

Aus dem Institut für Vegetative Physiologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**„Regulation von insulin-like growth factor binding protein 5 (IGFBP5)
durch den Wilmstumor Transkriptionsfaktor WT1 – Mechanismen und
pathophysiologische Konsequenzen“**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Miriam Müller
aus Bad Oldesloe

Datum der Promotion: 22.09.2017

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden – nach erfolgter Disputation (am 19.09.2016) dieser – veröffentlicht in:

Müller M, Persson AB, Krueger K, Kirschner KM, Scholz H. The Wilms tumor protein WT1 stimulates transcription of the gene encoding insulin-like growth factor binding protein 5 (IGFBP5). *Gene*. 2017 Jul 1; 619:21-29.

INHALTSVERZEICHNIS

ABSTRAKT	4
ABSTRACT	6
1 EINLEITUNG	8
1.1 Wilmstumor	8
1.2 <i>WT1</i> - Struktur, Funktion und Genprodukt.....	9
1.3 <i>WT1</i> in der Embryogenese	12
1.4 <i>WT1</i> im adulten Organismus.....	12
1.5 Die IGF-Achse	13
1.6 IGFBP5.....	17
1.7 Aufgabenstellung.....	20
2 MATERIALIEN	21
2.1 Geräte.....	21
2.2 Verbrauchsmaterialien	22
2.3 Chemikalien	23
2.4 Lösungen	25
2.5 Enzyme	26
2.6 Reaktionskits.....	26
2.7 Antikörper/Konjugate.....	27
2.8 Oligonukleotide	28
2.9 Plasmide.....	28
2.10 Zelllinien	29
2.11 Versuchstiere.....	30
3 METHODEN	31
3.1 Promotoranalyse.....	31
3.2 Microarray	31
3.3 Gewebegewinnung	31
3.4 RNA-Extraktion	32
3.5 cDNA-Synthese.....	32
3.6 Primerdesign.....	32
3.7 Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR).....	33

3.8 Protein-Extraktion.....	34
3.9 SDS-Elektrophorese und Westernblot.....	34
3.10 Immunhistologische Färbungen.....	35
3.11 Zellkultur.....	36
3.12 Transfektionsexperimente.....	36
3.13 ChIP-Assay.....	38
3.14 Statistik.....	39
4 ERGEBNISSE	40
4.1 Identifizierung potenzieller WT1-Zielgene.....	40
4.2 WT1 und IGFBP5 werden koreguliert.....	41
4.2.1 Die Expression von <i>Igfbp5</i> in M15-Zellen erfolgt <i>Wt1</i> -abhängig.....	42
4.2.2 Induktion von <i>WT1</i> führt zur Hochregulierung von <i>IGFBP5</i>	43
4.3 WT1 aktiviert den <i>IGFBP5</i> -Promotor.....	44
4.3.1 Promotoranalyse.....	44
4.3.2 WT1(-KTS) aktiviert den <i>Igfbp5</i> -Promotor.....	48
4.3.3 WT1 bindet an den <i>IGFBP5</i> -Promotor <i>in vivo</i>	49
4.4 Die Expression von <i>IGFBP5</i> wird durch Hypoxie stimuliert.....	51
4.5 <i>Igfbp5</i> -mRNA in adulten Mausgeweben.....	52
4.6 IGFBP5 wird in der Niere und im Knochen exprimiert.....	53
5 DISKUSSION.....	56
5.1 Die Expression von <i>IGFBP5</i> korreliert mit der zellulären WT1-Proteinmenge.....	56
5.2 IGFBP5 und WT1 spielen eine Rolle im Knochenstoffwechsel.....	58
5.3 Tumoren.....	61
6 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	65
7 LITERATURNACHWEIS	67
8 EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG + ANTEILSERKLÄRUNG.....	81
9 LEBENS LAUF.....	83
10 PUBLIKATIONS LISTE	85
11 DANKSAGUNG	86

ABSTRAKT

Das Wilmstumorgen *WT1* kodiert für einen Tumorsuppressor, bei dessen Funktionsverlust es zur Ausbildung von Wilmstumoren, frühkindlichen Nierentumoren, kommen kann. Durch Translation alternativ gespleisster *WT1*-Transkripte entstehen verschiedene Proteinisoformen, von denen manche als Transkriptionsfaktoren wirksam sind, während andere vermutlich bei der posttranskriptionellen mRNA-Prozessierung eine Rolle spielen. *WT1* ist entscheidend an der embryonalen Organogenese beteiligt und notwendig für die normale Entwicklung von Nieren, Gonaden und Mesothel. Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass *WT1* auch für die Funktion bestimmter Organe im erwachsenen Organismus erforderlich ist. Die Inaktivierung von *WT1* in adulten Mäusen verursacht eine schwere Osteoporose. Weiterhin fiel bei diesen Mäusen eine verminderte Serumkonzentration von IGF-I auf. Eine genomweite Microarray-Analyse zeigte eine enge Korrelation zwischen den mRNA-Niveaus von *WT1* und *IGFBP5*. *IGFBP5* ist eines von sechs IGF-bindenden Proteinen, gehört der IGF-Achse an und ist ein wichtiger Regulator der IGF-Aktivität im Knochen. Außerdem wird das Protein in einer Vielzahl von Tumoren exprimiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Lokalisation von *IGFBP5* im embryonalen (Maus, Ratte) und adulten Organismus (Maus, humane Zelllinien) untersucht. In der vorliegenden Arbeit sollte überprüft werden, ob eine Korrelation zwischen der Expression von *WT1* und *IGFBP5* besteht. Weiterhin sollten die molekularen Mechanismen einer möglichen Regulation der *IGFBP5*-Expression durch *WT1* analysiert werden. Es konnte gezeigt werden, dass *WT1* und *IGFBP5* in verschiedenen Zelllinien koreguliert werden. Mittels siRNA-Knockdown wurde nachgewiesen, dass die Expression von *Igfbp5* in murinen Mesonephroszellen *Wt1*-abhängig erfolgt. Die Induktion von *WT1* in UB27-Osteosarkomzellen führte zu einer Hochregulierung von *IGFBP5*-mRNA und *IGFBP5*-Protein. Durch eine *in-silico*-Analyse ließen sich vier potenzielle *WT1*-Bindungsstellen im *IGFBP5*-Promotor identifizieren. Hinweise auf eine mögliche Regulation des *IGFBP5*-Gens durch Sauerstoffmangel lieferte die Identifizierung eines HIF-1-Bindungsmotivs. Mit Hilfe von Reporterassays konnte gezeigt werden, dass die transkriptionell wirksame *WT1*(-KTS)-Variante den *IGFBP5*-Promotor aktiviert. *WT1*(+KTS)-Protein, das vermutlich an der posttranskriptionellen mRNA-Prozessierung beteiligt ist, hatte hingegen keinen signifikanten Einfluss auf die Promotoraktivität. Mittels Chromatin-Immunpräzipitation

wurde die Bindung von WT1(-KTS) an den *IGFBP5*-Promotor in UB27-Zellen *in vivo* überprüft. In Osteosarkom- und in Neuroblastomzellen ließ sich die Expression von *IGFBP5* durch Hypoxie stimulieren. Mittels quantitativer RT-PCR wurde die *IGFBP5*-mRNA in verschiedenen Organen der adulten Maus ermittelt. Eine besonders starke Expression zeigten Herz, Niere, ZNS und Skelettmuskel. Mittels Immunhistochemie ließ sich *IGFBP5* in der embryonalen Niere und im Knochen der Ratte darstellen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die *IGFBP5*-Expression durch den Wilmstumor-Transkriptionsfaktor reguliert wird. Dieser Regulationsmechanismus scheint vor allem im normalen und pathologisch veränderten Knochen eine Rolle zu spielen, die es weiter zu charakterisieren gilt.

ABSTRACT

The Wilms' tumor gene, *WT1*, encodes a zinc finger transcription factor that functions as a tumor suppressor and key regulator of developmental processes. *WT1* encodes several protein isoforms, of which WT1(-KTS) acts as a transcriptional regulator, while WT1(+KTS) is involved in RNA-processing. Recent findings indicate that WT1 is necessary for maintaining physiological bone integrity in the adult organism. Insulin-like growth factor binding protein-5 (IGFBP5) is one of six IGF-binding proteins, member of the IGF-family and also involved in osteogenesis and bone metabolism. As WT1, IGFBP5 is expressed in a number of malignant tumors.

In the present study, we aimed at clarifying the role of *IGFBP5* as a novel candidate target gene of *WT1*.

Genome-wide cDNA-microarray-analysis revealed a close correlation between the mRNA-levels of *WT1* and *IGFBP5*. While *IGFBP5* is mainly expressed in kidney and muscle tissues, WT1- and IGFBP5-proteins were co-localized by immunohistochemistry in the kidney and bone of embryonic rats and mice. siRNA-mediated silencing of *Wt1* in the murine mesonephros-derived cell line M15 reduced *Igfbp5*-mRNA-levels by approximately 80% compared to a non-targeting siRNA.

IGFBP5-transcripts- and IGFBP5-protein-levels were increased significantly in osteosarcomacells expressing the transcriptionally active WT1(-KTS)-protein. In contrast, the WT1(+KTS)-isoform, which has a presumed role in mRNA-processing rather than in transcriptional regulation, did not significantly change *IGFBP5*-expression in these cells. Bioinformatic analysis revealed four putative WT1-binding-sites in the 5'-flanking region of the human *IGFBP5*-gene. Reporter-gene-assays showed that WT1(-KTS) activates the *IGFBP5*-promoter, while WT1(+KTS) did not show any significant effect. By gradual shortening of the *IGFBP5*-promoter-construct, which abolished the putative WT1-binding-elements, this effect was abrogated. Chromatin-immunoprecipitation verified WT1 binding to the *IGFBP5*-promoter in vivo. Moreover, several hypoxia-responsive-elements (HREs = binding sites of hypoxia-inducible factors) could be detected, which is especially relevant given the hypoxic regulation of both *WT1* itself and a number of its target genes. Indeed, expression of *IGFBP5* in osteosarcoma and neuroblastoma cells was stimulated by hypoxia. These findings indicate that *IGFBP5* may act as a novel downstream effector

of *WT1* with potential roles in both normal and pathological bone-related processes, which remain to be elucidated.

1 EINLEITUNG

1.1 Wilmstumor

Wilmstumoren (Nephroblastome), erstbeschrieben durch den deutschen Chirurgen Max Wilms 1899, sind maligne Nierentumoren, die mit einer Prävalenz von 1:10.000 zumeist innerhalb der ersten fünf Lebensjahre bei Kindern auftreten. Es handelt sich hierbei um einen der häufigsten soliden Tumoren des Kindesalters, der als Prototyp für eine fehlgesteuerte Differenzierung und Entwicklung in der Embryonalphase gilt [1]. Die Histologie der Tumoren ist heterogen und besteht häufig aus drei verschiedenen Gewebekomponenten: undifferenzierten Mesenchymzellen, Stromazellen und Epithelzellen, die zum Teil schon in tubulären und glomerulären Strukturen organisiert sind [1]. Nephroblastome können aus postnatal persistierendem nephrogenem Restgewebe des embryonalen Nierenparenchyms entstehen, das bei ungefähr 1% der Neugeborenen vorkommt. Normalerweise bildet sich das embryonale Nierengewebe innerhalb der ersten Lebensjahre zurück, ohne pathologische Relevanz zu erlangen [1, 2, 3]. Bleiben jedoch die nephrogenen Reste erhalten und liegt zusätzlich eine genetische Prädisposition vor, können sie zu Vorläufern von Wilmstumoren werden [3].

Die den Wilmstumoren zugrunde liegenden genetischen Mechanismen sind komplex und zum Teil noch unbekannt. Ein familiäres Auftreten von Wilmstumoren findet sich in weniger als 1% der Fälle. Allerdings wurde ein gehäuftes Vorkommen in Assoziation mit anderen kongenitalen Störungen beobachtet, wie z.B.: dem WAGR-Syndrom, dem Denys-Dash-Syndrom, dem Beckwith-Wiedemann-Syndrom und dem Perlman-Syndrom [1, 4]. Man geht davon aus, dass Keimbahnmutationen in 10-15% der Fälle von *WT1*-Mutationen vorkommen [3]. Ein bereits seit längerem bekanntes Gen, bei dessen Mutation es zu Wilmstumoren kommen kann, ist das Wilmstumorgen *WT1*, das auf dem kurzen Arm des Chromosoms 11 (11p13) lokalisiert ist und einen Tumorsuppressor kodiert [5]. Tumorsuppressoren kontrollieren den Zellzyklus bzw. limitieren die Lebensdauer von Zellen und schützen den Organismus so vor der Entstehung maligner Neoplasien [6]. Mutationen und damit der Funktionsverlust eines Tumorsuppressorgens können maligne Neoplasien verursachen [6].

1.2 *WT1* - Struktur, Funktion und Genprodukt

Das *WT1*-Gen auf dem kurzen Arm des Chromosoms 11 (11p13) erstreckt sich über einen Bereich von ungefähr 50.000 Basenpaaren (bp) [4, 5]. Es beinhaltet 10 Exons und kodiert aufgrund von variablen Startcodons [7], alternativem Spleißen [8] und RNA-Editierung [9] für mehr als 30 verschiedene Proteinisoformen, die Molekülmassen zwischen 52 und 65 kDa aufweisen [10, 11]. Im *WT1*-Protein können verschiedene funktionelle Domänen unterschieden werden. Die charakteristische Zinkfingerdomäne besteht aus vier C-terminalen Cys²-His² Zinkfingern, welche für die DNA-Bindung notwendig sind [5, 12]. N-terminal findet sich eine prolin- und glutaminreiche Domäne, die für die Transkriptionsregulation verantwortlich ist und Protein-Protein-Interaktionen ermöglicht [11].

Durch alternatives Spleißen am Ende von Exon 9 kommt es zum Einschub der Aminosäuren Lysin (K), Threonin (T) und Serin (S) zwischen dem dritten und vierten Zinkfinger. Diese sogenannte *WT1(+KTS)*-Variante weist im Vergleich zur *WT1(-KTS)*-Isoform eine geringere Bindungsaffinität für DNA und eine erhöhte Affinität für RNA auf [8, 13]. Dementsprechend scheint die (+KTS)-Isoform eher eine Rolle bei posttranskriptionellen Prozessen als bei der Transkriptionskontrolle zu spielen [14]. Mäuse, die entweder nur die (+KTS)- oder die (-KTS)-Isoform exprimieren, sind postnatal letal und weisen bereits während der Embryonalentwicklung verschiedenartige Störungen der Nieren- und Gonadendifferenzierung auf. Dies zeigt, dass beide Isoformen essentielle, wenn auch unterschiedliche, Funktionen während der Embryogenese ausüben [10]. Die (-KTS)-Isoform, die ungefähr ein Drittel aller *WT1*-Proteinvarianten ausmacht, ist als Transkriptionsfaktor wirksam [10].

Bekannte *WT1*-Zielgene kodieren u.a. für Wachstumsfaktoren, wie den Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor-II (IGF-II, Insulin-like growth factor-II) [15], Wachstumsfaktorrezeptoren wie den Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor-I-Rezeptor (IGF-IR, Insulin-like growth factor-Ireceptor) [16], Apoptoseregulatoren wie B-Zell Lymphom 2 (BCL2, B-cell lymphoma 2) [17], Zellzyklusregulatoren wie Cyclin E [18], das für die Geschlechtsdifferenzierung in der Embryogenese notwendige Wnt-4 (wingless-type MMTV integration site family member 4) [19] und das für die Hämatopoese essentielle Erythropoietin (EPO) [20] sowie den Erythropoietin-Rezeptor (EPO-Rezeptor) [21].

Eine weitere Isoform ist WT1(+17AA), die durch alternatives Spleißen von Exon 5 entsteht und eine N-terminale Insertion von 17 Aminosäuren aufweist [22, 23]. Die Funktion dieser WT1-Isoform konnte bis jetzt noch nicht endgültig geklärt werden. Jedoch gibt es Hinweise, dass sie eine antiapoptotische Wirkung im intrinsischen Apoptose-Weg der Mitochondrien besitzt [23].

Interessanterweise wird *WT1* in vielen Tumoren des Erwachsenen (u.a. in Kolorektal-, Brust-, Desmoid- und Hirntumoren) deutlich stärker als in den entsprechenden gesunden Geweben exprimiert [10]. Auf Grund dessen wird vermutet, dass WT1 auch onkogene Eigenschaften besitzt und das Tumorwachstum fördern kann. Mehrere Studien legen eine duale Funktion von WT1 als Tumorsuppressor und Onkogen nahe [24]. Erwähnenswert ist, dass die Expression von *WT1* unter hypoxischen Bedingungen hochreguliert ist [59]. Darüber hinaus spielt WT1 ebenfalls eine Rolle in der Angiogenese und Vaskularisierung, Mechanismen die für die Sauerstoffversorgung und damit das Überleben eines Tumors essentiell sind [24]. Es gibt bereits Studien, die sich mit der Entwicklung einer Anti-WT1-Immuntherapie bei Krebserkrankungen befassen [25, 26]. Die duale Funktion von WT1 als Tumorsuppressor und Onkogen ist möglicherweise auf die Interaktion mit unterschiedlichen Proteinbindungspartnern zurückzuführen, ist aber im Detail noch nicht verstanden [24].

