modifying and general transcription factors to the IFN-beta promoter, *Cell* 103 (2000) 667–678.
- [51] M.J. Lenardo, C.M. Fan, T. Maniatis, D. Baltimore, The involvement of NF-kappa B in beta-interferon gene regulation reveals its role as widely inducible mediator of signal transduction, *Cell* 57 (1989) 287–294.
- [52] J. Doly, A. Civas, S. Navarro, G. Uze, Type I interferons: expression and signalization, *Cell Mol. Life Sci.* 54 (1998) 1109–1121.
- [53] A. Hoffmann, G. Natoli, G. Ghosh, Transcriptional regulation via the NF-kappaB signaling module, *Oncogene* 25 (2006) 6706–6716.
- [54] G. Bonizzi, M. Karin, The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity, *Trends Immunol.* 25 (2004) 280–288.
- [55] B. Tian, D.E. Nowak, A.R. Brasier, A TNF-induced gene expression program under oscillatory NF-kappaB control, *BMC Genomics* 6 (2005) 137.
- [56] B. Tian, D.E. Nowak, M. Jamaluddin, S. Wang, A.R. Brasier, Identification of direct genomic targets downstream of the nuclear factor-kappaB transcription factor mediating tumor necrosis factor signaling, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 17435–17448.
- [57] H. Li, X. Lin, Positive and negative signaling components involved in TNFalpha-induced NF-kappaB activation, *Cytokine* 41 (2008) 1–8.
- [58] D. Bosisio, I. Marazzi, A. Agresti, N. Shimizu, M.E. Bianchi, G. Natoli, A hyper-dynamic equilibrium between promoter-bound and nucleoplasmic dimers controls NF-kappaB-dependent gene activity, *EMBO J.* 25 (2006) 798–810.
- [59] N. Takada, T. Sanda, H. Okamoto, J.P. Yang, K. Asamitsu, L. Sarol, G. Kimura, H. Uranishi, T. Tetsuka, T. Okamoto, RelA-associated inhibitor blocks transcription of human immunodeficiency virus type 1 by inhibiting NF-kappaB and Sp1 actions, *J. Virol.* 76 (2002) 8019–8030.
- [60] J.P. Yang, M. Hori, T. Sanda, T. Okamoto, Identification of a novel inhibitor of nuclear factor-kappaB, RelA-associated inhibitor, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 15662–15670.
- [61] A. Charlot, F. Princen, J. Gielen, M.P. Merville, G. Franzoso, K. Brown, U. Siebenlist, V. Bours, IkappaB-alpha enhances transactivation by the HCB7 homeodomain-containing protein, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 5318–5325.
- [62] M. Merika, D. Thanos, Enhanceosomes, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 11 (2001) 205–208.
- [63] F.C. Bange, U. Vogel, T. Flohr, M. Kiekenbeck, B. Denecke, E.C. Bottger, IFP 35 is an interferon-induced leucine zipper protein

- that undergoes interferon-regulated cellular redistribution, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 1091–1098.
- [64] H.A. Bluysen, R.J. Vlietstra, P.W. Faber, E.M. Smit, A. Hagemeijer, J. Trapman, Structure, chromosome localization, and regulation of expression of the interferon-regulated mouse Ifi54/Ifi56 gene family, *Genomics* 24 (1994) 137–148.
- [65] M.J. de Veer, M. Holko, M. Frevel, E. Walker, S. Der, J.M. Paranjape, R.H. Silverman, B.R. Williams, Functional classification of interferon-stimulated genes identified using microarrays, *J. Leukoc. Biol.* 69 (2001) 912–920.
- [66] C. Drouet, A. Reboul, Biosynthesis of C1r and C1s subcomponents, *Behring-Inst.-Mitt.* (1989) 80–88.
- [67] T. Grotzinger, T. Sternsdorf, K. Jensen, H. Will, Interferon-modulated expression of genes encoding the nuclear-dot-associated proteins Sp100 and promyelocytic leukemia protein (PML), *Eur. J. Biochem.* 238 (1996) 554–560.
- [68] G. Helbig, K.W. Christopherson III, P. Bhat-Nakshatri, S. Kumar, H. Kishimoto, K.D. Miller, H.E. Broxmeyer, H. Nakshatri, NF-kappaB promotes breast cancer cell migration and metastasis by inducing the expression of the chemokine receptor CXCR4, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 21631–21638.
- [69] J. Hiscott, J. Marois, J. Garoufalos, M. D'Addario, A. Roulston, I. Kwan, N. Pepin, J. Lacoste, H. Nguyen, G. Bensi, et al., Characterization of a functional NF-kappa B site in the human interleukin 1 beta promoter: evidence for a positive autoregulatory loop, *Mol. Cell Biol.* 13 (1993) 6231–6240.
- [70] D.C. Kang, R.V. Gopalkrishnan, Q. Wu, E. Jankowsky, A.M. Pyle, P.B. Fisher, mda-5: An interferon-inducible putative RNA helicase with double-stranded RNA-dependent ATPase activity and melanoma growth-suppressive properties, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99 (2002) 637–642.
- [71] J. Kiss, G.G. Yegutkin, K. Koskinen, T. Savunen, S. Jalkanen, M. Salmi, IFN-beta protects from vascular leakage via up-regulation of CD73, *Eur. J. Immunol.* 37 (2007) 3334–3338.
- [72] O.L. Kulaeva, S. Draghici, L. Tang, J.M. Kraniak, S.J. Land, M.A. Tainsky, Epigenetic silencing of multiple interferon pathway genes after cellular immortalization, *Oncogene* 22 (2003) 4118–4127.
- [73] C. Kunsch, C.A. Rosen, NF-kappa B subunit-specific regulation of the interleukin-8 promoter, *Mol. Cell Biol.* 13 (1993) 6137–6146.
- [74] T.A. Libermann, D. Baltimore, Activation of interleukin-6 gene expression through the NF-kappa B transcription factor, *Mol. Cell Biol.* 10 (1990) 2327–2334.
- [75] M. Miettinen, T. Sareneva, I. Julkunen, S. Matikainen, IFNs activate toll-like receptor gene expression in viral infections, *Genes Immun.* 2 (2001) 349–355.
- [76] H. Moriuchi, M. Moriuchi, A.S. Fauci, Nuclear factor-kappa B potently up-regulates the promoter activity of RANTES, a chemokine that blocks HIV infection, *J. Immunol.* 158 (1997) 3483–3491.
- [77] T. Niikura, R. Hirata, S.C. Weil, A novel interferon-inducible gene expressed during myeloid differentiation, *Blood Cells Mol. Dis.* 23 (1997) 337–349.
- [78] Y. Ohmori, T.A. Hamilton, Cooperative interaction between interferon (IFN) stimulus response element and kappa B sequence motifs controls IFN gamma- and lipopolysaccharide-stimulated transcription from the murine IP-10 promoter, *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 6677–6688.
- [79] J. Schreiber, R.G. Jenner, H.L. Murray, G.K. Gerber, D.K. Gifford, R.A. Young, Coordinated binding of NF-kappaB family members in the response of human cells to lipopolysaccharide, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103 (2006) 5899–5904.
- [80] B. Schreiner, M. Mitsdoerffer, B.C. Kieseier, L. Chen, H.P. Hartung, M. Weller, H. Wiendl, Interferon-beta enhances monocyte and dendritic cell expression of B7-H1 (PD-L1), a strong inhibitor of autologous T-cell activation: relevance for the immune modulatory effect in multiple sclerosis, *J. Neuroimmunol.* 155 (2004) 172–182.
- [81] S.C. Sun, P.A. Ganchi, D.W. Ballard, W.C. Greene, NF-kappa B controls expression of inhibitor 1 kappa B alpha: evidence for an inducible autoregulatory pathway, *Science* 259 (1993) 1912–1915.
- [82] C.P. Tensen, J. Flier, S.S. Rampersad, S. Sampat-Sardjoeipersad, R.J. Scheper, D.M. Boersma, R. Willemze, Genomic organization, sequence and transcriptional regulation of the human CXCL 11(1) gene, *Biochim. Biophys. Acta* 1446 (1999) 167–172.
- [83] A. Ueda, K. Okuda, S. Ohno, A. Shirai, T. Igarashi, K. Matsunaga, J. Fukushima, S. Kawamoto, Y. Ishigatsubo, T. Okubo, NF-kappa B and Sp1 regulate transcription of the human monocyte chemoattractant protein-1 gene, *J. Immunol.* 153 (1994) 2052–2063.
- [84] U. Widmer, K.R. Manogue, A. Cerami, B. Sherry, Genomic cloning and promoter analysis of macrophage inflammatory protein (MIP)-2, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta, members of the chemokine superfamily of proinflammatory cytokines, *J. Immunol.* 150 (1993) 4996–5012.
- [85] L.H. Wong, H. Sim, M. Chatterjee-Kishore, I. Hatzinisiiriou, R.J. Devenish, G. Stark, S.J. Ralph, Isolation and characterization of a human STAT1 gene regulatory element. Inducibility by interferon (IFN) types I and II and role of IFN regulatory factor-1, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 19408–19417.