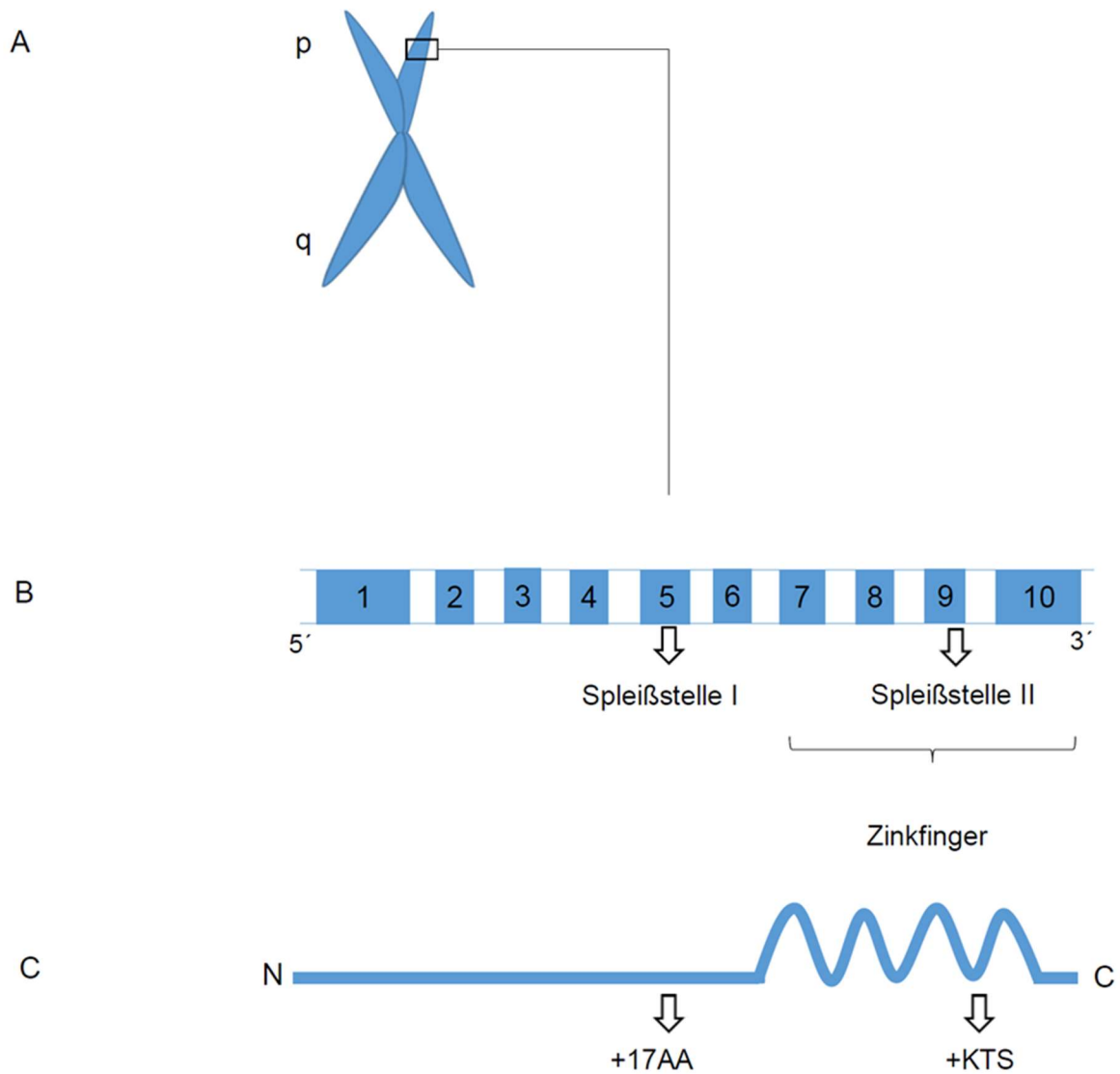


Abb. 1: Aufbau des *WT1*-Genlokus und Domänenstruktur des *WT1*-Proteins

Der *WT1*-Genlokus befindet sich beim Menschen auf dem kurzen Arm von Chromosom 11 (A). Das *WT1*-Gen besteht aus 10 Exons und umfasst ungefähr 50.000 Basenpaare (B) [4, 5, 7]. Die Exons sind in der Abbildung blau, die Introns weiß markiert. Durch alternatives Spleißen von Exon 5 bzw. am Ende von Exon 9 entstehen verschiedene Isoformen des *WT1*-Proteins (C) [8]. Die Exons 7-10 kodieren für die vier charakteristischen Zinkfinger. Zwischen Zinkfinger 3 und 4 werden bei der *WT1*(+KTS)-Isoform die drei Aminosäuren Lysin (K), Threonin (T) und Serin (S) eingeschoben [5, 12]. Den *WT1*(-KTS)-Isoformen fehlt diese Spleißinsertion. Sie besitzen im Vergleich zur *WT1*(+KTS)-Variante eine höhere DNA-Bindungsaffinität und sind als Transkriptionsregulatoren wirksam. Beim alternativen Spleißen von Exon 5 kommt es zur Insertion von 17 Aminosäuren in die N-terminale prolin- und glutaminreiche Region und es entsteht *WT1*(+17AA) [11, 14, 15, 16].

1.3 WT1 in der Embryogenese

WT1 spielt nicht nur in der Entstehung von Wilmstumoren eine Rolle, sondern ist auch in der embryonalen Organogenese von zentraler Bedeutung. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass ein homozygoter Knock-out von *Wt1* (*Wt1* $-/-$) bereits pränatal zum Tod der Embryonen führt [27]. Auffälliges Merkmal der *Wt1*-defizienten Embryonen ist eine Störung der Nierenentwicklung. In der Niere wird ein hohes *Wt1*-Expressionniveau während der Embryonalphase in den „comma- und S-shaped-bodies“ erreicht. Ist die Nierenentwicklung abgeschlossen, sinkt auch die *Wt1*-Expression. In der adulten Niere ist die Expression von *Wt1* auf die Podozyten der Glomeruli beschränkt [28]. Heterozygote-*Wt1*-Mäuse (*Wt1* +/-) entwickelten trotz annähernd normalem *Wt1*-Expressionsniveau mit zunehmendem Lebensalter eine Proteinurie und Glomerulosklerose, die zum Tode durch Nierenversagen führt [28].

Neben der embryonalen Niere wird *Wt1* auch in anderen Organen stark exprimiert, die während der Entwicklung eine mesenchymal-epitheliale Transition (MET) durchlaufen [29]. Hierbei handelt es sich um einen Prozess, bei dem sich multipolare, spindelförmige Mesenchymzellen in planare polare Epithelzellen transformieren. Der umgekehrte Vorgang wird epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) genannt. Hierbei verlieren Epithelzellen ihre Adhäsivität und werden zu einwandernden mesenchymalen Stammzellen. Beide Prozesse spielen sowohl eine Rolle in der normalen Entwicklung als auch in der Entstehung von Krebs [29]. Nicht nur auf die Nierenentwicklung hat eine Inaktivierung von *Wt1* dramatische Auswirkungen, auch die Organogenese von Gonaden, Nebennieren, Milz, Retina, Mesothel, Herz und Diaphragma ist gestört [29, 30]. Vermutlich spielt WT1 während der Entwicklung für die Regulation der mesenchymal-epithelialen Balance in diesen Organen eine wichtige Rolle [31].

1.4 WT1 im adulten Organismus

Während über die Rolle von WT1 in der Embryonalentwicklung bereits einiges bekannt ist, liegen zur Funktion im adulten Organismus bislang wenige Erkenntnisse vor. Die induzierte ubiquitäre Deletion von *Wt1* verursachte bei adulten Mäusen eine Abnahme der Verhaltensaktivität und generalisierte Ödeme. Genaue Analysen der Organe und Gewebe ergaben eine Atrophie von Niere, Herz, Milz, Pankreas, Knochen, sowie des

Fettgewebes. Lunge, Leber und Darm wiesen keine pathologischen Veränderungen auf [30].

Die Untersuchungen von Chau et. al. legen dar, dass WT1 für den Erhalt einer normalen Knochenstruktur bei Mäusen notwendig ist. Die Knochenarchitektur *Wt1*-defizienter Mäuse ist massiv gestört. Sowohl die Anzahl der Trabekel, als auch deren Dicke und Verzweigungen sind um ca. 30% gegenüber der Kontrollgruppe reduziert [30]. Da es sich bei der Knochenbildung um einen vergleichsweise langsam ablaufenden Prozess handelt, spricht der sich innerhalb weniger Tage nach induzierter *Wt1*-Deletion ausbildende Phänotyp für eine massiv gesteigerte Knochenresorption. Diese These wird durch den Nachweis einer Zunahme der Osteoklasten in den pathologisch veränderten Knochen gestützt [30]. Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass WT1 eine entscheidende Rolle für die Knochenhomöostase bzw. den Knochenstoffwechsel spielt. Eine Untersuchung des Serums der mutierten Mäuse zeigte zusätzlich eine deutliche Reduktion des IGF-I-Proteinniveaus [30].

1.5 Die IGF-Achse

Die Experimente von Chau et. al. ergaben weiterhin, dass eine induzierte ubiquitäre Deletion von *Wt1* bei adulten Mäusen zu einer verminderten Serumkonzentration von Insulin-ähnlichem Wachstumsfaktor-I (IGF-I, Insulin-like growth factor-I) führt [30]. IGFs sind Polypeptide, die eine strukturelle und funktionelle Ähnlichkeit mit Insulin aufweisen [32]. Sie gehören der IGF-Achse an, welche zudem aus 2 membranständigen IGF-Rezeptoren (IGF-IR und IGF-IIR), 2 Liganden (IGF-I und IGF-II), mehreren IGF-bindenden Proteinen (IGFBP1-6, insulin-like growth factor binding proteins) und IGFBP-Proteasen besteht [33]. IGFs sind Hormone, die sowohl endokrin als auch para- bzw. autokrin sezerniert werden. Als mitogene Faktoren regulieren sie die Proliferation und Differenzierung von Zellen und Geweben im fetalen und adulten Organismus. Auch in der Genese von malignen Neoplasien spielen sie eine Rolle, wie an Hand der erhöhten autokrinen IGF-Expression von Tumoren gezeigt werden konnte [34].

Es sind zwei Rezeptoren bekannt, über die IGFs wirken. IGF-IR ist eine heterotetramere Tyrosinkinase, welche aus zwei α - und zwei β -Untereinheiten besteht ($\alpha_2 \beta_2$) und dem Insulinrezeptor ähnelt. Liganden dieses Rezeptors sind sowohl IGF-I als auch IGF-II [32,

35]. Im Gegensatz dazu ist IGF-IIIR ein aus lediglich einer Einheit bestehendes Transmembranprotein, das auch als Mannose-6-Phosphat-Rezeptor bekannt ist. Seine Funktion ist aktuell noch unzureichend untersucht [32, 37].

Die Aktivität von IGFs ist jedoch nicht nur von der Interaktion mit den Rezeptoren abhängig, sondern wird auch über die Expression von *IGFBPs* reguliert. Die Wirkung der *IGFBPs* auf die Aktivität der IGFs erfolgt dosisabhängig und kann sowohl inhibitorisch als auch stimulierend sein [33, 35]. Es wird angenommen, dass *IGFBPs* ebenso wie IGFs selbst früh in der Evolution von Wirbeltieren entstanden sind, da sie eine hochkonservierte Struktur aufweisen. Alle *IGFBPs* bestehen aus drei Domänen, wobei die konservierte aminoterminal Domäne (N) sechs Disulfidbrücken (außer *IGFBP6*) und die konservierte carboxyterminale, cysteinreiche Domäne (C) drei Disulfidbrücken enthält. Die zentrale Domäne verbindet N- und C-Terminus miteinander und ist vor allem für posttranslationale Modifikationen, wie Proteolyse, Glykosylierung und Phosphorylierung der Proteine verantwortlich ist. Sie ist diejenige Domäne, die letztendlich den strukturellen und damit auch funktionellen Unterschied der *IGFBPs* ausmacht [36]. Weitere Subdomänen spielen u.a. eine Rolle bei der Phosphorylierung oder bei der Bindung von Heparin oder Leucin-reichem-Glykoprotein (ALS, leucin-rich-glycoprotein) [35].

Mehr als 95% der im Plasma vorkommenden IGFs sind spezifisch an *IGFBPs* gebunden [32]. *IGFBP3*, das den größten Anteil der zirkulierenden *IGFBPs* einnimmt, transportiert mehr als 75% des Serum-IGF-I und -II und bildet dabei Dreifachkomplexe mit ALS aus [35]. Auch *IGFBP5* bildet Dreifachkomplexe mit einem IGF und ALS aus, macht jedoch nur ungefähr 10% des Gesamtanteils aus. Mehr als 90% des gesamten *IGFBP3* und 55% des gesamten *IGFBP5* sind im gesunden erwachsenen Organismus in diesen Komplexen gebunden [35 38]. Darüber hinaus können alle sechs *IGFBPs* auch in freier Form bzw. im Zweifachkomplex mit einem IGF zirkulieren. Es wird vermutet, dass freie *IGFBPs* und Zweifachkomplexe die Blutbahn relativ schnell wieder verlassen, wohingegen Dreifachkomplexe im Gefäßsystem verbleiben [35].

Obwohl die *IGFBPs* miteinander strukturverwandt sind, hat doch jedes seine spezifischen Eigenschaften und Funktionen [36]. Die meisten Zellen exprimieren mehr als ein *IGFBP*, was dafür spricht, dass jedes von ihnen eine eigene wichtige regulatorische Rolle spielt [35].

Es wurden auch IGF-unabhängige oder IGF-R-unabhängige Signalwege beschrieben. Sowohl intakte IGFBPs als auch proteolytische Fragmente zeigten dabei einen Effekt. Beispiele für diese IGF-unabhängigen Pfade sind z.B. Apoptoseinduktion bzw. –modulation durch IGFBP3 oder aber die Mitosestimulation von Osteoblasten durch IGFBP5 Fragmente [35, 39]. Eine Vielzahl von Proteasen hydrolysieren IGFBPs und greifen regulierend in die IGF-Achse ein, indem sie IGF aus der Bindung von IGFBPs freisetzen und die gegenseitige Affinität der beiden Bindungspartner herabsetzen [32, 33, 35]. In anderen Studien konnte gezeigt werden, dass IGFBP5 z.B. im Knochen durch die Bindung von IGF-I, Heparin oder anderen extrazellulären Proteinen vor der Proteolyse durch IGFBP Proteasen geschützt wird [32, 40]. Ein weiterer regulatorischer Mechanismus ist die Fähigkeit von IGFBPs extrazelluläre Matrix (EZM), extrazelluläre Proteine (EZP) oder Glykosaminglykane (GAG) zu binden, wodurch die Affinität zwischen IGF und IGFBPs ebenfalls reduziert wird [32].

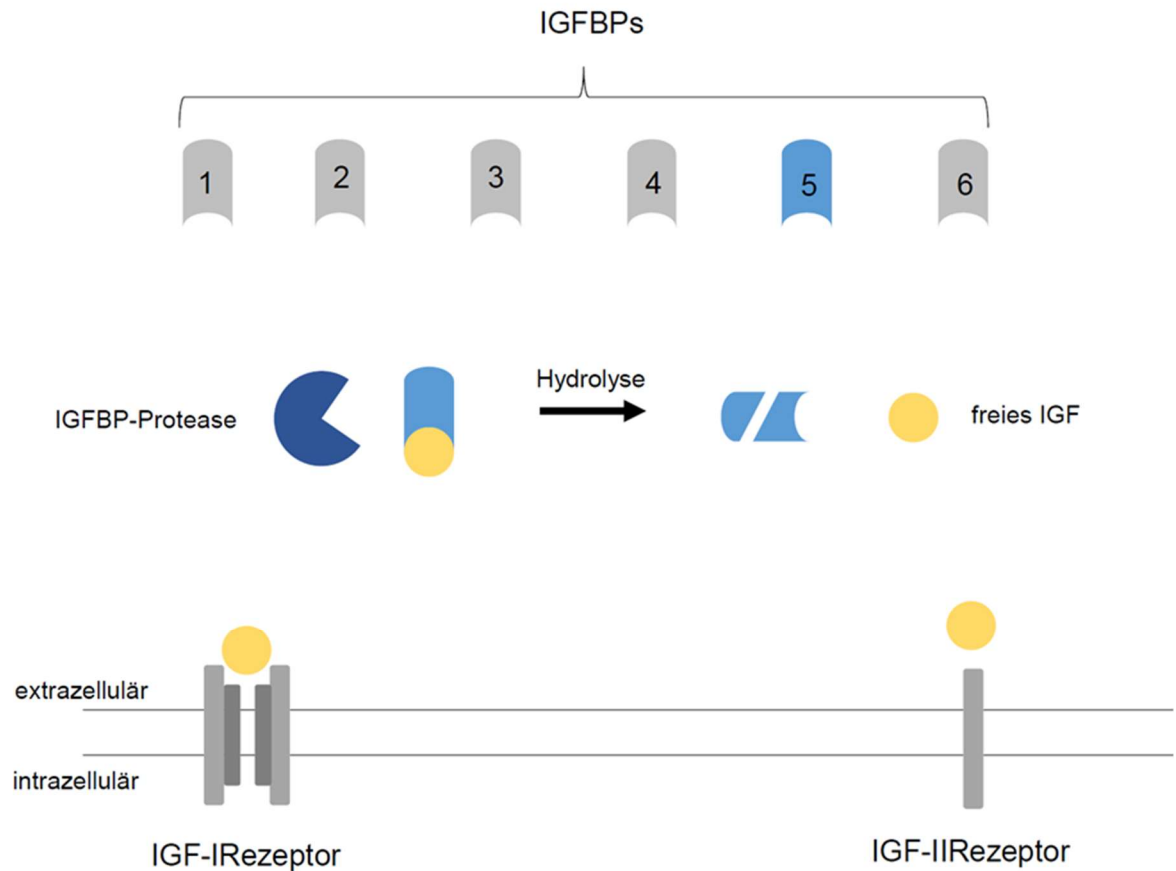


Abb. 2: Schematische Darstellung der IGF-Achse

IGFs sind Insulin-ähnliche Wachstumsfaktoren (insulin-like growth factor) und die Liganden der IGF-Achse [32, 33]. Strukturell unterscheidet man IGF-I (gelb) und IGF-II (hier nicht dargestellt). Es gibt zwei Rezeptoren, an die IGF bindet und seine biomolekulare Wirkung entfaltet. Der IGF-I-Rezeptor (IGF-IR) ist eine heterotetramere Tyrosinkinase und besteht aus vier Untereinheiten. Er ähnelt in seiner Struktur stark dem Insulin-Rezeptor [32, 35]. Der IGF-II-Rezeptor (IGF-IIR) ist ein singuläres Transmembranprotein und auch bekannt als Mannose-6-Phosphat-Rezeptor [32, 36, 37]. Des Weiteren zählen zur IGF-Familie sechs bindende Proteine, IGFBPs (grau bzw. blau 1-6). IGFBPs können IGF binden und sowohl inhibitorisch als auch stimulierend wirken. IGFBPs können durch spezifische Proteasen (dunkelblau) hydrolysiert werden, wodurch IGF aus der Bindung freigesetzt [32, 33, 35].

1.6 IGFBP5

Das für IGFBP5 kodierende Gen ist beim Menschen auf Chromosom 2 lokalisiert. Bestehend aus 4 Exons und 3 Introns, weist es eine Größe von 33kb auf [36] und liegt in unmittelbarer Nachbarschaft zum *IGFBP2*-Gen [32].