Role of Transcription Factors in Podocytes

Anne Rasclé Hani Suleiman Tanja Neumann Ralph Witzgall

Institute for Molecular and Cellular Anatomy, University of Regensburg, Regensburg, Germany

Key Words

Wilm's tumor gene 1 · Slit diaphragm · Foot processes

Abstract

Despite a wealth of information on structural proteins, comparatively little is known on the transcriptional regulation of podocyte structure and function. In this review we will highlight those transcription factors which, by gene inactivation or classical transgenic experiments, have been shown to be essential for podocytes or probably will turn out to be so. The tumor suppressor protein WT1 is not only indispensable for the initial stages of kidney development, but also very likely maintains the integrity of the fully differentiated podocyte. In the kidney, the LIM homeodomain transcription factor LMX1B is specifically synthesized in podocytes, and mutations in *LMX1B* lead to nail-patella syndrome and the associated nephropathy. Other transcription factors such as hypoxia-inducible factors and PAX2 are likely to play a role in podocytes, whereas the significance of others, e.g. of *POD1* and *CITED2*, is more speculative at this point.

Copyright © 2007 S. Karger AG, Basel

Introduction

The essential function of podocytes was irrevocably brought to nephrologists' attention with the identification of the *NPHS1* gene [1], the gene mutated in patients suffering from congenital nephrotic syndrome of the Finnish type. From then on the podocyte has not left center stage when it comes to the investigation of glomerular development and diseases. During development, podocytes differentiate from a cuboidal into an octopus-shaped cell with many large and small tentacles. Primary processes (the large tentacles) extend from the cell body and elaborate many fine secondary processes, the foot processes. By a mechanism so far shrouded in mystery, foot processes emanating from two different primary processes (but not from the same primary process!) are connected by a proteinaceous bridge called the slit diaphragm, one component of the glomerular filtration barrier. In the absence of the protein product of the *Nphs1* gene, nephrin, no slit diaphragms form [2, 3]. Both figuratively and literally speaking, nephrin has been the nucleus around which the slit diaphragm was built. Furthermore, the podocytes, together with glomerular endothelial cells, are also responsible for the synthesis of the glomerular basement membrane. Despite this increasing wealth of information on structural proteins produced by

KARGER

Fax +41 61 306 12 34
E-Mail karger@karger.ch
www.karger.com

© 2007 S. Karger AG, Basel
1660-2129/07/1062-0060\$23.50/0

Accessible online at:
www.karger.com/nee

Ralph Witzgall
University of Regensburg, Institute for Molecular and Cellular Anatomy
Universitätsstrasse 31, DE-93053 Regensburg (Germany)
Tel. +49 941 943 2820, Fax +49 941 943 2868
E-Mail ralph.witzgall@vki.uni-regensburg.de

podocytes, comparatively little is known on the transcription factors regulating the synthesis of these proteins. Our review will highlight the current knowledge on gene regulation in podocytes. One of the challenges for the coming years will be to identify the target genes of transcription factors in podocytes, which will yield a deeper insight both into the regular development of podocytes and into podocyte diseases.

Transcription Factors with a Proven Role in Podocytes

FOXC2 (Mfh2)

The forkhead/winged-helix family of transcription factors plays essential roles in cell fate determination, proliferation and differentiation of multiple tissues and organs (reviewed in [4]). One member of this family, FOXC2, has been detected in developing and mature podocytes [5], and indeed podocytes in *Foxc2* knockout mice retain a columnar cell shape and do not elaborate foot processes and slit diaphragms. Attesting to the cross-talk between podocytes and glomerular endothelial cells, the latter lacked fenestrations. These defects closely resemble the phenotype observed in *Lmx1b* and *Pod1* knockout mice (see below). Transcript profiling and immunohistochemistry revealed that podocin, the $\alpha 3$ and $\alpha 4$ chains of collagen IV, and MafB synthesis were downregulated in glomeruli of *Foxc2* ($-/-$) mice [5]. The expression of *Lmx1b* and *Pod1* was normal in the *Foxc2* knockout mice, whereas that of *Cited2*, a novel podocyte marker and transcriptional coactivator (see below), was also downregulated [5]. These results suggest that FOXC2, LMX1B and POD1 function in independent pathways to regulate expression of these putative target genes.

LMX1B

Nail-patella syndrome (synonyms: HOOD syndrome or hereditary osteo-onychodysplasia, Turner-Kieser syndrome, Fong disease, Österreicher syndrome) is an autosomal-dominant genetic disease which has been named after the characteristic malformed finger and toe nails and the hypoplastic or absent kneecaps. Renal involvement was first described in 1967 [6], and symptoms may range from light proteinuria to ultimately chronic renal failure. Altogether the kidney may be affected in up to 40% of the patients [7]. Ultrastructurally, a thickened glomerular basement membrane with both electron-lucent areas [8, 9] and fibrillar inclusions resembling collagen [9] are considered pathognomonic. In addition, foot pro-

cess effacement was observed for a certain percentage of podocytes [8, 9].

Over 40 years after initial linkage of nail-patella syndrome to the ABO blood group locus [10], mutations in the *LMX1B* gene have been found to be responsible for the disease [11–13]. *LMX1B* codes for a transcription factor with two zinc-binding LIM domains at its NH₂-terminus, a DNA-binding homeodomain in the middle and a putative activation domain at the COOH-terminus. LIM domains mediate protein-protein interactions (for review see [14, 15]). This also is the case for LMX1B, which through its LIM domains interacts with the helix-loop-helix protein E47 [16] and the transcriptional adapter protein LDB1 (synonyms: NLI, CLIM2) [17]. It is somewhat controversial whether LDB1 exerts a positive or a negative regulatory effect on LMX1B, this crucial question should be resolved with the identification of LMX1B target genes in podocytes. Our own observations indicate that in the podocyte only the interaction between LMX1B and LDB1, but not that between LMX1B and E47, is of functional significance [17a].

Due to the limited availability of human material, the *Lmx1b* knockout mice have been an extremely valuable tool to examine the role of LMX1B in podocytes more closely. In the absence of *Lmx1b*, podocytes elaborate only rudimentary, if any, foot processes [18, 19]. No slit diaphragms were observed between podocytes, neighboring cells are rather connected by a structure resembling an adherens junction [18, 19]. In addition, the glomerular basement membrane was split and endothelial fenestrations were greatly reduced [19]. These developmental defects are accompanied by characteristic molecular changes. Not only are the $\alpha 3$ and the $\alpha 4$ chains of collagen IV absent from the glomerular basement membrane ([20] and our own unpublished observations), but the *Nphs2* gene is no longer expressed either [18, 19] (fig. 1). The loss of expression of these genes could possibly be explained by the binding of LMX1B to AT-rich sequences in the first intron of the *COL4A4* gene [20] and in the promoter region of the *NPHS2* gene [18, 19]. It also has to be mentioned, however, that the *NPHS2*, *COL4A3* and *COL4A4* genes are still expressed in podocytes of patients with nail-patella syndrome [21].

MafB (Maf-1, Kreisler)

MafB belongs to the basic leucine zipper family of transcription factors which play essential functions in a number of cellular contexts (reviewed in [22]). They bind specific recognition elements (MAREs) and homo- and heterodimerize with other transcription factors to posi-

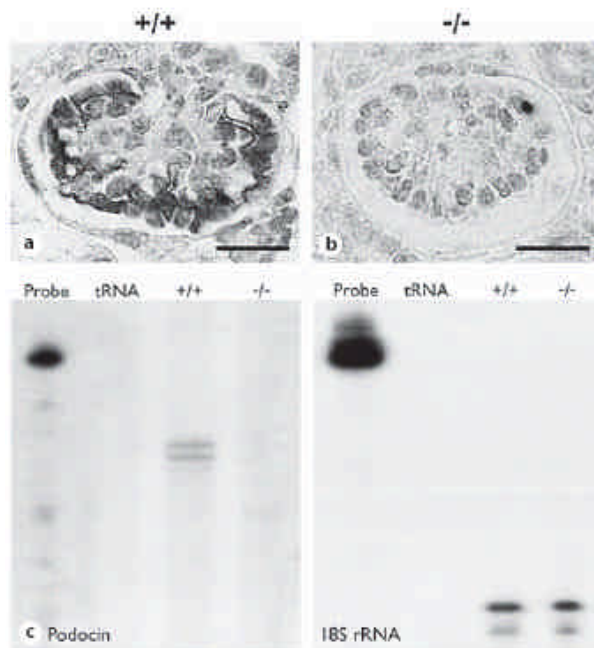


Fig. 1. Synthesis of podocin protein and mRNA in newborn *Lmx1b* (-/-) mice. Podocin protein (a) and mRNA (c) were present only in podocytes of wild-type mice, but not in those of homozygous knockout mice (b, c). a, b Immunohistochemical staining of newborn mouse kidneys with an anti-podocin antiserum. c RNase protection assay with podocin antisense RNA (tRNA served as a negative control). A protection assay with a probe directed against 18S rRNA shows that the RNA concentration was determined correctly. Taken with permission from Rohr et al. [19]. Bar = 20 μ m (a, b).

tively or negatively regulate transcription. In the kidney, *MafB* is specifically expressed in developing podocytes, apparently dependent on the presence of another transcription factor, Pod1 [23]. The inactivation of *MafB* results in the loss of podocyte foot processes and is associated with the downregulation of the *Nphs1*, *Nphs2* and *Cd2ap* genes [23, 24], which encode essential components of the podocyte slit diaphragm. It remains to be demonstrated, however, whether these genes represent direct or indirect targets of *MafB*.

WT1

Wilms' tumor or nephroblastoma is the most common solid childhood tumor. It arises by mutations in several different genes, only one of which, *WT1*, has been cloned so far [25–28]. *WT1* (Wilms' tumor gene 1) belongs to the

tumor suppressor gene family and codes for a protein with 4 typical zinc fingers of the C_2H_2 class. Several alternative splice variants of *WT1* have been described which for example differ by the presence or absence of the 3-amino acid peptide 'NH₂-LysThrSer-COOH' (KTS in the single letter code) between the third and fourth zinc finger [29]. The DNA-binding characteristics of *WT1* depend on the presence of this peptide [30] (for a more extensive discussion of the DNA-binding properties of *WT1* also see [31]). By in situ hybridization and immunohistochemistry the *WT1* mRNA and protein could be detected from the earliest stages of nephron development (in the condensed metanephrogenic mesenchyme), later on its expression is restricted to the podocytes [32–37].

In addition to Wilms' tumors at least three other human renal diseases are caused by mutations in *WT1*. Denys-Drash syndrome, which is characterized by pseudohermaphroditism, nephropathy and a predisposition to Wilms' tumor, is believed to be caused by a dominant-negative mechanism. The mutations in patients with Denys-Drash syndrome affect the zinc finger domain of *WT1* and lead to the inactivation or loss of the zinc fingers [38–40], and heterozygous knock-in mice mimicking a mutation found in Denys-Drash patients also develop sclerotic glomeruli [41]. The cause of WAGR syndrome (Wilms' tumor, aniridia, genitourinary malformations, mental retardation) is a large deletion in the chromosomal location 11p13 and involves the *PAX6* gene as well [42]. Finally, in patients with Frasier syndrome, a very rare disease with pseudohermaphroditism and progressive glomerulopathy, the splice donor site in intron 9 is mutated. This mutation results in a higher ratio of the (-KTS) over the (+KTS) splice form and emphasizes the importance of a balance between the two splice forms [43]. Such an interpretation is corroborated by findings in mice in which the ratio of the +KTS and -KTS isoforms was altered. Approximately two thirds of heterozygous *Wt1*^{wt/-KTS} mice [mice with one wild-type allele and one allele which only encoded the (-KTS) isoform] developed focal-segmental glomerular sclerosis after 2–3 months, and homozygous *Wt1*^{-KTS/-KTS} and *Wt1*^{+KTS/+KTS} even died within 24 h after birth, in either case showing pronounced podocyte defects [44].