Die große strukturelle und funktionelle Übereinstimmung der einzelnen IGFbps und ihre teilweise überlappende Lokalisation legen die Vermutung nahe, dass es sich um die Duplikate eines gemeinsamen Ursprungsgens handelt [36]. Dabei scheint IGFBP5 mit einer Übereinstimmung der Aminosäuresequenz von 97% zwischen Mensch, Maus und Ratte das zwischen den verschiedenen Spezies am stärksten konservierte IGFBP zu sein [41].

IGFBP5 weist eine klassische nukleäre Lokalisierungssequenz (bipartite nuclear localization signal) in der Region auf [32] und konnte in transfizierten Zellen sowohl im Zellkern als auch im Zytosol nachgewiesen werden [42]. Dabei weist die nukleäre Lokalisation auf eine Rolle in der Expressionsregulation hin [36]. Die Wirkung von IGFBP5 scheint an seine intrazelluläre Lokalisation gekoppelt zu sein. So besteht ein Zusammenhang zwischen dem biologischen Effekt von IGFBP5 und einer Bindung an die Zellmembran [43].

Die IGFBP5-Serumkonzentration steigt während der Pubertät stark an und nimmt im Alter ab [44]. Der wichtigste bekannte Regulator der IGFBP5-Expression ist sowohl *in vitro* als auch *in vivo* IGF-I [36]. Aber auch IGF-II und Insulin können die Expression stimulieren. Außerhalb der IGF-Achse sind einige Hormone (FSH, GH, TSH, PTH), Zytokine (Interleukin-6) und andere Moleküle bekannt, die IGFBP5 regulieren. Eine Regulation in Osteoblasten *in vitro* konnte für: IGF-I, IGF-II, GH, Interleukin-6, PTH, Prostaglandin E2, Retinsäure, Vitamin D3 gezeigt werden [36].

IGFBP5 selbst ist ein wichtiger Regulator der IGF-Aktivität im Knochen und ein Stimulus der Mitogenese in Osteoblasten [35]. Außerdem hat IGFBP5 eine hohe Affinität für Proteine der extrazellulären Matrix und die Fähigkeit Hydroxylapatit zu binden. Unter anderem wegen dieser Eigenschaften wird vermutet, dass IGFBP5 als eine Art Speicher und Wirkungsverstärker für IGF-II im Knochen dienen [35]. Interessanterweise ist Knochen das einzige Gewebe, in dem die IGF-II Konzentration höher als im Serum ist [36].

IGFs sind wichtige Regulatoren des Knochenstoffwechsels. Dies ergibt sich u.a. aus der Beobachtung, dass ein IGF-Knockout bei Mäusen zu einer starken Beeinträchtigung des Knochenwachstums führt [35]. Eine Verabreichung von IGFBP5 führte hingegen zu einer verstärkten Knochenbildung und einer reduzierten Knochenresorption [35]. IGFBP5 ist ein für den gesunden Knochenstoffwechsel essentielles Molekül und Störungen des Gleichgewichts führen zu Pathologien wie Osteoporose [45] oder renaler Osteodystrophie [46]. Zu beachten ist an dieser Stelle die enge Verbindung zwischen Knochen- und Nierenstoffwechsel.

Neben den physiologischen Prozessen, die IGFBP5 im Knochen und der Niere reguliert, scheint es eine maßgebliche Rolle in der Proliferationskontrolle bestimmter Tumorzellen zu spielen. Es konnte gezeigt werden, dass IGFBP5 in einer Vielzahl von Tumoren und Krebszelllinien stark exprimiert wird [36]. IGFBP5 stimuliert u.a. das Wachstum von Prostatakarzinomzellen, fördert das Überleben von Mammakarzinomzellen durch Hemmung der Apoptose und verstärkt das Tumorwachstum im Tiermodell [36]. Allerdings hemmt IGFBP5 die Proliferation von Zervixkarzinom- und Osteosarkomzellen, so dass seine Wirkung vom Zelltyp abhängig zu sein scheint. Die genaue biologische Rolle von IGFBP5 beim Tumorwachstum bleibt damit vorerst uneindeutig [36].

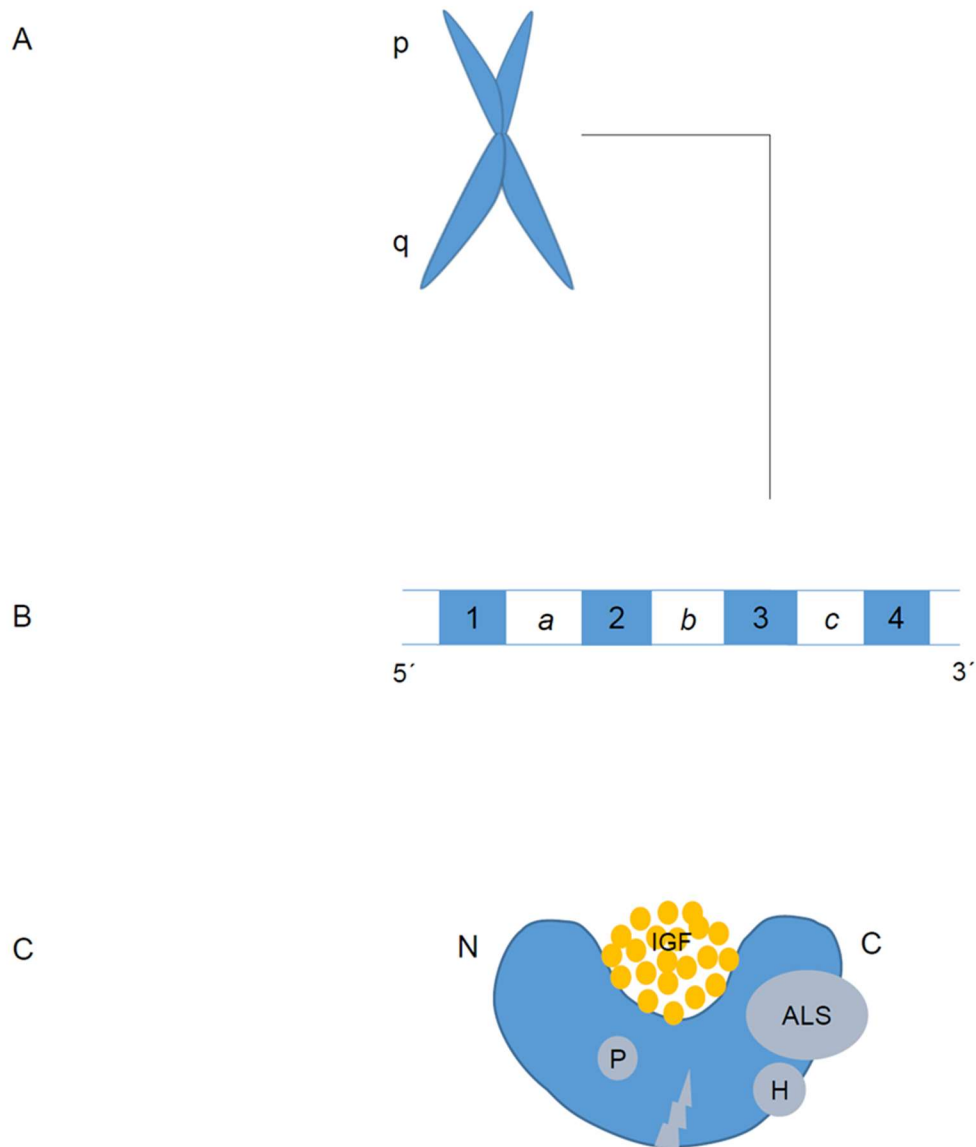


Abb. 3: Übersicht IGFBP5

Das humane *IGFBP5*-Gen ist auf Chromosom 2 lokalisiert (A) und besteht aus 4 Exons (blau, 1 bis 4) und 3 Introns (weiß, a bis c) (B) [36]. Das Genprodukt (C) besitzt drei funktionelle Domänen: die konservierte aminoterminal Domäne (N), die konservierte, cysteinreiche carboxylterminale Domäne (C) und eine zentrale Domäne. Sowohl der N-Terminus als auch der C-Terminus verfügen über IGF-Bindungsstellen. Es ist anzunehmen, dass beide Domänen eine Art Tasche bilden und somit gemeinsam an der Bindung von IGF (gelb) beteiligt sind [35]. Die zentrale Domäne enthält ein Heparin-bindendes und ein ALS-bindendes Motiv sowie mehrere potenzielle Phosphorylierungsstellen. Ebenso findet sich hier die Angriffsstelle für Proteasen [35]. Die C-terminale Domäne verfügt zusätzlich über weitere Bindungsstellen für Heparin (H) und ALS (grau). Ebenso können hier extrazelluläre und membranständige Proteine binden [35, 36].

1.7 Aufgabenstellung

Um neue *WT1*-Zielgene zu identifizieren, wurde eine genomweite cDNA-Microarray-Analyse mit einer Mesonephroszelllinie (M15 Zellen) durchgeführt. *Wt1* ist in M15 Zellen robust exprimiert und lässt sich durch Transfektion von siRNA herabregulieren. Die Auswertung der Microarrays ergab eine signifikant verminderte Expression von *Igfbp5* nach *Wt1*-Silencing. Im Rahmen dieser Arbeit soll die Frage geklärt werden, ob es sich bei *IGFBP5* um ein neues Zielgen des Wilmstumor-Transkriptionsfaktors *WT1* handelt. Weiterhin sollen die molekularen Mechanismen der Interaktion von *WT1* mit dem *IGFBP5*-Gen und die Funktionalität dieser Wechselwirkung näher untersucht werden. Folgende Herangehensweise wurde gewählt, um die Regulation des *IGFBP5*-Gens durch *WT1* zu charakterisieren.

1. Zunächst wurde das Ergebnis der Microarrays mittels Überexpression bzw. Knockdown von *WT1* und anschließender *IGFBP5*-mRNA-Quantifizierung in verschiedenen Zelllinien überprüft. Auf diese Weise sollte ermittelt werden, ob tatsächlich eine Korrelation zwischen der Expression von *WT1* und *IGFBP5* besteht.
2. Mittels immunhistochemischer Färbungen wurde *IGFBP5* in embryonalen und adulten Geweben lokalisiert. Dadurch sollte überprüft werden, ob *WT1* und *IGFBP5* ähnlich verteilt sind.
3. Schließlich wurde untersucht, ob *WT1* an den Promotor des *IGFBP5*-Gens bindet und diesen reguliert. Auf diese Weise sollte der molekulare Mechanismus der Regulation des *IGFBP5*-Gens durch *WT1* aufgeklärt werden.

2 MATERIALIEN

Vorbemerkung

Für Techniken, die sterile Lösungen, Materialien und Medien erfordern, erfolgte die Sterilisation in einem Standard-Autoklaven (HP Medizintechnik GmbH, Oberschleißheim, Deutschland) mindestens 30 min lang bei 134 °C und 2,2 bar. Die Glaswarensterilisation wurde in einem Trockenschrank bei 180 °C vorgenommen. Die Sterilfiltration temperaturempfindlicher Lösungen erfolgte über 0,2 µm Celluloseacetatfilter (Sartorius, Göttingen, Deutschland).

2.1 Geräte

Tabelle 1

Gerät	Hersteller
Blautisch Safe Imager	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Homogenizer Ultra-Turrax	IKA-Werke, Staufen, Deutschland
Hybridization oven/shaker	GE Healthcare Life science, Amersham, Großbritannien
Feinwaage	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop Axiovert100	Zeiss, Jena, Deutschland
Flüssigstickstofftank	MVE Biomedical, Garfield Heights, USA
Kamera RT Power Supply	SPOT Imaging Solutions, Burroughs, USA
Kippschüttler Polymax 1040	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Kryostat Jung CM 3000	Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland
Kühlschrank 4°C	Liebherr, Bulle, Schweiz
Kühlschrank -20°C	Liebherr, Bulle, Schweiz
Labsonic Ultraschallhomogenisator	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Light Cycler PCR StepOnePlus	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Luminometer	Berthold Technologie, Bad Wildbad, Deutschland

Magnetrührer	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Microwelle	Whirlpool Corporation, Benton Harbor, USA
Mikroskop Axiovert 35	Zeiss, Jena, Deutschland
Mikroskop Axiovert S100	Zeiss, Jena, Deutschland
Mikroskop Leica DM2500 confocal laser	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Mikroskoplampe	Zeiss, Jena, Deutschland
Spectrophotometer NanoDrop 2000	Thermo Fisher Scientific, Bonn, Deutschland
Test tube Thermostat TCR100	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Thermoblock	Biometra, Göttingen, Deutschland
Trans-Blot® SD Semidry Apparatur	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Vortex-2 Genie	Scientific Industries, New York, USA
Zellinkubator	Binder, Tuttlingen, Deutschland
Zellkultursterilbank Herasafe	Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland
Zentrifuge (5415R; Rotor F45-24-11)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge (Universal RF; Rotor:1412)	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Zentrifuge (3k15; Rotor:11223)	Sigma Laborzentrifugen, Osterode am Harz, Deutschland

2.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2

Material	Hersteller
Blottingmembran (PVDF)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Deckgläser	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Filterpapier	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Gefäße 1,5 und 2,0 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Serologische Pipetten	TPP Techno Plastic Products, Trasadingen, Schweiz
Minisäulen	Qiagen, Hilden, Deutschland
Objektträger	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
PCR 96-well TW-MT-Platten	Biozyme Scientific, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Röntgenfilm Amersham Hyperfilm ECL	GE Healthcare Life Sciences, Freiburg, Deutschland
Zellkultur 12-well Platte	TPP Techno Plastic Products, Trasadingen, Schweiz
Zellkultur 24-well Platten	TPP Techno Plastic Products, Trasadingen, Schweiz

2.3 Chemikalien

Alle Standardchemikalien wurden von der Carl Roth GmbH bezogen. Soweit nicht anders erwähnt, wurden handelsübliche Chemikalien in Analysequalität und Biochemikalien bei den unten aufgelisteten Firmen erworben.

Tabelle 3

Chemikalie	Hersteller
Acrylamid/Bisacrylamid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Agarose	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Antibody Diluent Reagent Solution	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Aquatex	Merck, Darmstadt, Deutschland
Bromphenolblau	Biomol, Hamburg, Deutschland
Chloroform	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
DMEM high Glucose+L-Glutamin	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
DMEM+FCS 10%	PAA Laboratories, Pasching, Österreich

dNTP 10mM	Bioline, Luckenwalde, Deutschland
DTT	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Eosin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Fetales Kälber Serum (FCS)	Thermo Fischer Scientific, Bonn, Deutschland
FuGENE6	Roche, Mannheim, Deutschland
Hämalaun	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
H ₂ O ₂	Merck, Darmstadt, Deutschland
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kodak RP X-OMAT Entwickler	Kodak, Stuttgart, Deutschland
Kodak RP X-OMAT LO Fixierer	Kodak, Stuttgart, Deutschland
L-Glutamin	PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland
Methanol	JTBaker, Center Valley, USA
Milchpulver	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
OligodT-Primer	New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland
Protein Block Serum-free	Dako, Hamburg, Deutschland
SYBRgreen	Roche, Mannheim, Deutschland
SYBR Safe	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
TEMED Tetramethylethyldiamin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tetrazyklin	PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland
Tissue-Tek O.C.T. compound	Sakura Finetek, Alphen aan den Rijn, Niederlande
Triton X-100	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trizol	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
TWEEN-20	Serva, Heidelberg, Deutschland
Trypsin/EDTA 10x in PBS 0,5%/0,2%	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Vectashield+DAPI	Vector Laboratories, Burlingame, USA

Xylol

Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

2.4 Lösungen

Alle Lösungen wurden mit dd-H₂O (bidestilliertem Wasser) aus einer Reinstwasseranlage (Millipore) angesetzt.

Tabelle 4

Methode	Puffer	Zusammensetzung
Agarosegel	5xTBE-Puffer	445 mM Tris-Base (pH 8,0); 445 mM Borsäure; 10 mM Ethylendiamintetraacetat (EDTA)
	1xDNA-Ladepuffer	10 mM Tris-HCl, 0,15 % Orange G, 0,03% Xylencycnol, 60 % Glycerin, 60 mM EDTA, H ₂ O
Immunhistologische Färbung	10x Citratpuffer	18 mM Zitronensäure, 82 mM Trisodiumcitrat; pH 6.0
Protein-Extraktion	Laemmli-Puffer	50 mM Tris-HCl (pH 6.8); 4 M Urea; 1 % (w/v) SDS; 7,5 mM Dithiothreitol
Transfektion	Firefly Reagenz	470 µM D-Luciferin; 270 µM Coenzym A; 33,3 mM Dithiothreitol; 530 µM ATP; 2,67 mM MgSO ₄ ; 20 mM Tricin; 100 µM Na ₂ EDTA; pH 7,8
Waschen	PBS	137 mM NaCl; 10 mM Na ₂ HPO ₄ ; 2,7 mM KCl; 2 mM KH ₂ PO ₄ ; pH 7,4
Western Blot, SDS-PAGE	1xBlotting-Puffer	10 mM 6-Aminohexansäure; 10 % (v/v) Methanol
	Sammelgelpuffer	1 M Tris-HCl (pH 7,6); 0,8 % (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS)
	Sammelgel	4% (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid; 13 % (v/v) Sammelgelpuffer; 1 µl/ml TEMED; 10 µl/ml APS

10xSDS-	0,25 M Tris-Base; 1,92 M Glycin; 1 % (w/v)
Laufpuffer	SDS (pH 8,3)
TBS-Tween20-	20 mM Tris-Base (pH 7,6); 137 mM; 0,05%
Puffer	(v/v) TWEEN 20
Trenngelpuffer	1,5 M Tris-HCl (pH 8,8); 0,4 % (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS)
Trenngel	10 % (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid; 25 % (v/v) Trenngelpuffer; 0,5 µl/ml TEMED; 5 µl/ml APS

2.5 Enzyme

Tabelle 5

Enzym	Hersteller
Proteinase K	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Restriktionsendonukleasen	Promega, Mannheim, Deutschland
RNAse A	Boehringer, Ingelheim, Deutschland
RNAse T1	Boehringer, Ingelheim, Deutschland
RNA-Polymerase	Roche, Mannheim, Deutschland
T4 DNA Ligase	Promega, Mannheim, Deutschland

2.6 Reaktionskits

Tabelle 6

Kit	Hersteller
AmpliTaq Gold® DNA Polymerase	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
FuGENE® 6 Transfection Reagent	Roche, Mannheim, Deutschland
QuickManual Renilla-Juice Kit	p.j.k., Kleinbittersdorf, Deutschland
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland

SuperScript® Reverse Transcriptase	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Western Lightning Plus ECL	PerkinElmer, Rodgau, Deutschland

2.7 Antikörper/Konjugate

Tabelle 7

Antigen	Zielspezies	Spezies, Isotyp	mono-/ polyklonal	prim./sek./ Markierung	Hersteller
<i>Wt1</i> (180)	Maus, Ratte, Mensch	Kaninchen IgG	polyklonal	primär	Santa Cruz SC-846 Lot #E057
<i>WT1</i> C-19	Maus, Ratte, Mensch	Kaninchen IgG	polyklonal	primär	Santa Cruz SC-192 Lot #G1007
IGFBP5 C-18	Maus, Ratte, Mensch	Ziege IgG	polyklonal	primär	Santa Cruz SC-6006 Lot #D1509
Aktin	Maus, Ratte, Mensch	Maus IgG	monoklonal	primär	Santa Cruz SC-47778 Lot #K2706
IgG	Ziege	Esel		sekundär, Cy2	Jackson 705-166-147
IgG (H+L)	Kaninchen	Esel		sekundär, Cy3	Jackson 711-165-152
IgG	Ziege	Esel		sekundär, HRP	Santa Cruz SC-2304
IgG	Kaninchen	Ziege		sekundär, HRP	Santa Cruz SC-2004
Proteinblock- serum					Dako X0909

Antibody	Invitrogen
Diluent	003218

2.8 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins MWG GmbH synthetisiert. „F“ und „R“ bezeichnen Vorwärts- und Rückwärtsprimer.

Tabelle 8

Name	Sequenz
h beta Aktin F1	AGA AAA TCT GGC ACC ACA CC
h beta Aktin R1	GCC ATC TCT TGC TCG AAG TC
h <i>IGFBP5</i> F1	CAA GAG AAA GCA GTG CAA ACC
h <i>IGFBP5</i> R1	AGA TGA AAT GAG TGG CGT CC
h <i>WT1</i> F1	ACA GGG TAC GAG AGC GAT AAC CA
h <i>WT1</i> R1	CAC ACG TCG CAC ATC CTG AAT
m beta Aktin F1	CCG CGA GCA CAG CTT CT
m beta Aktin R1	GGG TAC TTC AGG GTC AGG AT
m <i>Igfbp5</i> F1	CAA CGA AAA GAG CTA CGG CG
m <i>Igfbp5</i> R1	TCT CAT CTC AGG TGC AGG GA
m <i>Wt1</i> F1	TCC CAG CTT GAA TGC ATG AC
m <i>Wt1</i> R1	CTG GGT ATG CAC ACA TGA

2.9 Plasmide

Tabelle 9

Plasmid	Beschreibung	Hersteller
pCB6+	WT1-Leervektor	Invitrogen, Carlsbad, USA
pCB6+ -mWT1(-KTS)	WT1-Expressionsplasmid (-KTS)Spleißvariante	Dr. Daniel A. Haber, Massachusetts General Hospital, Boston, USA

	WT1-Expressionsplasmid (+KTS)Spleißvariante	Dr. Daniel A. Haber, Massachusetts General Hospital, Boston, USA
pm <i>Igfbp5</i> prom F1/R1	<i>Igfbp5</i> -Reporterkonstrukt p832; lange Variante	
pm <i>Igfbp5</i> prom F4/R1	<i>Igfbp5</i> -Reporterkonstrukt p837; kurze Variante	
pm <i>Igfbp5</i> prom F2/R1	<i>Igfbp5</i> -Reporterkonstrukt p840; mittlere Variante	
pGL3 basic	<i>Igfbp5</i> -Leervektor	Promega, Mannheim, Deutschland

2.10 Zelllinien

Tabelle 10

Zelllinie	Gewebstyp	Bezugsquelle
M15	Murine Mesonephroszellen	Prof. Dr. Christoph Englert, Leibniz Institut für Altersforschung Fritz Lipmann Institut, Jena, Deutschland; Ursprünglich hergestellt von: Larsson SH et al. Cell 1995; 81(3): 391-401. [47]
U2OS	Humane Osteosarkomzellen	ATCC, Wesel, Deutschland
UB27	U2OS Zellen, stabil transfiziert mit einem tetrazyklinresistenten WT1(-KTS)-Expressionsplasmid	Prof. Dr. Christoph Englert, Leibniz Institut für Altersforschung Fritz Lipmann Institut, Jena, Deutschland

UD28	U2OS Zellen, transfiziert mit tetrazyklinresistenten WT1(+KTS)- Expressionsplasmid	stabil mit einem	Prof. Dr. Christoph Englert, Leibniz Institut für Altersforschung Fritz Lipmann Institut, Jena, Deutschland
Kelly	humane Neuroblastomzellen		DSMZ ACC355

2.11 Versuchstiere

Es wurden 8 Wochen alte männliche C57BL/6 Mäuse sowie Mäuseembryonen für die Organgewinnung und RNA-Extraktion verwendet. Für die immunhistologischen Färbungen wurden die Organe von Rattenembryonen (Wistar-Kyoto, E14.5) verwendet. Die Richtlinien für die Versuchstierhaltung in den tierexperimentellen Einrichtungen der Charité wurden erfüllt. Die Haltung der Tiere erfolgte artgerecht

3 METHODEN

3.1 Promotoranalyse

Eine Sequenzanalyse der Promotorregion von *IGFBP5* wurde mit Hilfe der Software AliBaba2.1 durchgeführt [48]. Zusätzlich wurde die murine *Igfbp5*-Promotorsequenz mittels der Software DNA-pattern [49] auf das bekannte WT1-Bindungsmotiv TG/cT/cGG/tG/aGGA/cGG/t [50] hin untersucht.

3.2 Microarray

Hybridisierungen von cDNA-Microarrays wurden als Auftragsleistung durch die Firma Miltenyi Biotec durchgeführt. Als Probenmaterial wurde Gesamt-RNA von M15-Zellen mit normaler und gehemmter *Wt1*-Expression (RNA Interferenz) verwendet.

3.3 Gewebegewinnung

Alle Tierdaten wurden gemäß dem Deutschen Tierschutzgesetz, den European Guideline 2010/63/EU, den National Institute of Health Guidelines for Care and Use of Laboratory Animals und den ARRIVE Guidelines [51] erhoben. Außerdem wurden die 3R principles von Russell and Burch berücksichtigt [52]. Die Genehmigungsnummern des LAGeSo Berlin lauten: T0153/07 und T0339/09.

Die Tötung der Mäuse- und Rattenembryonen erfolgte durch Dekapitation. Direkt im Anschluss wurden die Embryonen kurz in 37 °C warmen PBS gewaschen, mit Tissue-Tek O.C.T. compound eingebettet und bei -80 °C gelagert. Die Tötung der adulten Mäuse erfolgte durch zervikale Dislokation in Isoflurannarkose. Anschließend wurden Thorax, Abdomen und Schädel eröffnet, die Organe entnommen und in PBS auf Eis gestellt. Pro Organ wurden ca. 30 mg Gewebe entnommen und in 600 µl RLT-Puffer mittels Rotor homogenisiert. Das übrige Gewebe wurde zur weiteren Verwendung bei -80 °C schockgefroren.

3.4 RNA-Extraktion

Die RNA-Präparation aus M15-, U2OS-, UB27- und UD28-Zellen erfolgte unter Verwendung von Trizol[®]-Reagenz (Phenol-Chloroform) nach Herstellerangaben.

Für die RNA-Präparation aus verschiedenen Mausgeweben wurde das Qiagen RNeasy Mini Kit entsprechend dem Protokoll des Herstellers verwendet.

Die extrahierte RNA wurde in RNase-freiem Wasser resuspendiert. Bei einer Wellenlänge von $\lambda=260$ nm erfolgte dann photometrisch die Quantifizierung, wobei der Quotient $OD_{260} : OD_{280}$ zur Abschätzung der Reinheit der präparierten RNA diente und in allen Fällen mehr als 1,8 betrug.

3.5 cDNA-Synthese

Die Umschreibung von RNA in cDNA erfolgte mittels des SuperScript[®] III Reverse Transcriptase Kits entsprechend der Anleitung des Herstellers, wobei 2 μ g isolierter RNA in 20 μ l Reaktionsvolumen umgeschrieben wurden.

2 μ l verdünnte RNA wurde zunächst unter Zugabe von 1 μ l dNTP, 1 μ l OligodT-Primer und 10 μ l ddH₂O für 5 min auf 65 °C erhitzt, damit der OligodT-Primer an den PolyA-Schwanz der RNA binden konnte, und dann wieder für 1min auf 4 °C gekühlt. Anschließend wurden 4 μ l 5xPuffer, 1 μ l DTT und 1 μ l Reverse Transcriptase zugefügt und der Reaktionsansatz für 60 min auf 50 °C und für weitere 15 min auf 70 °C erhitzt. Nach Beendigung der Reaktion erfolgte eine Kühlung bei 4 °C. Anschließend wurden die Proben zur weiteren Verwendung bei -20 °C eingefroren.

3.6 Primerdesign

Exon überspannende Primer für die quantitative RT-PCR wurden mittels der Software Primer3Plus [53, 54] und Ensemble [55] entworfen. Die hierfür notwendigen Sequenzen wurden der NCBI-Datenbank entnommen (Transkript: IGFBP5-001 ENST00000233813 [56]; Igfbp5 ENSMUSG00000026185 [57]).

3.7 Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)

Die RNA wurde dazu in cDNA umgeschrieben (3.5) und im Verhältnis 1 : 10 mit DNase/RNase-freiem Wasser verdünnt. Pro Reaktion wurden 2 µl der verdünnten cDNA eingesetzt. Die quantitative Echtzeit-PCR wurde unter Verwendung des StepOnePlus™-PCR-cyclers und dem FastStart Universal SYBR Green Master Mix nach Herstellerprotokoll durchgeführt.

Für die PCR-Amplifikation aus humanen Zellen wurden humane *WT1*- und *IGFBP5*-Sequenzen genutzt. Für die PCR-Amplifikation aus Mausgewebe wurden murine *Wt1*- und *Igfbp5*-Oligonukleotidprimer verwendet. Die Normalisierung erfolgte gegen β-Aktin. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 8 aufgeführt. Jede Messung wurde als Doppelbestimmung durchgeführt. Außerdem erfolgte stets eine Negativkontrolle mit ddH₂O anstelle von cDNA. Die C_T-Werte und Schmelzkurven wurden mittels der StepOneSoftware™ dokumentiert. Der C_T-Wert (cycle threshold) entspricht dem Amplifikationszyklus, bei dem eine signifikante Überschreitung der Hintergrundfluoreszenz erfolgt. Die C_T-Werte von Zielgen (*IGFBP5*) und Referenzgen (β-Aktin) wurden subtrahiert, um den ΔC_T-Wert zu erhalten. Durch Subtraktion der ΔC_T-Werte der behandelten Zellen und der Kontrollgruppe wurden die ΔΔC_T-Werte ermittelt. Mit der Formel $2^{-\Delta\Delta C_T}$ wurden die relativen mRNA Expressionsniveaus berechnet.

Tabelle 11: PCR-Bedingungen

Reaktionsansatz (pro Well, 10 µl)	Zeit	Temperatur	
5,0 µl SYBRgreen	10'	95 °C	
0,1 µl Primer (F/R, 10µM)			
2,9 µl ddH ₂ O	15''	95 °C	} 45 Zyklen
	1'	60 °C	
2,0 µl cDNA (1 : 10 verdünnt)	30'	77 °C *	
	1'	95 °C	
	15''	60 °C	
	15''	95 °C	

* Messung der Fluoreszenz

3.8 Protein-Extraktion

Für die Protein-Extraktion wurden die Zellen zweimal auf Eis in 4 °C kaltem PBS gewaschen und anschließend mit Laemmli-Puffer lysiert. Mittels des Labsonic U erfolgte ein Ultraschallaufschluss der Proben und anschließend eine Denaturierung bei 100 °C für 5 min im Wärmeblock. Gewebe wurden zur Vorbereitung auf die Extraktion zunächst mittels des Gewebehomogenisators 4 x 15 s homogenisiert. Die Proteinkonzentration wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 280 nm ermittelt.

3.9 SDS-Elektrophorese und Westernblot

Um die zuvor denaturierten Proteine nach Größe aufzutrennen, wurde eine SDS-Elektrophorese in einem 10 % Polyacrylamid-Gel durchgeführt. Hierfür wurde pro Tasche 20 µg mit Bromphenolblau versetzte Proteinlösung aufgetragen und die Proteine in 1 x SDS-Laufpuffer bei einer Spannung von 100 V separiert. Diese wurden anschließend mittels einer Trans-Blot® SD Semidry Apparatur bei einer Spannung von 15 V für 45 min auf eine Polyvinylidendifluorid-Membranen übertragen. Unspezifische Bindungsstellen der Membran wurden vorab durch eine 60 minütige Inkubation in 5%Milch-TBS/Tween20-Puffer-Lösung blockiert. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte bei 4 °C über Nacht. Es wurden ein polyklonaler WT1-Antikörper und ein polyklonaler IGFBP5-Antikörper verwendet, die jeweils in 2,5 %-TBS/Tween20-Puffer verdünnt wurden (WT1 1:400; IGFBP5 1:500).

Anschließend wurde die Membran 3 x je 10 min in TBS/Tween20 gewaschen. Es folgte die Inkubation mit HRP-konjugierten Zweitantikörpern für 60 min bei Raumtemperatur (Verdünnung 1:30.000 in 2,5%-TBS/Tween20). Danach wurden die Membranen nochmals 3 x für je 10 min in TBS/Tween20 gewaschen.

Mittels Chemiluminiszenz erfolgte dann die optische Darstellung der Proteinbanden auf dem Röntgenfilm unter Verwendung des Western Lightning Plus ECL Kits. Die Filmentwicklung wurde nach den Vorgaben des Herstellers durchgeführt. Hierfür wurde der Film 1-3 min lang entwickelt, dann in Leitungswasser gewaschen und anschließend für 1-3 min fixiert, gewaschen, getrocknet und digitalisiert.

Zum Nachweis einer gleichmäßigen Proteinbeladung wurden die gebundenen Antikörper durch 10 minütige Inkubation der Membran in 0,2 M NaOH entfernt. Nach 3 x 5 min

Waschen in ddH₂O und 1 x 5 min Waschen in TBS wurde die Membran erneut für 60 min in 5%Milch-TBS/Tween20-Puffer blockiert, anschließend mit einem Antikörper gegen β -Aktin für 12 h bei 4 °C inkubiert und entsprechend dem oben beschriebenen Protokoll weiter verfahren. Die verwendeten Antikörper sind Tabelle 7 zu entnehmen.

3.10 Immunhistologische Färbungen

Für die immunhistologischen Färbungen wurden Rattenembryonen (E14.5) in flüssigem Stickstoff schockgefroren und in Tissue Tek-Einbettmedium eingebettet. Mit dem Kryostat wurden bei -18 °C in fortlaufender Reihe 8 μ m dicke Schnitte angefertigt, diese auf Glasobjektträger aufgebracht und dann bei -80 °C zur weiteren Verwendung aufbewahrt. Die Gewebeschnitte wurden für 15 min mit 3 % Paraformaldehyd in PBS bei Raumtemperatur fixiert.

Zur Vorbereitung auf die Färbung wurden die Gewebeschnitte zunächst 5 min lang in Citratpuffer+Tween20 gekocht und anschließend für 2 x 5 min in PBS gewaschen.

Zur Permeabilisierung und Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurden die Gewebeschnitte 5min lang mit Proteinblock-Serum inkubiert.

IGFBP5-Einzelfärbung

Die Inkubation mit polyklonalem IGFBP5 aus der Ziege (1:200 Verdünnung in Diluent) erfolgte 1,5 h lang bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Gewebeschnitte für 3 x 5 min in PBS gewaschen. Mit Cy2 markiertem, gegen Ziegen-IgG gerichtetem Sekundärantikörper (1:200 Verdünnung in Diluent) wurde 45 min lang bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde 5 min in PBS gewaschen. Darauf folgte eine 3 minütige Inkubation mit DAPI (Verdünnung 1:25 in Diluent) und 2 weitere Waschschrte von je 5 min. Als Negativkontrolle wurde anstelle des Primärantikörpers ein Normalserum aus der Spezies, aus der der Erstantikörper stammt, verwendet. Die Eindeckelung der Objektträger erfolgte mit Vectashield-Medium. Die Gewebeschnitte wurden unter einem Fluoreszenzmikroskop betrachtet und mit einer Kamera dokumentiert.

3.11 Zellkultur

Alle verwendeten Zelllinien wurden in Kunststoffzellkulturschalen bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit, 21 % O₂ und 5 % CO₂ in einem CB150 Inkubator kultiviert. Für alle Zellen wurde DMEM-„high glucose“-Medium mit Zusatz von 10 % fetalem Kälberserum (FCS) und 2mmol/l L-Glutamin verwendet. Dem Medium der UB27- und UD28-Zellen wurde zusätzlich 1 µl/ml Tetrazyklin beigefügt, um die über einen tetrazyklinabhängigen Promotor gesteuerte *WT1*-Expression zu unterbinden. Um die *WT1*-Expression zu induzieren, wurde das tetrazyklinhaltige Medium entfernt und die Zellen in DMEM + FCS für je 24 h, 48 h und 72 h kultiviert. Die Zellen wurden regelmäßig alle 2 - 4 Tage unter dem Mikroskop betrachtet, um ihre Dichte und Morphologie zu kontrollieren. Wenn die adhärennten als Monolayer wachsenden Zellen eine Konfluenz von 80 % erreicht hatten, wurden sie gesplittet und in eine neue Zellkulturschale überführt. Hierfür wurde zunächst das Medium entfernt, die Zellen in PBS gewaschen und anschließend mittels Trypsin vom Boden der Zellkulturschale gelöst. Nach 5 min wurde Trypsin mit 37 °C warmem Medium inaktiviert, die Zellen aufgeteilt und mit frischem Medium versorgt. Alle Zelllinien wurden regelmäßig auf einen Mykoplasmenbefall untersucht.