The importance of the *WT1* gene for renal development is emphasized by the phenotype of the *Wt1* knockout mice. *Wt1* (-/-) embryos die in utero with renal agenesis due to a defect in the metanephrogenic mesenchyme, consistent with the expression pattern described above [45]. Several pieces of data support the assumption that *WT1* also exerts a role in the fully differentiated podocyte, al-

though ultimate evidence is still lacking. (1) Patients with Denys-Drash syndrome and Frasier syndrome develop sclerotic glomeruli. (2) *Wt1* knockout mice can be rescued by a YAC transgene containing the human *WT1* locus and survive until birth. Although kidneys are present in these mice, fully differentiated podocytes are not observed [46]. (3) Genetically engineered mice with reduced levels of *WT1* develop glomerulosclerosis, and podocytes synthesize reduced amounts of nephrin and podocalyxin [47]. (4) *WT1* binds to sequences in the promoter regions of the *Podxl* gene (encoding podocalyxin) [48] and of the *NPHS1/Nphs1* gene (encoding nephrin) [49, 50], furthermore it activates the respective reporter constructs. Induction of the endogenous *NPHS1/Nphs1* gene, however, was only described in one report [50] but not in another [48], which may be due to the use of different cell lines.

Transcription Factors with a Likely Role in Podocytes

Hypoxia-Inducible Factors

Hypoxia-inducible factors (HIFs) are heterodimeric proteins of the basic helix-loop-helix/PAS family of transcription factors. While the β subunit is not regulated by the oxygen tension, the α subunit is sensitive to oxygen levels (reviewed in [51]). Under normoxia, the oxygen-dependent prolyl hydroxylation of HIF- α subunits promotes an interaction with the von Hippel-Lindau protein, which subsequently leads to HIF- α ubiquitination and its degradation by the 26S proteasome. In addition, the oxygen-dependent hydroxylation of a conserved asparagine residue within the COOH-terminal transactivation domain of HIF- α prevents its interaction with the p300/CBP transcriptional co-activator. Under hypoxic conditions, however, HIF- α is stabilized and interacts with p300/CBP, thus leading to the transcriptional activation of its target genes [51]. HIFs were detected in podocytes of newborn mouse kidneys both on the mRNA and protein level [52]. Potential HIF target genes in podocytes are the ones encoding vascular endothelial growth factor (VEGF-A) [52, 53] and the G-protein-coupled chemokine receptor *Cxcr4* [53]. Podocyte-specific ablation of the von Hippel-Lindau gene and the concurrent upregulation of HIFs is sufficient to induce rapidly progressive glomerulonephritis, for which the upregulation of *Cxcr4* is at least partly responsible [53].

LIM1

LIM1 (synonym LHX1) and LMX1B share several features. Both proteins belong to the LIM-homeodomain

family of transcription factors, and as LMX1B, LIM1 is involved in renal development [54] and has been shown to interact with the cofactor LDB1 [55]. *Lim1* is expressed in comma- and S-shaped bodies, but then its expression decreases in the mature glomerulus [54, 56], which is in contrast to *Lmx1b* whose expression is maintained in the mature glomerulus. *Lim1* knockout mice suffer from renal agenesis [57], and subsequent analysis has demonstrated that LIM1 is required at multiple steps of kidney development; by inference from chimera experiments LIM1 may also be involved in podocyte development [54].

PAX2

PAX2 belongs to the paired box-family of proteins that contain only a truncated homeodomain. It can act both as a transcriptional activator [58] and repressor [59] of the *WT1* gene, the latter activity probably depends on its interaction with proteins of the Groucho/TLE family [60, 61]. During renal development PAX2 is expressed both in the derivatives of the metanephrogenic mesenchyme and of the ureteric bud [62, 63]. Its expression declines as the S-shaped body evolves and is absent in the mature podocyte, possibly due to transcriptional repression by WT-1 [63]. This downregulation may be essential for proper glomerular development because the synthesis of PAX2 in transgenic mice leads to podocyte damage [61, 64]. Definitive evidence for the importance of PAX2 for podocyte development is lacking because *Pax2* ($-/-$) mice altogether lack kidneys [65]. Interestingly, a physical interaction has been demonstrated between PAX2 and LMX1B [66], suggesting that PAX2 and LMX1B act together or modulate their mutual activities. Although the functional significance of the LMX1B/PAX2 interaction remains to be demonstrated, it would be interesting to investigate whether PAX2 is aberrantly expressed in podocytes of patients suffering from nail-patella syndrome.

Transcription Factors with a Possible Role in Podocytes

CITED2 (*Mrg1*)

CITED2 (CBP/p300-interacting transactivator with glutamic acid- and aspartic acid-rich tail) belongs to a family of transcriptional cofactors (CITED1 to CITED4) lacking a DNA binding domain, and which are characterized by their ability to interact with the coactivator CBP/p300. In doing so, they can compete with many transcription factors for their interaction with CBP/p300. For instance,

CITED2 acts as a negative regulator of hypoxia-driven transcription through competition with HIF-1 α for CBP/p300 interaction (see HIFs above). Interestingly, CITED2 expression itself is positively regulated by HIF-1 α during hypoxia, and CITED2 is thus part of a negative feedback loop in the response to hypoxia [67]. In the kidney, CITED2 is expressed in differentiating podocytes from the S-shaped stage onwards, and its expression is downregulated in *Foxc2* (-/-) mice [5]. Although *Cited2* knockout mice have been generated, no kidney phenotype has been described so far and the function of CITED2 in podocytes remains to be examined. Since *Cited2* (-/-) mice display a clear increase in VEGF synthesis in response to hypoxia [68], it would be of interest to investigate the role of CITED2 in the regulation of HIFs in podocytes.

Lrrfip1 (GCF2/Trip)

Lrrfip1 is a poorly characterized RING finger protein that acts as a transcriptional repressor for a variety of genes. In the kidney *Lrrfip1* has been detected in glomeruli and was proposed as a candidate podocyte marker [5]. Its expression is downregulated in *Pod1* (-/-) mice [69], and *Lrrfip1* as such represents a potential *POD1* target gene.

MATH6

MATH6 belongs to the family of basic helix-loop-helix transcription factors and is produced in multiple tissues. In the developing kidney it was found in the metanephric mesenchyme-derived cell populations, and it became restricted to podocytes in the adult kidney [70]. The synthesis of Math6 is downregulated in HIV-associated nephropathy (HIVAN), a collapsing glomerulopathy characterized by podocyte dedifferentiation, together with that of nephrin and synaptopodin, suggesting a potential role of MATH6 in the differentiation and/or maintenance of podocytes [70].

POD1

Like MATH6, *POD1* is a transcription factor of the basic helix-loop-helix family, and just as with other family members it can activate or repress transcription through heterologous interactions [71]. In the kidney, *Pod1* is expressed in developing and mature podocytes [72, 73]. Knockout experiments have demonstrated that *Pod1* is required for tubular and glomerular differentiation [73], so that podocytes in *Pod1* (-/-) mice retain a columnar shape and form only few foot processes [73]. Somewhat surprisingly, however, chimera experiments showed the presence of fully differentiated *Pod1* (-/-)

podocytes, thus indicating that *POD1* also acts in a non-cell autonomous manner. Definitive evidence on the importance of *POD1* in podocytes will require its podocyte-specific inactivation. *POD1* target genes involved in podocyte differentiation remain unknown. Several genes differentially regulated in isolated glomeruli from *Pod1* knockout mice were recently identified using Affymetrix arrays [69]. Among the putative genes positively regulated by *POD1* were *NPHS2*, *COL4A3* and *Lrrfip1* (see above). Furthermore, MafB is undetectable in podocytes from *Pod1* knockout mice [23]. It remains to be shown whether these genes represent direct or indirect targets.

Retinoic Acid Receptors

All-trans retinoic acid, a vitamin A derivative, regulates transcription through binding to retinoic acid and retinoid X receptors, and subsequent recognition of retinoic acid response elements (RAREs) within the promoter region of target genes (reviewed in [74]). All-trans retinoic acid has been shown to induce podocyte differentiation in vitro and in vivo, as monitored by foot process formation, decreased cell proliferation and upregulation of nephrin and podocin [75]. The *NPHS1* promoter contains three RAREs and is responsive to all-trans retinoic acid in a reporter assay [76], thus supporting direct regulation by all-trans retinoic acid. Furthermore, all-trans retinoic acid was effective in the treatment of the puromycin aminonucleoside model of podocyte injury [76, 77].

Acknowledgement

We want to thank the German Research Council for financial support through SFB 699.

References

- 1 Kestilä M, Lenkkeri U, Männikkö M, Lamerdin J, McCready P, Putaala H, Ruotsalainen V, Morita T, Nissinen M, Herva R, Kashtan CE, Peltonen L, Holmberg C, Olsen A, Tryggvason K: Positionally cloned gene for a novel glomerular protein - nephrin - is mutated in congenital nephrotic syndrome. *Mol Cell* 1998;1:575-582.
- 2 Putaala H, Soininen R, Kilpeläinen P, Wartiovaara J, Tryggvason K: The murine nephrin gene is specifically expressed in kidney, brain and pancreas: inactivation of the gene leads to massive proteinuria and neonatal death. *Hum Mol Genet* 2001;10:1-8.
- 3 Rantanen M, Palmén T, Pätäri A, Ahola H, Lehtonen S, Åström E, Floss T, Vauti E, Wurst W, Ruiz P, Kerjaschki D, Holthöfer H: Nephrin TRAP micelack slit diaphragms and show fibrotic glomeruli and cystic tubular lesions. *J Am Soc Nephrol* 2002;13:1586-1594.