Zur Aufbewahrung wurden die Zellen eingefroren. Hierfür wurde zunächst das Medium entfernt, die Zellen 2 x in PBS gewaschen, trypsinisiert und anschließend zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 10 ml Freezing-Medium (7 ml DMEM, 2 ml FCS, 1 ml DMSO) resuspendiert. Die Zellen wurden dann zunächst über Nacht in einem mit Isopropanol bestückten Behälter bei -80 °C eingefroren, wodurch eine langsame und kontinuierliche Abkühlung gewährleistet wurde. Anschließend wurden die Zellen im Flüssigstickstofftank zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

3.12 Transfektionsexperimente

Die transienten Transfektionen wurde an ca. 60 % konfluenten U2OS-Zellen unter Verwendung von FuGENE®6 Transfections Reagent nach Herstellerangaben durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen am Vortag in 24-Well-Platten ausgesät. Die Transfektionsansätze wurden nach folgendem Schema mit FCS-freiem DMEM-Medium hergestellt:

- 0,3 µg Firefly-Luziferase-Reporterkonstrukt
- 0,6 µg WT1 Expressionsplasmid
- 0,1 µg Renilla-Luziferase-Reporterkonstrukt

Es wurde 2,5 µl FuGENE®6 pro µg Plasmid DNA hinzugegeben und anschließend 15 min lang bei Raumtemperatur inkubiert. Die Transfektionsansätze wurden tropfenweise zu den Zellen hinzugegeben und diese dann für 48 h im Inkubator kultiviert. Um die Luziferaseaktivität zu bestimmen, wurden die Zellen zunächst zweimal in PBS gewaschen und anschließend in 100 µl Lysepuffer (Verdünnung 1 : 5) pro Well für 15 min bei Raumtemperatur auf dem Schüttler lysiert. Zur Bestimmung der Firefly-Luziferaseaktivität wurden 20 µl Zelllysate 100 µl Firefly-Reagenz zugefügt und die Lichtemission in einem Luminometer gemessen. Die Renilla-Luziferaseaktivität wurde ebenfalls mittels Luminometer bestimmt. Hierfür wurden 20 µl Zelllysate 100 µl Renilla-Juice beigefügt, welches zuvor nach Herstellerangaben aus dem Renilla-Juice-Kit hergestellt wurde. Die Messzeit für die Firefly-Luziferase betrug 3 s, für die Renilla-Luziferase betrug sie 5 s. Ein Renilla-Luziferase-Plasmid wurde transient kotransfiziert und die Aktivität der induzierten Firefly-Luziferase unter Einbeziehung der Aktivität der konstitutiv exprimierten Renilla-Luziferase normalisiert.

Tabelle 12

Renilla-Luziferase-Plasmid	pRL-CMV (Promega)	
Expressionsplasmid	pCB6 ⁺	WT1-Leervektor
	pCB6 ⁺ m <i>Wt1</i> -C130 (LS)	WT1(-KTS)
	pCB6 ⁺ m <i>Wt1</i> -C132 (LS)	WT1(+KTS)
Promotor-Reporter-Konstrukt	pm- <i>Igfbp5</i> Prom F2/R1	-1629 bp
	pm- <i>Igfbp5</i> Prom F4/R1	-848 bp
	Pm- <i>Igfbp5</i> Prom F1/R1	-190 bp
	pGL3-basic (Promega)	Leervektor
Transfektionskontrolle	pEGFP N1 (Invitrogen)	

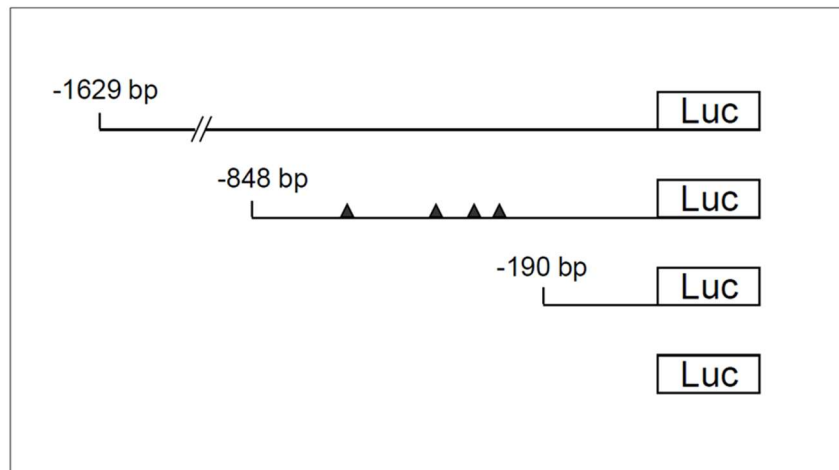


Abb. 4: Darstellung der *Igfbp5*-Promotor-Reporter-Konstrukte relativ zum Transkriptionsstart

Für die transiente Transfektion wurden drei unterschiedlich lange *Igfbp5*-Promotor-Reporter-Konstrukte verwendet. Die Länge der Konstrukte beträgt 1629 bp, 848 bp und 190 bp. Die Sequenzen wurden in den pGI3-basic Vektor in die Kpn I/Hind III Schnittstelle kloniert. Die schwarzen Dreiecke stellen schematisch die vier potentiellen WT1-Bindungsstellen dar.

3.13 ChIP-Assay

Die *WT1*-Expression in UB27-Zellen und UD28-Zellen wurde durch maximal 72-stündige Kultivierung in tetrazyklinfreiem Medium induziert. Als Kontrolle dienten nicht induzierte Zellen, die unter Zugabe von Tetrazyklin (1 µg/ml) zum Nährmedium gehalten wurden. Um die *WT1*-Überexpression zu überprüfen, wurde ein Western Blot angefertigt. Für die Protein-DNA-Vernetzung wurden die Zellen zunächst mit 1% Formaldehyd für 10 min bei Raumtemperatur fixiert, anschließend in PBS gewaschen und 15 min lang mit Lysispuffer auf Eis lysiert.

Die Fragmentierung der DNA in 300 - 500 bp große Fragmente erfolgte mittels Ultraschallaufschluss. Die Effizienz wurde durch Elektrophorese in einem 1 % Agarosegel optimiert.

Die Proben wurden dann in IP-Puffer+Complete™ 1 : 10 verdünnt und anschließend für 1 h bei 4 °C in 80µl / 2 ml Protein G Agarose/Salmon Sperm DNA vorgereinigt. Über Nacht erfolgte dann bei 4°C die Inkubation mit dem *WT1*-Antikörper (0,6 µg pro 2 ml Ansatz;

SC-192, Lot #G1007, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg,). Kaninchen-IgG diente hierbei als Negativkontrolle.

Es folgte eine einstündige Inkubation bei 4 °C wobei die Immunpräzipitate mit Protein G Agarose/Salmon Sperm DNA an die Agaroseperlen binden. Daraufhin wurden die Proben je 5 min in LS-, HS-, Lithium- und TE-Puffer gewaschen und mittels Elutionspuffer für 2x15 min bei Raumtemperatur eluiert. Anschließend wurde die DNA-Extraktion mittels Phenol : Chloroform : Isoamylalkohol (25 : 24 : 1) durchgeführt und die DNA mit 100 % Ethanol präzipitiert. Das entstandene DNA-Pellet wurde in ultraPURE-Wasser gelöst und die Proben zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Die präzipitierte DNA wurde mittels quantitativer PCR amplifiziert.

3.14 Statistik

Alle Angaben erfolgen als Mittelwerte±Standardabweichung. Der statistische Paarvergleich wurde mittels Student's t-Test durchgeführt. Multiple Vergleiche erfolgten mittels Varianzanalyse (ANOVA) und Tukey post-hoc Test. Als statistisch signifikant wurden p-Werte von $p < 0,05$ eingestuft.

4 ERGEBNISSE

4.1 Identifizierung potenzieller WT1-Zielgene

Um neue, potenzielle WT1-Zielgene in einem genomweiten Ansatz zu ermitteln und damit weitere Einblicke in dessen Funktion zu erlangen, wurde die Firma Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach mit einer cDNA-Microarray-Analyse beauftragt. Die Gewinnung des Probenmaterials - Gesamt-RNA aus M15-Zellen - erfolgte durch Frau Dr. Karin Kirschner. Die verwendeten M15-Zellen wurden ursprünglich aus dem Mesonephros der Maus etabliert und verfügen über eine hohe endogene *Wt1*-Expression [47]. In den Microarray-Analysen wurde RNA aus M15-Zellen mit normaler und supprimierter *Wt1*-Expression verglichen. Um die *Wt1*-Expression in M15-Zellen zu inhibieren, wurden diese für 72 h mit gepoolter *Wt1*-siRNA (Dharmacon ON-TARGETplus, SMARTpool siRNA, L-040686-01-0005; NCBI Referenzsequenz NM_144783) transfiziert. Die Verwendung eines Pools von 5 unterschiedlichen siRNAs an Stelle einer einzelnen siRNA hat den Vorteil einer effizienteren Expressionshemmung. Als Kontrolle wurden non-targeting-siRNAs ohne Sequenzhomologie im Mausgenom verwendet. Der Knockdown wurde auf Proteinebene mittels Western Blot verifiziert. Die Microarray-Untersuchungen ergaben, dass ca. 10 % der 37465 untersuchten mRNAs in M15-Zellen mit normalem und erniedrigtem WT1-Protein mindestens 2-fach unterschiedlich exprimiert wurden. Durch *Wt1*-Knockdown wurde die Expression von 1654 mRNAs signifikant verstärkt und von 2044 Transkripten signifikant vermindert (Abb. 5). Eine dieser mRNAs, die in zwei voneinander unabhängigen Transfektionsexperimenten nach *Wt1*-Silencing im Vergleich zu den Kontrollen signifikant vermindert war, ist *Igfbp5*.

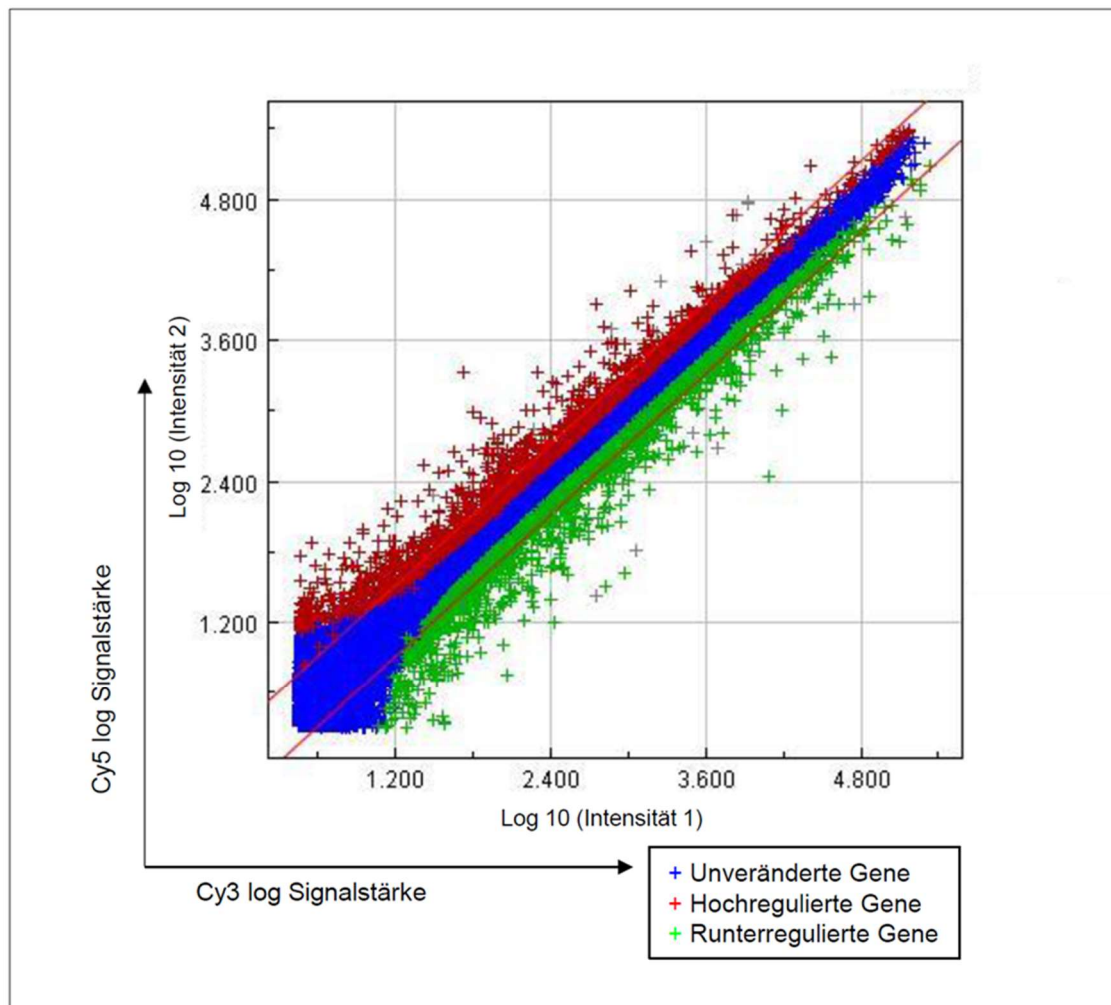


Abb. 5: Graphische Darstellung der Microarray-Daten

Dargestellt ist ein Streudiagramm aller Signalreaktionen des Microarrays. Jedes Pluszeichen steht dabei für ein Signal, gezeigt in einer Doppel-logarithmischen Skala. Die x-Achse zeigt dabei die Cy3 log Signalstärke, die y-Achse zeigt die Cy5 Signalstärke. Die blauen Kreuze bezeichnen alle unveränderten Gene (37465), die roten Kreuze alle signifikant hochregulierten Gene (1654) und die grünen Kreuze alle signifikant runterregulierten Gene (2044), $p < 0,01$.

4.2 WT1 und IGFBP5 werden koreguliert

Die Ergebnisse der Microarray-Analysen deuten darauf hin, dass die Expression von *Igfbp5* in M15-Zellen direkt oder indirekt durch WT1 kontrolliert wird. Mittels Überexpression bzw. Knockdown von *Wt1* und anschließender *Igfbp5*-mRNA-Quantifizierung sollten die Daten der cDNA-Microarray-Analysen überprüft werden.

Hierfür wurden zusätzliche siRNA-Transfektionsexperimente durchgeführt und die *Igfbp5*-mRNA mittels RT-qPCR in M15-Zellen mit normaler und gehemmter *Wt1*-Expression gemessen. Weiterhin wurden Osteosarkomzellen mit induzierbarer Expression von WT1(-KTS) bzw. WT1(+KTS) verwendet, um zu untersuchen, durch welche der beiden WT1-Varianten die *IGFBP5*-mRNA-Expression stimuliert wird.

4.2.1 Die Expression von *Igfbp5* in M15-Zellen erfolgt *Wt1*-abhängig

WT1-exprimierende M15-Zellen aus dem Mesonephros der Maus wurden mit non-targeting- bzw. *Wt1*-siRNA transfiziert. Der *Wt1*-Knockdown wurde mittels Westernblot nachgewiesen (Abb. 6), und die *Igfbp5*-mRNA per RT-qPCR gemessen. Durch Hemmung der *Wt1*-Expression wurde die *Igfbp5*-mRNA signifikant auf ca. 10 % der Kontrollen mit non-targeting-siRNA reduziert (Abb. 6). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Expression von *Wt1* und *Igfbp5* in M15-Zellen korreliert und bestätigen somit die Resultate der Microarray-Analysen.

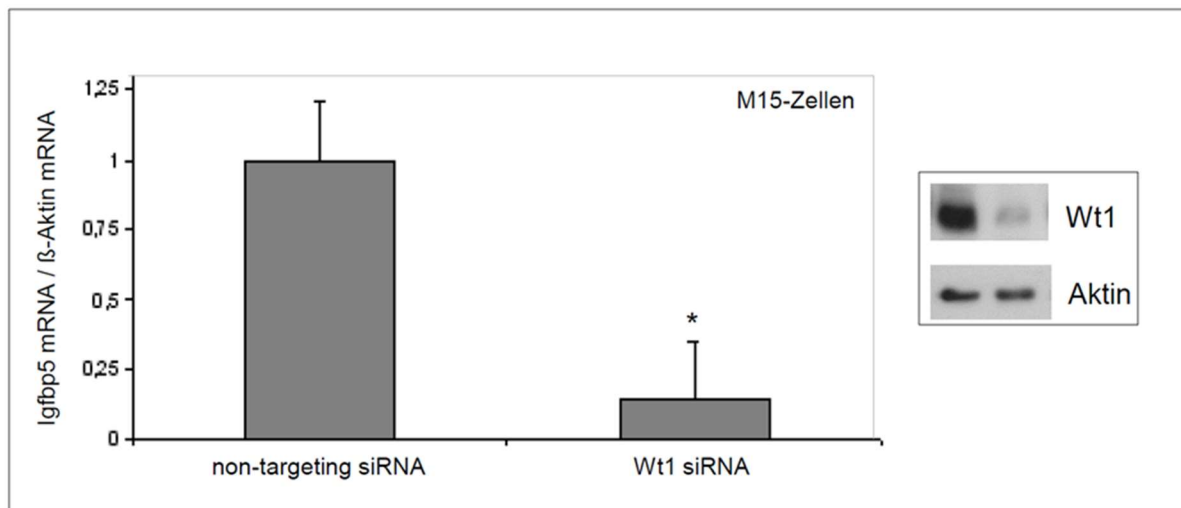


Abb. 6: WT1-Knockdown reduziert das *Igfbp5*-mRNA-Level in M15-Zellen

Igfbp5-mRNA und WT1-Protein in M15-Zellen aus dem Mesonephros der Maus. Die Zellen wurden entweder mit non-targeting-siRNA oder *Wt1*-siRNA transfiziert. Die Messung der *Igfbp5*-mRNA erfolgte durch RT-qPCR. Der *Wt1*-Knockdown wurde mittels Westernblot nachgewiesen. Hemmung der *Wt1*-Expression in M15-Zellen bewirkt eine signifikante Abnahme der *Igfbp5*-mRNA. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Stabw. (* p <0,05, Student's t-Test, n=8).