- 4 Lehmann OJ, Sowden JC, Carlsson P, Jordan T, Bhattacharya SS: Fox's in development and disease. *Trends Genet* 2003;19:339-344.
- 5 Takemoto M, He L, Norlin J, Patrakka J, Xiao Z, Petrova T, Bondjers C, Asp J, Wallgard E, Sun Y, Samuelsson T, Mostad P, Lundin S, Miura N, Sado Y, Alitalo K, Quaggin SE, Tryggvason K, Betsholtz C: Large-scale identification of genes implicated in kidney glomerulus development and function. *EMBO J* 2006;25:1160-1174.
- 6 Silverman ME, Goodman RM, Cuppage FE: The nail-patella syndrome. Clinical findings and ultrastructural observations in the kidney. *Arch Intern Med* 1967;120:68-74.
- 7 Sweeney E, Fryer A, Mountford R, Green A, McIntosh I: Nail patella syndrome: A review of the phenotype aided by developmental biology. *J Med Genet* 2003;40:153-162.
- 8 del Pozo E, Lapp H: Ultrastructure of the kidney in the nephropathy of the nail-patella syndrome. *Am J Clin Pathol* 1970;54:845-851.
- 9 Ben-Bassat M, Cohen L, Rosenfeld J: The glomerular basement membrane in the nail-patella syndrome. *Arch Pathol* 1971;92:350-355.
- 10 Renwick JH, Lawler SD: Genetic linkage between the ABO and nail-patella loci. *Ann Hum Genet* 1955;19:312-331.
- 11 Dreyer SD, Zhou G, Baldini A, Winterpacht A, Zabel B, Cole W, Johnson RL, Lee B: Mutations in *LMX1B* cause abnormal skeletal patterning and renal dysplasia in nail patella syndrome. *Nat Genet* 1998;19:47-50.
- 12 McIntosh I, Dreyer SD, Clough MV, Dunston JA, Eyaad W, Roig CM, Montgomery T, Ala-Mello S, Kaitila I, Winterpacht A, Zabel B, Frydman M, Cole WG, Francomano CA, Lee B: Mutation analysis of *LMX1B* gene in nail-patella syndrome patients. *Am J Hum Genet* 1998;63:1651-1658.
- 13 Vollrath D, Jaramillo-Babb VL, Clough MV, McIntosh I, Scott KM, Lichter PR, Richards JE: Loss-of-function mutations in the LIM-homeodomain gene, *LMX1B*, in nail-patella syndrome. *Hum Mol Genet* 1998;7:1091-1098.
- 14 Hobert O, Westphal H: Functions of LIM-homeobox genes. *Trends Genet* 2000;16:75-83.
- 15 Bach I: The LIM domain: Regulation by association. *Mech Dev* 2000;91:5-17.
- 16 Johnson ID, Zhang W, Rudnick A, Rutter WJ, German MS: Transcriptional synergy between LIM-homeodomain proteins and basic helix-loop-helix proteins: the LIM2 domain determines specificity. *Mol Cell Biol* 1997;17:3488-3496.
- 17 Marini M, Bongers EMHF, Cusano R, di Duca M, Seri M, Knoers NVAM, Ravazzolo R: Confirmation of CLIM2/LMX1B interaction by yeast two-hybrid screening and analysis of its involvement in nail-patella syndrome. *Int J Mol Med* 2003;12:79-82.
- 17a Suleiman H, Heudobler D, Raschta A-S, Zhao Y, Zhao Q, Hertting I, Vitzthum H, Moeller MJ, Holzman LB, Rachel R, Johnson R, Westphal H, Rasche A, Witzgall R: The podocyte-specific inactivation of *Lmx1b*, *Ldb1* and *E2a* yields new insight into a transcriptional network in podocytes. *Dev Biol* 2007;304:701-712.
- 18 Miner JH, Morello R, Andrews KL, Li C, Antignac C, Shaw AS, Lee B: Transcriptional induction of slit diaphragm genes by *Lmx1b* is required in podocyte differentiation. *J Clin Invest* 2002;109:1065-1072.
- 19 Rohr C, Prestel J, Heidet L, Hosser H, Kriz W, Johnson RL, Antignac C, Witzgall R: The LIM-homeodomain transcription factor *Lmx1b* plays a crucial role in podocytes. *J Clin Invest* 2002;109:1073-1082.
- 20 Morello R, Zhou G, Dreyer SD, Harvey SJ, Ninomiya Y, Thorne PS, Miner JH, Cole W, Winterpacht A, Zabel B, Oberg KC, Lee B: Regulation of glomerular basement membrane collagen expression by *LMX1B* contributes to renal disease in nail patella syndrome. *Nat Genet* 2001;27:205-208.
- 21 Heidet L, Bongers EMHF, Sich M, Zhang S-Y, Lohr C, Meyrier A, Broeyer M, Landthaler G, Faller B, Sado Y, Knoers NVAM, Gubler M-C: In vivo expression of putative *LMX1B* targets in nail-patella syndrome kidneys. *Am J Pathol* 2003;163:145-155.
- 22 Blank V, Andrews NC: The Maf transcription factors: regulators of differentiation. *Trends Biochem Sci* 1997;22:437-441.
- 23 Sadl VS, Jin F, Yu J, Cui S, Holmyard D, Quaggin SE, Barsh GS, Cordes SP: The mouse *kreisler* (*Kmrl1/MafB*) segmentation gene is required for differentiation of glomerular visceral epithelial cells. *Dev Biol* 2002;249:16-29.
- 24 Moriguchi T, Hamada M, Morito N, Terunuma T, Hasegawa K, Zhang C, Yokomizo T, Esaki R, Kuroda E, Yoh K, Kudo T, Nagata M, Greaves DR, Engel JD, Yamamoto M, Takahashi S: MafB is essential for renal development and F4/80 expression in macrophages. *Mol Cell Biol* 2006;26:5715-5727.
- 25 Call KM, Glaser T, Ito CY, Buckler AJ, Pelletier J, Haber DA, Rose EA, Kral A, Yeger H, Lewis WH, Jones C, Housman DE: Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus. *Cell* 1990;60:509-520.
- 26 Gessler M, Poustka A, Cavenee W, Neve RL, Orkin SH, Bruns GAP: Homozygous deletion in Wilms tumours of a zinc-finger gene identified by chromosome jumping. *Nature* 1990;343:774-778.
- 27 Huang A, Campbell CE, Bonetta L, McAndrews-Hill MS, Chilton-MacNeill S, Coppes MJ, Law DJ, Feinberg AP, Yeger H, Williams BRG: Tissue, developmental, and tumor-specific expression of divergent transcripts in Wilms' tumor. *Science* 1990;250:991-994.
- 28 Bonetta L, Kuehn SE, Huang A, Law DJ, Kallikun LM, Koi M, Reeve AE, Brownstein BH, Yeger H, Williams BRG, Feinberg AP: Wilms tumor locus on 11p13 defined by multiple CpG island-associated transcripts. *Science* 1990;250:994-997.
- 29 Haber DA, Sohn RL, Buckler AJ, Pelletier J, Call KM, Housman DE: Alternative splicing and genomic structure of the Wilms tumor gene *WT1*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:9618-9622.
- 30 Rauscher FJ III, Morris JF, Tournay OE, Cook DM, Curran T: Binding of the Wilms' tumor locus zinc finger protein to the EGR-1 consensus sequence. *Science* 1990;250:1259-1262.
- 31 Reddy JC, Licht JD: The *WT1* Wilms tumor suppressor gene: How much do we really know? *Biochim Biophys Acta* 1996;1287:1-28.
- 32 Pritchard-Jones K, Fleming S, Davidson D, Bickmore W, Proteous D, Gosden C, Bard J, Buckler A, Pelletier J, Housman D, van Heyningen V, Hastie N: The candidate Wilms' tumour gene is involved in genitourinary development. *Nature* 1990;346:194-197.
- 33 Buckler AJ, Pelletier J, Haber DA, Glaser T, Housman DE: Isolation, characterization, and expression of the murine Wilms' tumor gene (*WT1*) during kidney development. *Mol Cell Biol* 1991;11:1707-1712.
- 34 Pelletier J, Schalling M, Buckler AJ, Rogers A, Haber DA, Housman D: Expression of the Wilms' tumor gene *WT1* in the murine urogenital system. *Genes Dev* 1991;5:1345-1356.
- 35 Mundlos S, Pelletier J, Darveau A, Bachmann M, Winterpacht A, Zabel B: Nuclear localization of the protein encoded by the Wilms' tumor gene *WT1* in embryonic and adult tissues. *Development* 1993;119:1329-1341.
- 36 Rackley RR, Flenniken AM, Kuriyan NP, Kessler PM, Stoler MH, Williams BRG: Expression of the Wilms' tumor suppressor gene *WT1* during mouse embryogenesis. *Cell Growth Differ* 1993;4:1023-1031.
- 37 Grubb GR, Yun K, Williams BRG, Eccles MR, Reeve AE: Expression of *WT1* protein in fetal kidneys and Wilms tumors. *Lab Invest* 1994;71:472-479.
- 38 Pelletier J, Bruening W, Kashtan CE, Mauer SM, Manivel JC, Striegel JE, Houghton DC, Junien C, Habib R, Fouser L, Fine RN, Silverman BL, Haber DA, Housman D: Germline mutations in the Wilms' tumor suppressor gene are associated with abnormal urogenital development in Denys-Drash syndrome. *Cell* 1991;67:437-447.
- 39 Little MH, Williamson KA, Mannens M, Kelsey A, Gosden C, Hastie ND, van Heyningen V: Evidence that *WT1* mutations in Denys-Drash syndrome patients may act in a dominant-negative fashion. *Hum Mol Genet* 1993;2:259-264.

- 40 Bardeesy N, Zabel B, Schmitt K, Pelletier J: WT1 mutations associated with incomplete Denys-Drash syndrome define a domain predicted to behave in a dominant-negative fashion. *Genomics* 1994;21:663-665.
- 41 Patek CE, Little MH, Fleming S, Miles C, Charlieu J-P, Clarke AR, Miyagawa K, Christie S, Doig J, Harrison DJ, Porteous DJ, Brookes AJ, Hooper ML, Hastie ND: A zinc finger truncation of murine WT1 results in the characteristic urogenital abnormalities of Denys-Drash syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:2931-2936.
- 42 Ton CTT, Hirvonen H, Miwa H, Weil MM, Monaghan P, Jordan T, van Heyningen V, Hastie ND, Meijers-Heijboer H, Drechsler M, Royer-Pokora B, Collins F, Swaroop A, Strong LC, Saunders GF: Positional cloning and characterization of a paired box- and homeobox-containing gene from the aniridia region. *Cell* 1991;67:1059-1074.
- 43 Barbaux S, Naudet P, Gubler M-C, Grünfeld J-P, Jaubert F, Kuttann F, Fékété CN, Souleyreau-Therville N, Thibaud E, Fellous M, McElreavey K: Donor splice-site mutations in WT1 are responsible for Frasier syndrome. *Nat Genet* 1997;17:467-470.
- 44 Hammes A, Guo J-K, Lutsch G, Leheste J-R, Landrock D, Ziegler U, Gubler M-C, Schedl A: Two splice variants of the Wilms' tumor 1 gene have distinct functions during sex determination and nephron formation. *Cell* 2001;106:319-329.
- 45 Kreidberg JA, Sariola H, Loring JM, Maeda M, Pelletier J, Housman D, Jaenisch R: WT-1 is required for early kidney development. *Cell* 1993;74:679-691.
- 46 Moore AW, McInnes L, Kreidberg J, Hastie ND, Schedl A: YAC complementation shows a requirement for *Wt1* in the development of epicardium, adrenal gland and throughout nephrogenesis. *Development* 1999;126:1845-1857.
- 47 Guo J-K, Menke AL, Gubler M-C, Clarke AR, Harrison D, Hammes A, Hastie ND, Schedl A: WT1 is a key regulator of podocyte function: reduced expression levels cause crescentic glomerulonephritis and mesangial sclerosis. *Hum Mol Genet* 2002;11:651-659.
- 48 Palmer RE, Kotsianti A, Cadman B, Boyd T, Gerald W, Haber DA: WT1 regulates the expression of the major glomerular podocyte membrane protein podocalyxin. *Curr Biol* 2001;11:1805-1809.
- 49 Guo G, Morrison DJ, Licht JD, Quaggin SE: WT1 activates a glomerular-specific enhancer identified from the human nephrin gene. *J Am Soc Nephrol* 2004;15:2851-2856.
- 50 Wagner N, Wagner K-D, Xing Y, Scholz H, Schedl A: The major podocyte protein nephrin is transcriptionally activated by the Wilms' tumor suppressor WT1. *J Am Soc Nephrol* 2004;15:3044-3051.
- 51 Maxwell P: HIF-1: An oxygen response system with special relevance to the kidney. *J Am Soc Nephrol* 2003;14:2712-2722.
- 52 Freeburg PB, Robert B, St. John PL, Abrahamson DR: Podocyte expression of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 and HIF-2 during glomerular development. *J Am Soc Nephrol* 2003;14:927-938.
- 53 Ding M, Cui S, Li C, Jothy S, Haase V, Steer BM, Marsden PA, Pippin J, Shankland S, Rastaldi MP, Cohen CD, Kretzler M, Quaggin SE: Loss of the tumor suppressor Vhlh leads to upregulation of Cxcr4 and rapidly progressive glomerulonephritis in mice. *Nat Med* 2006;12:1081-1087.
- 54 Kobayashi A, Kwan K-M, Carroll TJ, McMahon AP, Mendelsohn CL, Behringer RR: Distinct and sequential tissue-specific activities of the LIM-class homeobox gene *Lim1* for tubular morphogenesis during kidney development. *Development* 2005;132:2809-2823.
- 55 Agulnick AD, Taira M, Breen JJ, Tanaka T, Dawid IB, Westphal H: Interactions of the LIM-domain-binding factor *Ldb1* with LIM homeodomain proteins. *Nature* 1996;384:270-272.
- 56 Karavanov AA, Karavanova I, Perantoni A, Dawid IB: Expression pattern of the rat *Lim1* homeobox gene suggests a dual role during kidney development. *Int J Dev Biol* 1998;42:61-66.
- 57 Shawlot W, Behringer RR: Requirement for *Lim1* in head-organizer function. *Nature* 1995;374:425-430.
- 58 Dehbi M, Ghahremani M, Lechner M, Dressler G, Pelletier J: The paired-box transcription factor, PAX2, positively modulates expression of the Wilms' tumor suppressor gene (WT1). *Oncogene* 1996;13:447-453.
- 59 Wagner K-U, Wall RJ, St-Onge L, Gruss P, Wynshaw-Boris A, Garrett L, Li M, Furth PA, Hennighausen L: Cre-mediated gene deletion in the mammary gland. *Nucleic Acids Res* 1997;25:4323-4330.
- 60 Cai Y, Brophy PJ, Levitan I, Stifani S, Dressler GR: Groucho suppresses Pax2 transactivation by inhibition of INK-mediated phosphorylation. *EMBO J* 2003;22:5522-5529.
- 61 Wagner K-D, Wagner N, Guo J-K, Elger M, Dallman MJ, Bugnon L, Schedl A: An inducible mouse model for PAX2-dependent glomerular disease: insights into a complex pathogenesis. *Curr Biol* 2006;16:793-800.
- 62 Dressler GR, Deutsch U, Chowdhury K, Nornes HO, Gruss P: Pax2, a new murine paired-box-containing gene and its expression in the developing excretory system. *Development* 1990;109:787-795.
- 63 Ryan G, Steele-Perkins V, Morris JF, Rauscher FJ III, Dressler GR: Repression of Pax-2 by WT1 during normal kidney development. *Development* 1995;121:867-875.
- 64 Dressler GR, Wilkinson JE, Rothenpieler UW, Patterson LT, Williams-Simons L, Westphal H: Deregulation of Pax-2 expression in transgenic mice generates severe kidney abnormalities. *Nature* 1993;362:65-67.
- 65 Torres M, Gómez-Pardo E, Dressler GR, Gruss P: Pax-2 controls multiple steps of urogenital development. *Development* 1995;121:4057-4065.
- 66 Marini M, Giacomelli F, Seri M, Ravazzolo R: Interaction of the *LMX1B* and *PAX2* gene products suggests possible molecular basis of differential phenotypes in nail-patella syndrome. *Eur J Hum Genet* 2005;13:789-792.
- 67 Freedman SJ, Sun Z-Y, Kung AL, France DS, Wagner G, Eck MJ: Structural basis for negative regulation of hypoxia-inducible factor-1 α by CITED2. *Nat Struct Biol* 2003;10:504-512.
- 68 Yin Z, Haynie J, Yang X, Han B, Kiatchoosakun S, Restivo J, Yuan S, Prabhakar NR, Herrup K, Conlon RA, Hoyt BD, Watanabe M, Yang Y-C: The essential role of Cited2, a negative regulator for HIF-1 α , in heart development and neurulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:10488-10493.
- 69 Cui S, Li C, Ema M, Weinstein J, Quaggin SE: Rapid isolation of glomeruli coupled with gene expression profiling identifies downstream targets in Pod1 knockout mice. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:3247-3255.
- 70 Ross MD, Martinka S, Mukherjee A, Sedor JR, Vinson C, Bruggeman LA: Math6 expression during kidney development and altered expression in a mouse model of glomerulosclerosis. *Dev Dyn* 2006;235:3102-3109.
- 71 Miyagishi M, Hata M, Ohshima T, Ishida J, Fujii R, Nakajima T, Fukamizu A: Cell type-dependent transactivation or repression of mesoderm-restricted basic helix-loop-helix protein, POD-1/capsulin. *Mol Cell Biochem* 2000;205:141-147.
- 72 Quaggin SE, Vanden Heuvel GB, Igarashi P: Pod-1, a mesoderm-specific basic-helix-loop-helix protein expressed in mesenchymal and glomerular epithelial cells in the developing kidney. *Mech Dev* 1998;71:37-48.
- 73 Quaggin SE, Schwartz L, Cui S, Igarashi P, Deimling J, Post M, Rossant J: The basic-helix-loop-helix protein Pod1 is critically important for kidney and lung organogenesis. *Development* 1999;126:5771-5783.
- 74 Bastien J, Rochette-Egly C: Nuclear retinoid receptors and the transcription of retinoid-target genes. *Gene* 2004;328:1-16.
- 75 Vaughan MR, Pippin JW, Griffin SV, Krofft R, Fleet M, Haseley L, Shankland SJ: ATRA induces podocyte differentiation and alters nephrin and podocin expression in vitro and in vivo. *Kidney Int* 2005;69:133-144.
- 76 Suzuki A, Ito T, Imai E, Yamato M, Iwatani H, Kawachi H, Hori M: Retinoids regulate the repairing process of the podocytes in puromycin aminonucleoside-induced nephrotic rats. *J Am Soc Nephrol* 2003;14:981-991.
- 77 Moreno-Manzano V, Mampaso F, Sepúlveda-Muñoz JC, Alique M, Chen S, Ziyadeh FN, Iglesias-de la Cruz MC, Rodríguez J, Nieto E, Orellana JM, Reyes P, Arribas I, Xu Q, Kitamura M, Lucio Cazana FJ: Retinoids as a potential treatment for experimental puromycin-induced nephrosis. *Br J Pharmacol* 2003;139:823-831.