4.2.2 Induktion von *WT1* führt zur Hochregulierung von *IGFBP5*

Die beiden Osteosarkomzelllinien UB27 und UD28 exprimieren die *WT1*(-KTS)- bzw. *WT1*(+KTS)-Proteinvariante jeweils unter der Kontrolle eines tetrazyklinregulierten Promotors. Durch Zugabe von Tetrazyklin zum Kulturmedium wird die Expression von *WT1* gehemmt. Kultivierung der Zellen in tetrazyklinfreiem Medium bewirkt eine Transkriptionsaktivierung von *WT1*. Zur Induktion von *WT1* wurden die beiden Zelllinien jeweils 24, 48 und 72 h lang in Abwesenheit von Tetrazyklin inkubiert. Mit beiden Zelllinien wurden jeweils fünf voneinander unabhängige Experimente durchgeführt. Während der Induktionen in tetrazyklinfreiem Kulturmedium kam es über den Zeitraum von 72 h zu einer schrittweisen Zunahme der *WT1*-Proteinmenge, die im Westernblot nachgewiesen wurde (Abb. 7A). In den UB27-Zellen erreichte die *IGFBP5*-mRNA nach 24 h ein Maximum vom 15-fachen des Ausgangswertes (Abb. 7A). Die Veränderungen der *IGFBP5*-mRNA waren mit einer Zunahme der *IGFBP5*-Proteinmenge in UB27-Zellen verbunden, die nach 48-stündiger Induktion auf das Maximum anstieg (Abb. 7A). Auch in UD28-Zellen wurde durch Entfernen von Tetrazyklin aus dem Kulturmedium die Expression der *WT1*(+KTS)-Isoform stimuliert. Allerdings kam es dabei trotz deutlicher *WT1*-Akkumulation (Abb. 7B) zu keiner signifikanten Erhöhung der *IGFBP5*-mRNA Menge (Abb. 7B). *IGFBP5*-Protein war in UD28-Zellen im Westernblot nicht nachweisbar (Daten nicht gezeigt).

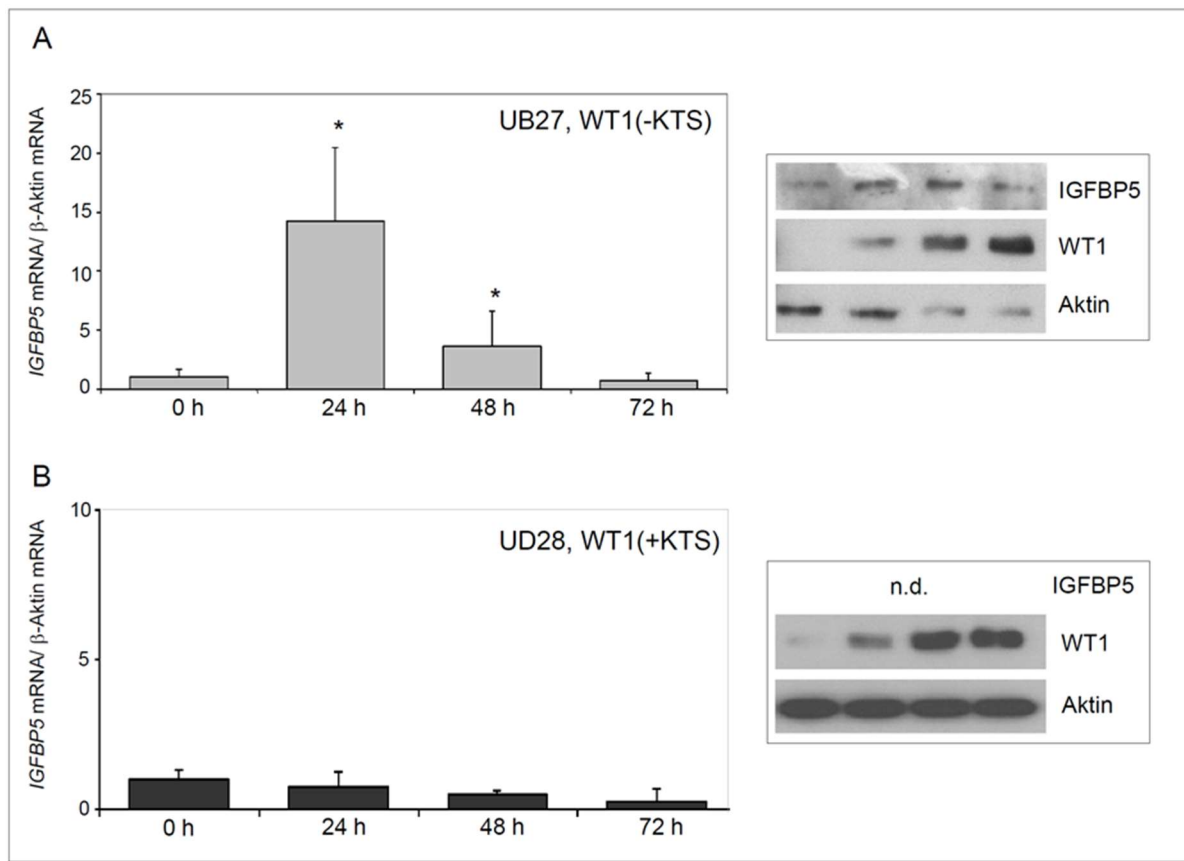


Abb. 7: IGFBP5 in Osteosarkomzellen mit induzierbarer Expression von WT1.

Die beiden Zelllinien UB27 und UD28 exprimieren die WT1(-KTS)- und WT1(+KTS)-Varianten jeweils unter der Kontrolle eines tetrazyklinregulierten Promotors. Kultivierung in einem tetrazyklinfreien Medium verursacht in beiden Zelllinien über den Zeitraum von 72 h eine Akkumulation von WT1-Protein (A, B). In UB27-Zellen ist die Zunahme von WT1-Protein mit einem Anstieg von IGFBP5-mRNA und -Protein verbunden (A). Hingegen bewirkt die Induktion von WT1(+KTS) in UD28-Zellen keine Stimulation der IGFBP5-Expression (B). Die gezeigten mRNA-Daten sind Mittelwerte \pm Stabw. aus 4 voneinander unabhängig durchgeführten Induktionsversuchen ($p < 0,05$, Student's t-Test, $n=4$).

4.3 WT1 aktiviert den IGFBP5-Promotor

4.3.1 Promotoranalyse

Mit Hilfe des Ensemble Genome Browsers [55] wurde die Promotorsequenz von IGFBP5 (Humanes Gen: ENSG00000115461 [56]) dargestellt. Das humane IGFBP5-Gen befindet sich auf Chromosom 2, besteht aus 4 Exons sowie 3 Introns [55]. Unter Verwendung der Software AliBaba2.1 [48] wurden 231 potentielle Bindungsstellen

bekannter Transkriptionsfaktoren identifiziert. Für WT1 wurden 4 verschiedene mögliche Bindungsstellen vorausgesagt. Die Basenfolge des WT1-Konsensusmotivs lautet: GCG(T/G)(G/A)GG(C/A)G(G/T) [58].

Außer für WT1 wurden noch weitere Bindungsstellen bekannter Transkriptionsfaktoren vorausgesagt, u.a. für: Sp1 (48), SRY (2), GATA1 (10), GATA4 (1), Erg-1 (3), NF-1 (12), Sox-2 (3), NF-kB (1). Diese sind in Abb. 8 dargestellt. Auch die murine *Igfbp5*-Promotorsequenz (Murines Gen: ENSMUST00000027377 [57]) wurde untersucht, wobei sich ebenfalls vier potenzielle WT1-Bindungsstellen zeigten (Abb. 9). Frühere Untersuchungen hatten ergeben, dass die Expression von *WT1* durch Hypoxie induzierbar ist [59] Daraus ergibt sich die Möglichkeit, dass das *Igfbp5*-Gen synergistisch durch WT1 und Hypoxie reguliert wird. Es sollte deshalb überprüft werden, ob der *Igfbp5*-Promotor Bindungsstellen für den Hypoxie-induzierbaren Transkriptionsfaktor HIF enthält. Mit der Software DNA pattern wurde der *Igfbp5*-Promotor gezielt nach einem Bindungsmotiv für HIF hin untersucht [60]. Es ließ sich feststellen, dass der *Igfbp5*-Promotor vier potenzielle Bindungsstellen für HIF enthält (Abb. 9).

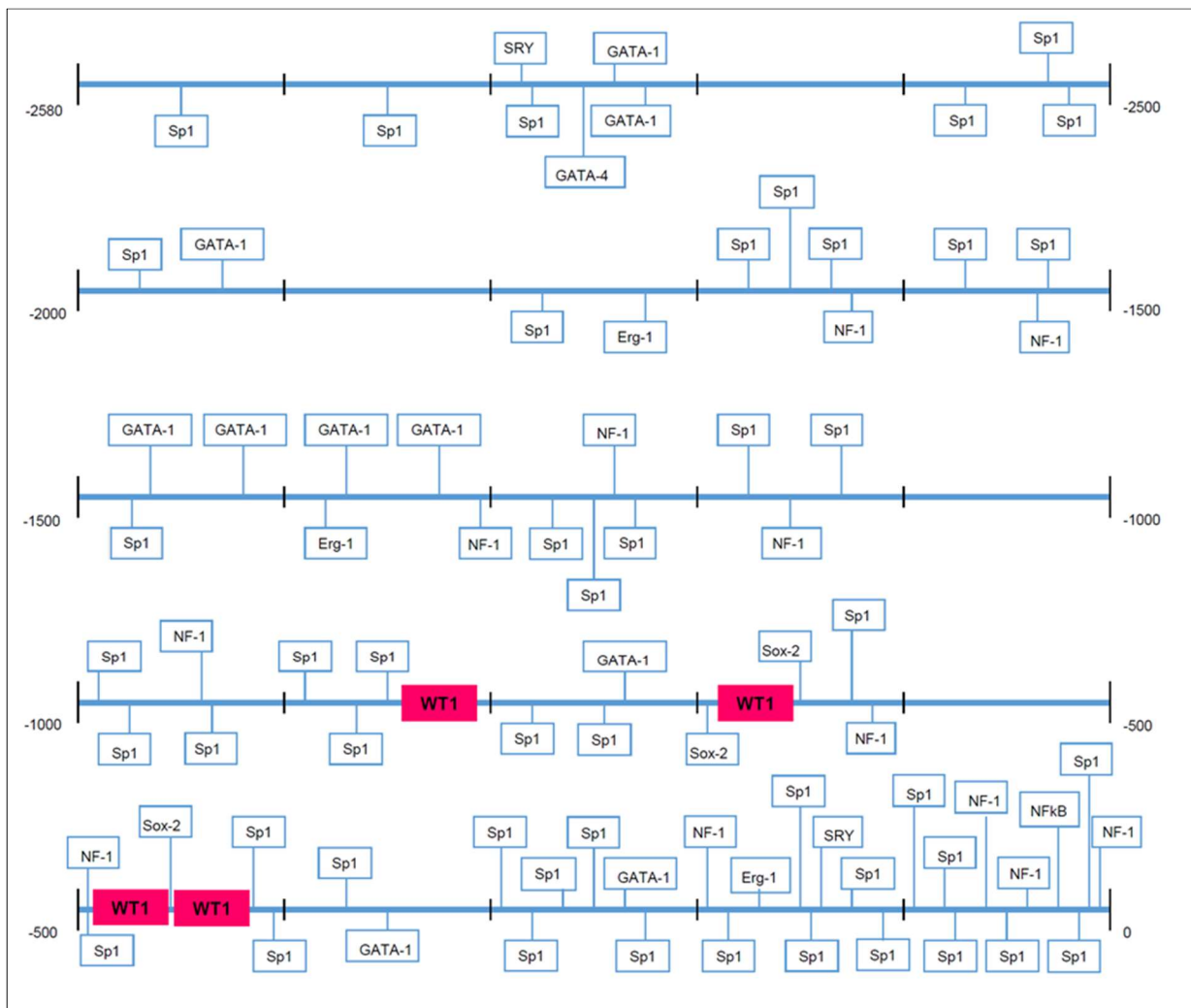


Abb. 8: Darstellung des *IGFBP5*-Promotors mit 4 WT1-Bindungsstellen und Konsensusmotiven für weitere bekannte Transkriptionsfaktoren

Die Abbildung zeigt einen 2580-bp-Abschnitt des *IGFBP5*-Promotors mit prognostizierten Bindungsstellen für bekannte Transkriptionsfaktoren: Sp1 (48), SRY (2), GATA1 (10), GATA4 (1), Erg-1 (3), NF-1 (12), Sox-2 (3), NF-kB (1). Die vier prognostizierten Bindungsstellen für WT1 sind rot dargestellt.

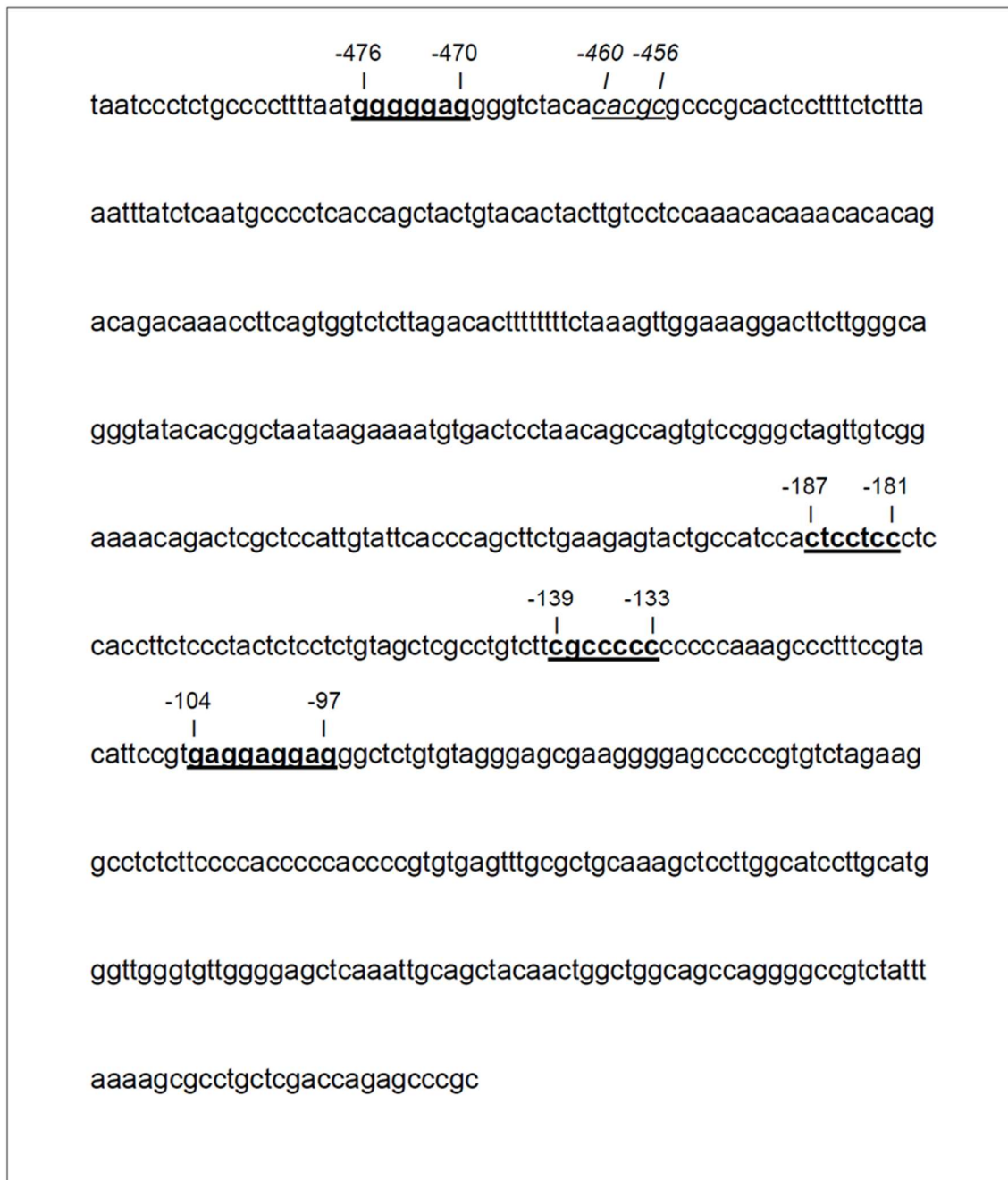


Abb. 9: Sequenzausschnitt des *Igfbp5*-Promotors der Maus mit 4 potenziellen WT1-Bindungsstellen und HIF-Bindungselementen

Dargestellt ist die Basensequenz des *Igfbp5*-Promotors der Maus. Unterstrichen und hervorgehoben sind hierbei die prognostizierten WT1-Bindungsstellen mit der Angabe des jeweiligen Basenpaarabschnitts relativ zum Transkriptionsstartpunkt. Alle vier prognostizierten WT1-Bindungsmotive befinden sich im Abschnitt zwischen -476 und -97 bp relativ zum Transkriptionsstart. Von den vier prognostizierten HIF-Bindungselementen ist hier nur eines dargestellt (kursiv, unterstrichen). Drei weitere HIF-Konsensusmotive befinden sich bei -700 bp, -960 bp und -1275 bp relativ zum Transkriptionsstart.

4.3.2 WT1(-KTS) aktiviert den *Igfbp5*-Promotor

Auf der Basis von Luziferase-Aktivitätsmessungen wurden Reporterassays durchgeführt. Bei dieser Technik ermöglicht die Messung der Biolumineszenz der Firefly-Luziferase die Aktivitätsbestimmung des Promotors, welcher der Luziferase vorgeschaltet ist. Auf diese Weise sollte ermittelt werden, ob der murine *Igfbp5*-Promotor durch WT1 aktiviert wird und ob es dabei Unterschiede zwischen der WT1(-KTS)- und WT1(+KTS)-Isoform gibt. U2OS-Zellen wurden mit drei unterschiedlich langen *Igfbp5*-Promotor-Reporterkonstrukten (1629 bp, 848 bp und 190 bp) und WT1-Expressionsplasmiden kotransfiziert (Abb. 4). Als Negativkontrolle wurde „leeres“ Reporterplasmid (pGL3basic) bzw. „leeres“ Expressionsplasmid (pCB6⁺) transfiziert. Weiterhin erfolgte die Transfektion eines Renilla-Luziferasekonstrukts zur Normalisierung der ermittelten Promotoraktivitäten. Es wurden fünf voneinander unabhängige Experimente durchgeführt.

Überexpression von WT1(-KTS) bewirkte eine fünffache Zunahme der Luziferaseaktivität des 1629-bp-langen Promotor-Reporterkonstrukts. Auch für das zweitlängste *Igfbp5*-Konstrukt ließ sich bei Kotransfektion von WT1(-KTS) noch eine mehr als vierfach erhöhte Leuchtkraft nachweisen. Das 190-bp-lange *Igfbp5*-Promotorkonstrukt sowie der als Negativkontrolle verwendete pGL3basic Leervektor zeigten hingegen keine Veränderung in der Leuchtintensität der Luziferase (Abb. 10). Die Ergebnisse dokumentieren, dass die Aktivität des *Igfbp5*-Promotors in Osteosarkomzellen durch die WT1(-KTS)-Variante stimuliert wird. Der Effekt ist umso größer, je mehr WT1-Bindungsstellen in der Promotorregion enthalten sind. Kotransfektion der WT1(+KTS)-Isoform hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Aktivität der getesteten *Igfbp5*-Promotorkonstrukte (Abb. 10).