8. Lebenslauf

Persönliche Daten

Vorname	Tanja
Nachname	Neumann
Geburtsname	Schmitt
Geburtsdatum	14. Juni 1977
Geburtsort	Kaiserslautern
Familienstand	verheiratet, ein Kind

Schulbildung

1983 – 1988	Grundschule Stresemannschule in Kaiserslautern
1988 – 1996	Gymnasium an der Burgstrasse in Kaiserslautern mit dem Abschluss der allgemeinen Hochschulreife

Studium

1996 – 2001	Studium der Biologie an der Universität Kaiserslautern 09/1998: Diplomvorprüfung 02/2000 – 04/2000: Fachprüfungen im Hauptfach Botanik und den Nebenfächern Genetik, Mikrobiologie und Biochemie 04/2000 – 02/2001: Diplomarbeit über systemisch erworbene Resistenz bei Pflanzen in der Abteilung für Pflanzenphysiologie; Titel: „Salicylsäure induziert Transkripte für eine Mitogen-aktivierte Protein- Kinase in Petersilie-Zellkulturen“ 03/2001: Abschluss als Diplom-Biologin
-------------	---

Berufserfahrung

07/2001 – 01/2003	Anstellung als Research Associate bei dem Biotechnologie- Unternehmen Tularik GmbH (heute Amgen Research GmbH) in Regensburg
-------------------	--

Promotion

02/2003 – 06/2006	Doktorandenstelle am Institut für Molekulare und Zelluläre Anatomie der Universität Regensburg
-------------------	---

Sonstiges

seit 07/2006	Mutterschutz und Erziehungszeit
--------------	---------------------------------

9. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Tanja Neumann, geboren am 14.06.1977 in Kaiserslautern, an Eides statt, dass die vorliegende Arbeit mit dem Titel

„Identifizierung einer Funktion des Transkriptionsfaktors LMX1B bei der Regulation des Interferon-beta-Signalwegs“

von mir selbständig verfasst and keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet wurden.

Diese Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Homburg/Saar, Dezember 2008

(Tanja Neumann)

10. Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Ralph Witzgall für die freundliche Aufnahme in seiner Arbeitsgruppe und die Überlassung von Thema und Arbeitsmaterialien.

Herrn Prof. Dr. Armin Kurtz möchte ich für die Übernahme des zweiten Gutachtens und für die freundliche Bereitstellung des LightCyclers seiner Arbeitsgruppe danken.

Je tiens à remercier chaleureusement Dr. Anne Rascle pour son encadrement excellent durant cette thèse. J'ai profité de ses connaissances, de sa motivation contagieuse, son soutien patient ainsi que de son amitié sincère. Ses encouragements constants m'ont redonné la confiance en moi pour mener cette thèse à bout. Je lui en suis sincèrement reconnaissante.

Herrn Dr. Robert Stöhr gilt mein Dank für die Zusammenarbeit im Rahmen des Projektes zur Abklärung der Rolle von LMX1B bei der Entstehung von Tumoren des Urothels, hierbei besonders für die Vorbereitung der Zellproben.

Bei Frau Helen Hoffmeister bedanke ich mich für ihre Freundschaft, auf die ich immer zählen konnte, für eine Billion Worte und viele Taten.

Lissy Besl sage ich Dank für ihre vielfältige, warmherzige Unterstützung laborbezogener und privater Natur.

Den übrigen Mitgliedern des Ost-Labor-Teams - Jürgen Kastner, Anne-Sarah Raschta, Daniel Heudobler, Astrid Neumann, Ruth Kapzan, Kerstin Vogt und Manuela Banzi - danke ich für zahlreiche kleine Gefallen und Hilfestellungen sowie dafür, dass wir ganz nebenbei auch Spass bei der Arbeit hatten und ich immer positive Erinnerungen an diese Zeit behalten werde.

Larissa Osten schulde ich Dank für die gewissenhafte Durchführung einiger Experimente, die leider nicht für diese Arbeit verwendet werden konnten.

Uwe de Vries danke ich für seine fachkundige Hilfe am Fluoreszenz-Mikroskop und am PC.

Allen anderen Kollegen des Lehrstuhls für Molekulare und Zelluläre Anatomie spreche ich meinen Dank für gute Zusammenarbeit, Rat und Tat aus.

Herrn Prof. Dr. Tschochner möchte ich für die großzügige Überlassung des „Rotorgene“ danken.

Bei den Mitarbeitern des Lehrstuhls für Biochemie III bedanke ich mich dafür, dass ich den „Rotorgene“ so oft „blockieren“ durfte.

Bei den Mitarbeitern des Tierstalls, ganz besonders bei Franz Wiesenmeier, möchte ich mich vielmals für die kompetente Mithilfe beim Umgang mit den Mäusen und den Experimenten mit den Nacktmäusen bedanken.

Dr. Jürgen Klar danke ich für die geduldige Einführung in Theorie und Praxis des LightCyclers.

Meiner Mutter und meiner Schwester schulde ich großen Dank für wöchentliches Babysitten und Bekochen, ohne das ich noch lange nicht mit dem Zusammenschreiben fertig wäre. Ihnen und meinem Vater danke ich außerdem von ganzem Herzen für ihren unerschütterlichen Glauben an mich.

Meinem Ehemann Marc bin ich zutiefst dankbar, dass er mich während der Zeit im Labor ertragen hat. Ich danke ihm für die unendliche Geduld, die er mit mir bis zum Abschluss dieser Arbeit aufgebracht hat und dafür, dass er immer fest an meiner Seite steht.