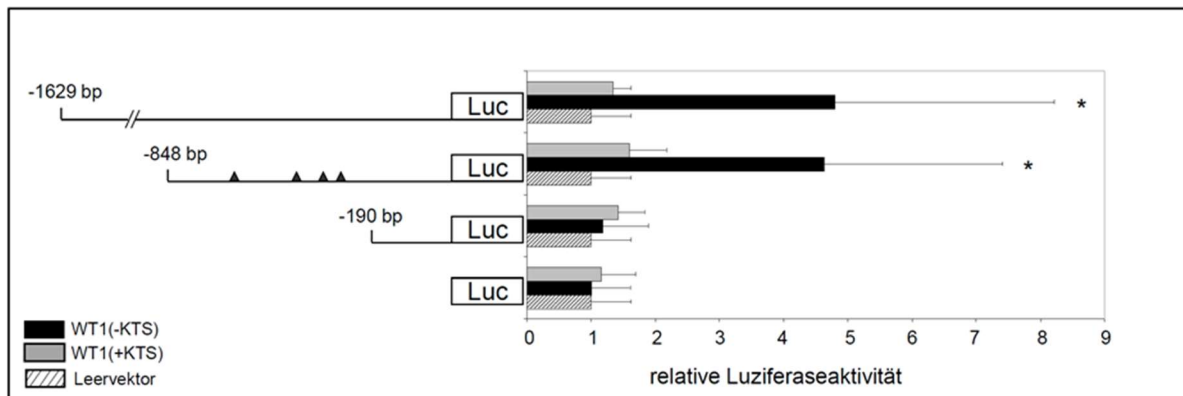


Abb. 10: WT1(-KTS) aktiviert den *Igfbp5*-Promotor in Osteosarkomzellen

U2OS-Osteosarkomzellen wurden mit unterschiedlich langen *Igfbp5*-Promotor-Reporterkonstrukten und *Wt1*-Expressionsplasmiden kotransfiziert. Die dargestellten Firefly-Luziferaseaktivitäten als Maß für die jeweiligen *Igfbp5*-Promotoraktivitäten wurden gegen die Leuchtkraft von kotransfizierter Renilla-Luziferase normalisiert. Als Negativkontrolle diente der „leere“ pGL3basic Reportervektor. Die Resultate zeigen, dass die beiden 1629 bzw. 848 bp langen *Igfbp5*-Promotor-Reporterkonstrukte durch Kotransfektion von WT1(-KTS) signifikant stimuliert werden, während die WT1(+KTS)-Variante keinen statistisch signifikanten Einfluss hat. Die Abbildung zeigt Mittelwerte±Stabw. (* $p < 0,01$; ANOVA, $n = 5$).

4.3.3 WT1 bindet an den *IGFBP5*-Promotor *in vivo*

Die *in vivo*- Interaktion des WT1-Transkriptionsfaktors mit dem *IGFBP5*-Promotor wurde mittels Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) überprüft. Um zwischen Bindungen der verschiedenen WT1-Isoformen unterscheiden zu können, wurden UB27- und UD28-Zellen mit selektiver Expression von WT1(-KTS) bzw. WT1(+KTS) verwendet. Bei der Chromatin-Immunpräzipitation werden zu einem bestimmten Zeitpunkt bestehende Protein-DNA-Bindungen fixiert. Nach DNA-Fragmentierung erfolgt die Immunpräzipitation unter Verwendung eines spezifischen WT1-Antikörpers (C19) sowohl in nicht induzierten als auch in induzierten UB27- und UD28-Zellen. Als Kontrolle wurde anstelle des WT1-Antikörpers normales Kaninchen IgG verwendet. Die Quantifizierung der an WT1-Protein gebundenen DNA erfolgte mittels qPCR. In den WT1-induzierten UB27-Zellen ergab die Präzipitation mit einem WT1-Antikörper im Vergleich zur IgG-Kontrolle eine ca. dreifache Anreicherung der *IGFBP5*-Promotor-DNA.

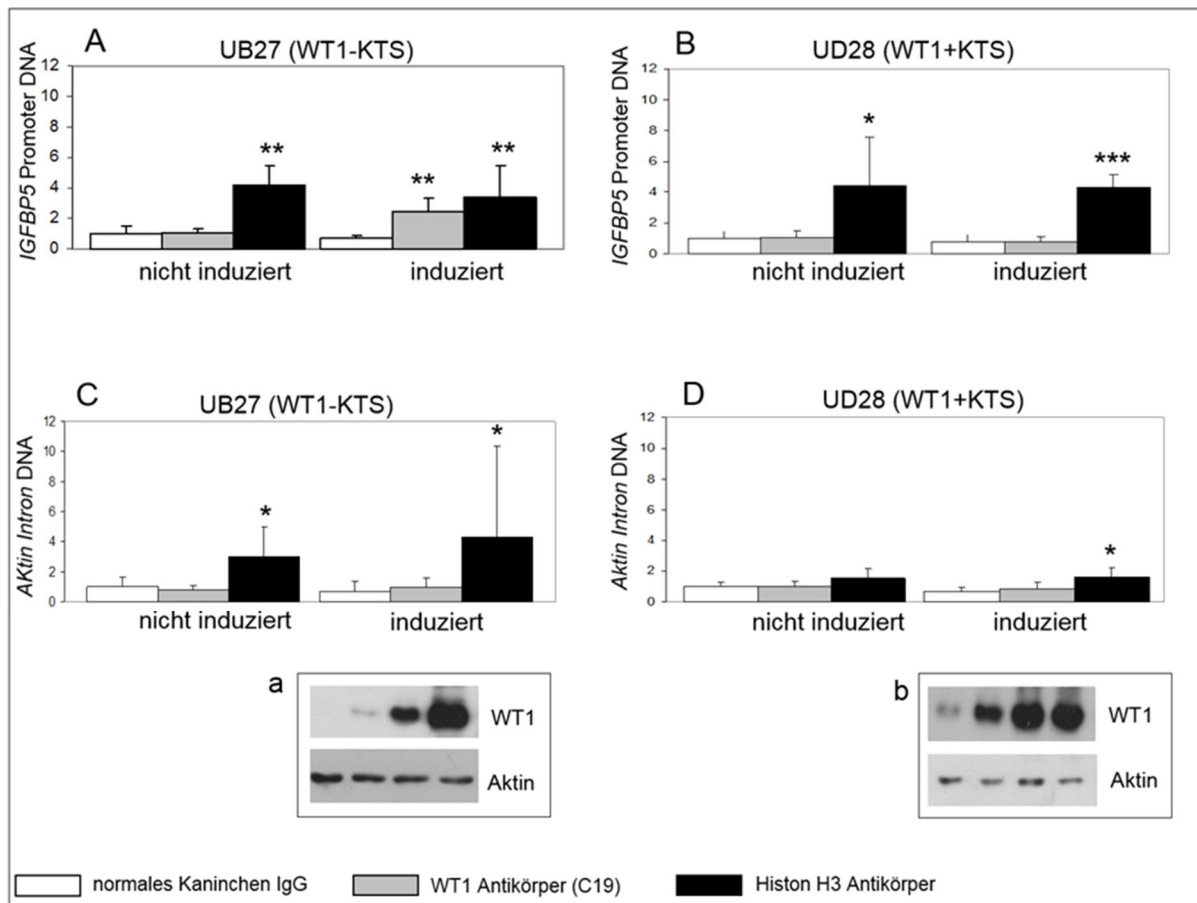


Abb. 11: Chromatinimmunpräzipitation (ChIP) zum Nachweis der WT1(-KTS)-Proteinbindung an den IGFBP5-Promotor

Die Immunpräzipitationen erfolgten mit Chromatin von UB27- und UD28-Zellen, welche die WT1(-KTS)- und WT1(+KTS)-Variante exprimieren. Es wurden jeweils Zellen vor und nach *WT1*-Induktion untersucht. Die verwendeten Antikörper waren gegen WT1 und Histon gerichtet, als Negativkontrolle diente normales Kaninchen-IgG. In den induzierten UB27-Zellen zeigt sich eine dreifache Zunahme der *IGFBP5*-Promotor-DNA gegenüber der IgG-Kontrolle (A). In den nicht induzierten UB27-Zellen lässt sich hingegen keine signifikante Veränderung feststellen (A). Weder in den induzierten noch in den nicht induzierten UD28-Zellen ist eine Anreicherung von *IGFBP5*-Promotor-DNA nachweisbar (B). Als Referenz wurde Aktin-Intron-DNA, die keine bekannte WT1-Bindungsstelle enthält, verwendet (C, D). Die WT1-Induktion ist im Westernblot auf Proteinebene verifiziert (a und b). Die Abbildung zeigt Mittelwerte±Stabw. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$; Student's t-Test, $n=5$)

Bei den nicht induzierten UB27-Zellen ließ sich keine Veränderung der DNA-Menge verzeichnen. In den WT1(+KTS)-exprimierenden UD28-Zellen konnte weder in der induzierten noch in der nicht induzierten Gruppe eine DNA-Anreicherung festgestellt werden (Abb. 11).

Als weitere Kontrolle wurde eine Intronsequenz aus dem humanen Aktin-Gen, die kein WT1-Bindungsmotiv enthält, amplifiziert. Wie zu erwarten war, wurde weder in den induzierten noch in den nicht induzierten UB27- und UD28-Zellen mit dem WT1-Antikörper eine Anreicherung der Aktin-DNA erzielt (Abb. 11). Die Inkubation mit einem Histon-Antikörper diente als Positivkontrolle und ergab eine gleichmäßig hohe Anreicherung.

4.4 Die Expression von *IGFBP5* wird durch Hypoxie stimuliert

Bei der bioinformatischen Analyse des *Igfbp5*-Promotors wurden mehrere potenzielle Bindungselemente für den Hypoxie-induzierbaren Transkriptionsfaktor HIF-1 prognostiziert (Abb. 9) [60]. Interessanterweise wird die WT1-Expression via HIF bei Sauerstoffmangel verstärkt [61, 62]. Es erscheint somit denkbar, dass auch die Expression des potenziellen WT1-Zielgens *IGFBP5* im Sinne eines Synergieeffekts durch Hypoxie aktiviert wird. Um dies zu überprüfen, wurden verschiedene Zelllinien, für die eine sauerstoffabhängige Expression von *WT1* beschrieben ist, hinsichtlich einer Hypoxie induzierbaren *IGFBP5*-Expression getestet. Sowohl bei der Neuroblastomzelllinie Kelly als auch bei U2OS-Osteosarkomzellen bewirkte eine 24-stündige Inkubation mit 1 % O₂ (Hypoxie) im Vergleich zu 21 % O₂ (Normoxie) eine Zunahme der *IGFBP5*-mRNA. Das Expressionsniveau der *IGFBP5*-mRNA stieg in U2OS-Zellen signifikant um den Faktor 2 an. In Kelly Zellen ließ sich eine Zunahme des Expressionsniveaus um den Faktor 3 beobachten (Abb. 12). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Expression von *IGFBP5* in diesen beiden Zelllinien sauerstoffabhängig reguliert ist.

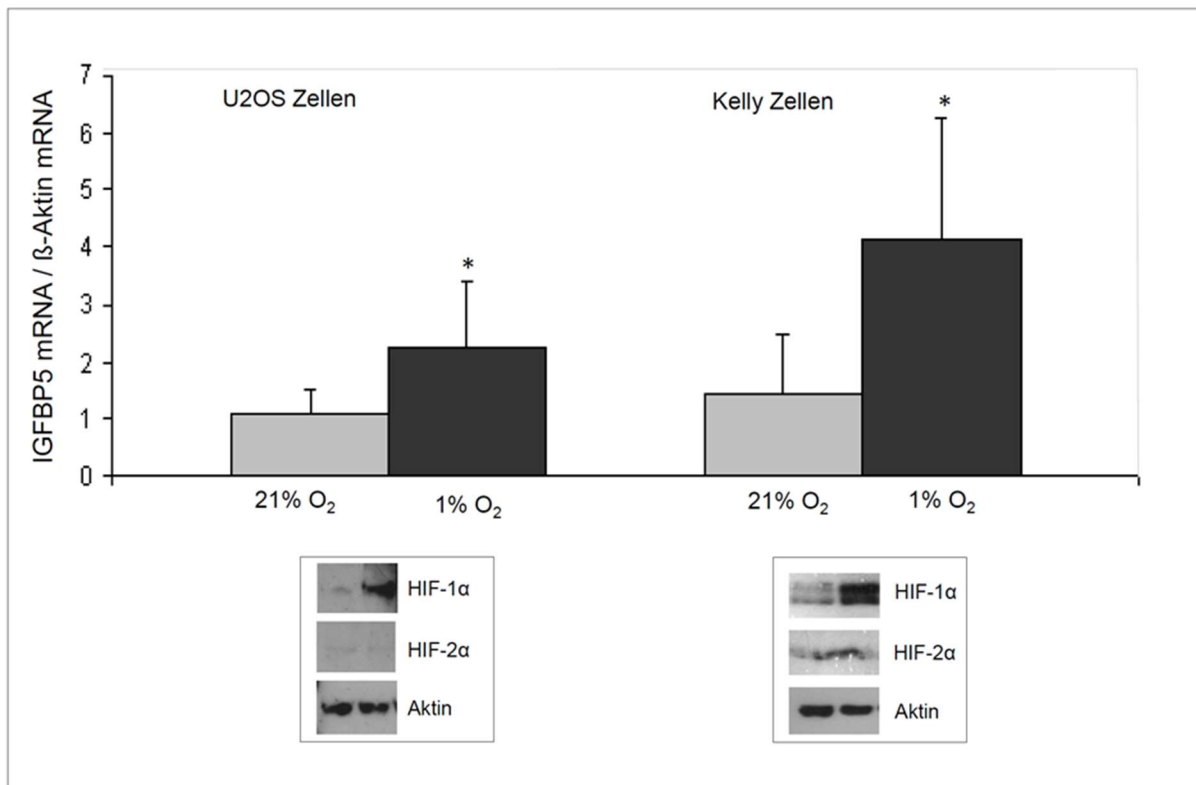


Abb. 12: Hypoxie stimuliert die Expression von *IGFBP5*

Kelly-Neuroblastomzellen und U2OS-Osteosarkomzellen wurden 24 Stunden lang bei 21 % O₂ (Normoxie) bzw. 1 % O₂ (Hypoxie) kultiviert. Die Messung der *IGFBP5*-mRNA erfolgte, normalisiert gegen β-Aktin-mRNA, mittels RT-qPCR. In beiden Zelllinien zeigt sich ein signifikanter Anstieg der *IGFBP5*-Expression unter hypoxischen Bedingungen. Der Westernblot dokumentiert eine Zunahme von HIF-1α in Hypoxie. Die Abbildung zeigt Mittelwerte ± Stabw. ($p > 0,05$; Student's t-Test; $n = 4$).

4.5 *Igfbp5*-mRNA in adulten Mausgeweben

Weiterhin wurde die Expression von *Igfbp5* in verschiedenen Organen von Mäusen mittels RT-qPCR quantifiziert. Auf mRNA-Ebene zeigte sich eine besonders starke Expression von *Igfbp5* im Herzen, in der Niere, im ZNS sowie im Skelettmuskel (Abb. 13). *Wt1* spielt bekanntlich für die Entwicklung und Funktion des Herzens und der Nieren eine zentrale Rolle [27, 63], ebenso für die Differenzierung der Retina und des Riechepithels [64, 65]. Hingegen zeigen sich in Lunge und Leber nach Tamoxifen-vermittelter *Wt1*-Deletion in der adulten Maus keine wesentlichen Veränderungen [30].

Auch *Igfbp5* lässt sich in Lunge und Leber kaum nachweisen. Im muskuloskeletalen System ist das *Igfbp5*-Expressionsniveau am höchsten.

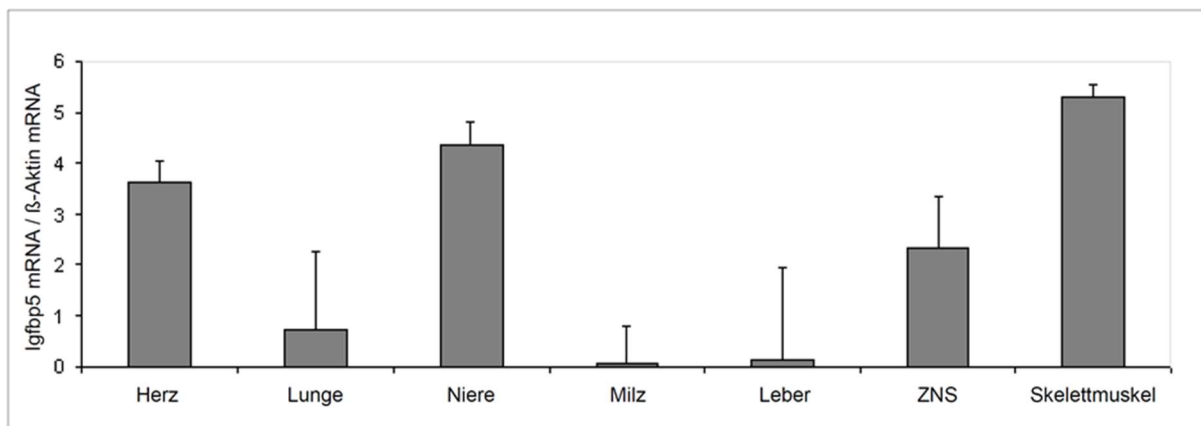


Abb. 13: *Igfbp5*-mRNA in verschiedenen Organen adulter Mäuse.

Relatives *Igfbp5*-mRNA-Expressionsniveau in den Organen erwachsener Wildtyp-Mäuse (C57BL/6). Die Messung der *Igfbp5*-mRNA erfolgte mittels RT-qPCR. Es wurde gegen β -Aktin-mRNA normalisiert. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte \pm Stabw, n=4.

4.6 IGFBP5 wird in der Niere und im Knochen exprimiert

Eine unmittelbare Regulation der IGFBP5-Expression durch WT1 setzt voraus, dass beide Faktoren in denselben Zellen vorkommen. Die Verteilung von WT1-Protein im embryonalen Organismus ist relativ gut untersucht und in Publikationen dokumentiert [27]. Über die Lokalisation von IGFBP5 liegen bislang jedoch wenig gesicherte Erkenntnisse vor. Aus diesem Grund wurden Immunfärbungen für IGFBP5 an Rattenembryonen zum Entwicklungszeitpunkt E14.5 durchgeführt. Für die Untersuchungen wurden Embryonalstadien gewählt, da WT1 während der Embryogenese am stärksten exprimiert wird [66]. Wegen der Bedeutung von WT1 für die Entwicklung der Nieren [27] und die Morphologie des Knochens [30], waren die Untersuchungen auf diese beiden Organe ausgerichtet.

Es wurden 9 Präparate von 3 verschiedenen Rattenembryonen verwendet und pro Tier 25 Kryoschnitte von 8 μ m Dicke angefertigt. Der gegen IGFBP5 gerichtete polyklonale Erstantikörper entstammt der Ziege (IGFBP5 C18 SC-6006 Lot# D1509; 1:250

Verdünnung) und wurde mit einem Cy2-konjugierten Zweitantikörper (Esel-gegen-Ziege IgG, Jackson 705-166-147; 1:200) nachgewiesen (grün: A, B, D, E). Für die Negativkontrollen (C, F) wurde anstelle des Primärantikörpers normales Ziegenserum verwendet, das kein spezifisches Fluoreszenzsignal ergab. Die Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte mit DAPI.

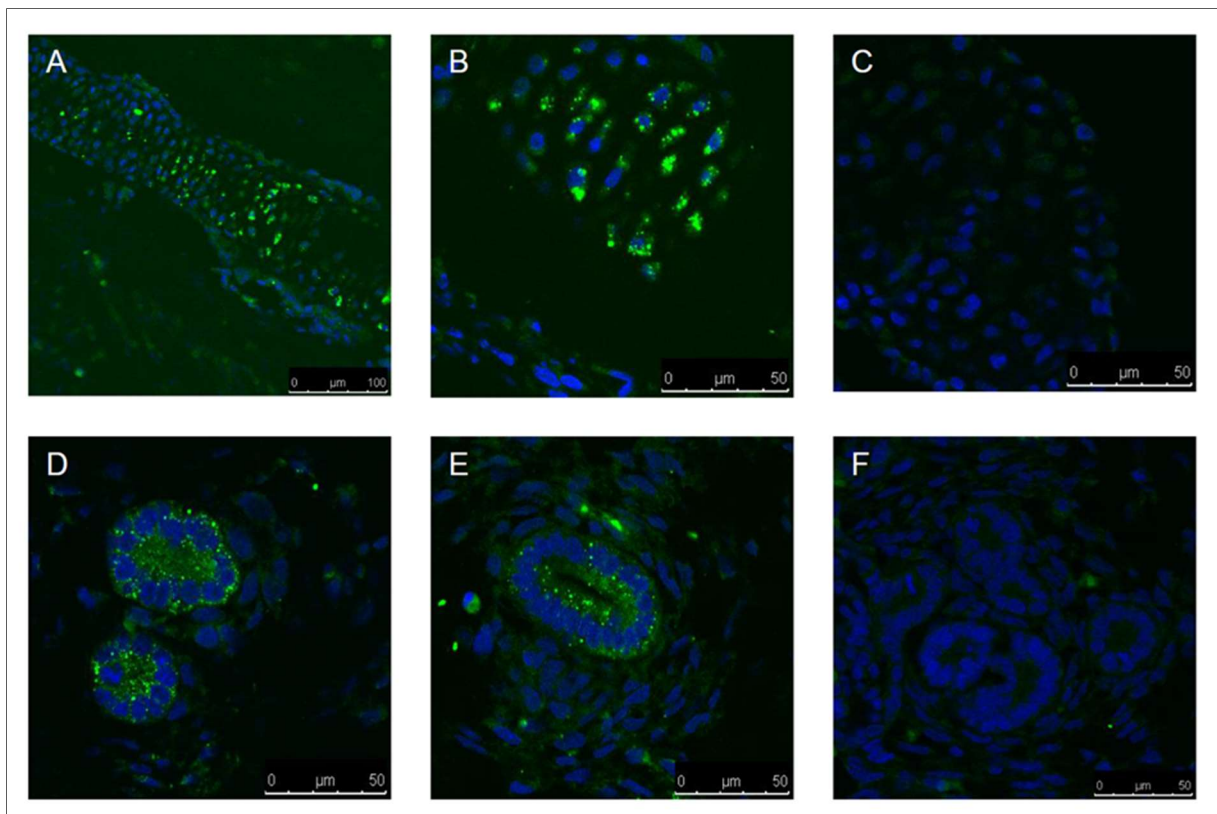


Abb. 14: Nachweis von IGFBP5 durch Immunhistochemie in der Niere und den Knochenkernen von Rattenembryonen.

Es wurden fortlaufende, 8 μ m dicke Kryoschnitte von Rattenembryonen zum Entwicklungszeitpunkt E14.5 angefertigt. Zur Darstellung von IGFBP5 wurde ein spezifischer Antikörper aus der Ziege verwendet (C-18 sc-6006, 1:250; A, B, D, E) und mit einem Cy2-markierten Zweitantikörper nachgewiesen (Esel-gegen-Ziege, Jackson 705-166-147; 1:200). Als Negativkontrolle wurde anstelle des Erstantikörpers ein normales Ziegenserum (normal goat IgG, 1:200; C, F) verwendet. In den Knochenkernen (A: 200fache Vergrößerung, B: 400fache Vergrößerung) und den unreifen Nierentubuli (D: 200fache Vergrößerung, E: 400fache Vergrößerung) zeigt sich ein grünes Fluoreszenzsignal. In den Negativkontrollen (C, F) kommt es zu keinem Signal. Die Zellkerne sind mit DAPI (blau) gegengefärbt.

Mittels der immunhistologischen Färbungen konnte IGFBP5 in der embryonalen Rattenniere und in den Kernen der sich entwickelnden Knochen gezeigt werden. Da es zu keiner Überlappung von IGFBP5 mit dem DAPI Signal kommt, scheint IGFBP5 in den Nierenanlagen und Knochenkernen außerhalb des Zellkerns im Zytoplasma lokalisiert zu sein (Abb. 14).

5 DISKUSSION

Der Transkriptionsfaktor WT1 ist für die normale Embryogenese erforderlich und spielt eine noch nicht vollständig geklärte Rolle beim Tumorwachstum [24, 27]. Neuere Untersuchungen haben ergeben, dass WT1 auch nach Abschluss der Entwicklung für den Struktur- und Funktionserhalt bestimmter Organe notwendig ist [30]. Neben anderen Störungen kommt es bei Mäusen mit induzierter *Wt1*-Deletion zu einem massiven Abbau von Knochensubstanz sowie zu einer signifikanten Abnahme der IGF-I-Plasmakonzentration [30]. Wichtige Rückschlüsse auf die biologische Funktion von WT1 ergeben sich vor allem aus der Identifizierung potenzieller, durch WT1 regulierter Zielgene. Im Rahmen dieser Arbeit sollte überprüft werden, ob es sich bei *IGFBP5*, das von zentraler Bedeutung für den Knochenstoffwechsel ist, um ein neues WT1-Zielgen handelt.

5.1 Die Expression von *IGFBP5* korreliert mit der zellulären WT1-Proteinmenge

Mit verschiedenen Versuchsansätzen konnte in der vorliegenden Arbeit ein Zusammenhang zwischen der Expression von *IGFBP5* und WT1 gezeigt werden. In der Mesonephroszelllinie M15 wurde mit spezifischen siRNAs gezielt ein Knockdown von WT1-Protein ausgelöst. Dabei führte die Herabregulation von WT1 zu einer signifikanten Abnahme der *Igfbp5*-mRNA (Abb.6). In weiteren Experimenten konnte nachgewiesen werden, dass diese Regulation auch in die umgekehrte Richtung funktioniert. Hierfür wurden die Osteosarkomzelllinien UB27 und UD28 verwendet, die jeweils nur eine Isoform des WT1-Proteins exprimieren. Es zeigte sich, dass die Induktion von WT1(-KTS) zu einer Hochregulation von *IGFBP5* in UB27-Zellen führt, während WT1(+KTS) in UD28-Zellen keinen signifikanten Einfluss hat (Abb. 6). Diese Resultate deuten darauf hin, dass die als Transkriptionsfaktor wirksame WT1(-KTS)-Variante die Expression von *IGFBP5* entweder direkt oder indirekt stimuliert.

Um den zugrunde liegenden Mechanismus zu charakterisieren, wurde der *IGFBP5*-Promotor näher untersucht. Durch Vergleich mit bekannten Konsensusmotiven wurden vier potenzielle Bindungsstellen für WT1 im Promotor des *IGFBP5*-Gens prognostiziert (Abb. 8, 9). Da WT1(-KTS)-Protein eindeutig als Transkriptionsfaktor charakterisiert werden konnte [10], ist diese Beobachtung als Hinweis auf eine Regulation des *IGFBP5*-

Gens durch WT1 zu werten (Abb. 7, 10, 11). Die Resultate der Reporterassays bestätigen, dass WT1 den *IGFBP5*-Promotor in U2OS-Osteosarkomzellen aktiviert. Die Luziferaseaktivität als Parameter für die Promotoraktivität war hierbei umso größer, je mehr WT1-Bindungsstellen im Reporterkonstrukt enthalten waren (Abb. 10). Da der Nachweis einer Transkriptionsaktivierung mittels Reporterassays auf der Verwendung synthetischer Promotorsequenzen beruht, war es wichtig, zu überprüfen, ob WT1 auch bei erhaltener Chromatinstruktur an den *IGFBP5*-Promotor rekrutiert wird. Ein solcher Nachweis gelang mittels ChIP-Assay. Dieser ergab, dass WT1(-KTS), nicht jedoch WT1(+KTS) Protein, an den *IGFBP5*-Promotor bindet (Abb. 11).

Zusammenfassend lässt sich sagen: In zwei unterschiedlichen untersuchten Zelllinien ist die *IGFBP5*-Expression vom *WT1*-Expressionsniveau abhängig. Dies deutet auf eine *WT1*-abhängige Expressionsregulation von *IGFBP5* hin. Unterstützt wird diese Schlussfolgerung durch die in Reporterassays nachgewiesene Aktivierung des *IGFBP5*-Promotors durch WT1(-KTS)-Protein. Die Ergebnisse der ChIP-Analysen zeigen, dass eine Bindung von WT1(-KTS)-Protein an den *IGFBP5*-Promotor auch bei intakter Chromatinstruktur erfolgt. Außer WT1 sind bereits andere Transkriptionsfaktoren bekannt, die die Aktivität des *IGFBP5*-Promotors regulieren. Das Onkoprotein Meningioma 1 Protein (MN1, meningioma disrupted in balanced translocation 1) welches in Meningeomen, einem von den Hirnhäuten ausgehenden benignen Tumor, mit *IGFBP5* coexpressiert wird, aktiviert nachweislich den *IGFBP5*-Promotor [67]. MN1^{-/-}-Mäuse weisen eine abnorme Entwicklung des Schädelknochens auf [68], was funktionell einen Zusammenhang mit der *IGFBP5*-Wirkung nahe legt, da *IGFBP5* eine entscheidende Rolle im Knochenstoffwechsel spielt. Des Weiteren konnte bereits gezeigt werden, dass der *IGFBP5*-Promotor transkriptionell unter anderem von Parathormon [69], dem Retinsäure-Rezeptor (RAR, retinoic acid receptor) [70], c-Myb and B-Myb [71], Prostaglandin E2 [72] und dem Glukokortikoid-Rezeptor [73], reguliert wird [67]. Es bleibt abzuklären, an welcher Stelle WT1 in das transkriptionelle Netzwerk für die *IGFBP5*-Expression eingebunden ist. Weiterhin gilt es zu untersuchen, mit welchen Transkriptionsfaktoren und Regulatormolekülen WT1 bei der Kontrolle der *IGFBP5*-Expression direkt oder indirekt interagiert.

5.2 Die Expression von *IGFBP5* wird durch Hypoxie stimuliert

Zusätzlich zu WT1 wurde eine verminderte O₂-Spannung als weiterer Stimulus für die Expression von *IGFBP5* identifiziert (Abb. 12). Zur Wirkung von Hypoxie auf die *IGFBP5*-Expression liegen bislang nur wenige und teilweise widersprüchliche Daten vor. Tucci et. al. stellten fest, dass Gefäßendothelzellen aus der Aorta, nicht jedoch aus der Pulmonalarterie, bei Hypoxie *IGFBP5* exprimieren [74]. Rahmann und Thomas konnten zeigen, dass unter chronischer Hypoxie die *IGFBP5*-mRNA-Expression in der Leber und im Gehirn von Umberfischen signifikant ansteigt [75]. Interessanterweise handelt es sich bei den in der vorliegenden Arbeit mit einer sauerstoffabhängigen *IGFBP5*-Expression identifizierten Kelly-Zellen ebenfalls um eine neuronale Zelllinie (Abb. 12). Dies deutet darauf hin, dass die sauerstoffabhängige Expression von *IGFBP5* zellspezifisch reguliert ist. Da Gefäßendothelzellen eine größere Hypoxietoleranz und andere Funktionen als Neurone besitzen, ist die unterschiedliche Regulation von *IGFBP5* durch Sauerstoffmangel in endothelialen und neuronalen Zellen nicht überraschend. Über die Software DNA-pattern wurden *in silico* mehrere potenzielle HIF-Bindungsstelle im 5'-flankierenden Bereich des *IGFBP5*-Gens prognostiziert (Abb. 9). Es bleibt abzuklären, ob Sauerstoffmangel die Expression von *IGFBP5* durch Bindung von HIF an den Promotor aktiviert oder ob andere, z.B. post-transkriptionelle Mechanismen, für diesen Effekt verantwortlich sind.

5.2 *IGFBP5* und WT1 spielen eine Rolle im Knochenstoffwechsel

IGFBP5 konnte bereits kurz nach seiner Entdeckung 1991 aus menschlichem Knochengewebe isoliert werden [40, 43]. Während der enchondralen Knochenentwicklung (Fetalperiode) wird *IGFBP5* in den sich differenzierenden Chondrozyten und Osteoblasten exprimiert [76, 77]. Welche genaue Rolle *IGFBP5* im Knochen spielt, ist noch unzureichend geklärt und wird kontrovers diskutiert [40]. Im Rahmen meiner Arbeit konnte eine Expression von *IGFBP5* sowohl im Knochen der adulten Maus als auch in den embryonalen Knochenkernen der Ratte nachgewiesen werden (Abb. 13, 14). Eine eindeutige Typisierung der *IGFBP5*-exprimierenden Knochenzellen war leider nicht möglich. Ungeachtet dieser Limitation stützen meine

Beobachtungen die postulierte Rolle von IGFBP5 im Knochenstoffwechsel während der Entwicklung und im Erwachsenenorganismus.

In einigen Studien wird IGFBP5 eine anabole Wirkung zugeschrieben [78]. So kam es in einem Mausmodell durch tägliche subcutane Injektion von IGFBP5 über 8 Wochen zu einer Kortikalisverdickung der Knochen um 20%. Jedoch wurde den Mäusen nicht ausschließlich IGFBP5 injiziert, sondern zusätzlich auch IGF-I. Somit lässt sich nicht eindeutig klären, von welchem der beiden Faktoren das vermehrte Knochenwachstum ausgeht [40]. Die alleinige Überexpression von IGF-I in reifen Osteoblasten verursachte eine Zunahme des trabekulären Knochenvolumens um 30% [79]. Aufgrund dieser Untersuchungsergebnisse kann nicht ausgeschlossen werden, dass IGFBP5 das Knochenwachstum eher mindert.

In anderen Arbeiten, in denen ausschließlich IGFBP5 injiziert wurde, konnten keine Knochenveränderungen festgestellt werden [80]. Es stellt sich die Frage, ob die alleinige Injektion von IGFBP5 überhaupt einen Effekt haben kann, denn ohne gebundenes IGF-I oder IGF-II steht IGFBP5 frei zur Proteolyse durch IGFBP-Proteasen und verliert dadurch seine biologische Wirksamkeit. Die Bindung von IGF scheint hingegen IGFBP5 vor dem proteolytischen Abbau zu schützen (→ 1.5 IGF-Achse, Abb. 2: Schematische Darstellung der IGF-Achse). Für IGFBPs sind jedoch nicht nur modulierende Funktionen von IGF-I und -II beschrieben, sondern auch IGF-unabhängige Effekte [40]. So wurde z.B. eine IGF-unabhängige Interaktion von IGFBP5 mit einem IGFBP5-Rezeptor in Osteoblasten postuliert [81, 82].

In anderen Studien wurde eine katabole Wirkung von IGFBP5 am Knochen festgestellt. So berichten Salih et al., dass eine ubiquitäre Überexpression von *Igfbp5* im Mausmodell zu einer signifikanten Verminderung der Knochenmineralisation/-dichte um 30% führt. Auffällig war dabei, dass diese Veränderung geschlechtsspezifisch auftrat und männliche Mäuse stärker betroffen waren als weibliche [83]. Peruzzi et al. konnten zeigen, dass IGFBP5 als Osteoblasten-Osteoklasten-Kopplungsfaktor fungiert und somit für das Gleichgewicht des Knochenumsatzes von Bedeutung ist. IGFBP5 wird in Osteoblasten und deren Vorläufern produziert, wirkt dabei über eine Veränderung des RANKL/Osteoprotegerin-Verhältnisses stimulierend auf die Osteoklastengnese bzw. Osteoklastenaktivität und verstärkt somit die Knochenresorption [84]. Was die Ergebnisse aller aufgelisteten Studien eint, ist die Tatsache, dass IGFBP5 einen

entscheidenden Einfluss auf den Knochenstoffwechsel hat. Was genau dazu führt, in welcher Weise sich diese Wirkung äußert, ob anabol, katabol oder modulierend, gilt es in Zukunft zu klären. Mögliche Gründe für die vielfältigen Ergebnisse der bisher durchgeführten Studien und damit der vielfältigen Wirkungsweise von IGFBP5 könnten u.a. die unterschiedlichen Ausgangsexpressionsniveaus von *IGFBP5s* in verschiedenen Zelllinien bzw. mögliche Unterschiede in der Expression des IGF-I-Rezeptors sein [85]. Weitere Ursachen könnten z.B. Unterschiede in den gemessenen Parametern oder aber der posttranslationalen Modifikation von IGFBP5 sein, je nachdem ob das verwendete Material einem *E.coli* System oder aber einer Säugetier-Quelle entstammt [40].

Im Rahmen meiner Arbeit konnte eine Expression von *Igfbp5* sowohl im Knochen der adulten Maus als auch in den embryonalen Knochenkernen der Ratte nachgewiesen werden (Abb. 13, 14). Diese Beobachtungen stützen die postulierte Rolle von IGFBP5 im Knochenstoffwechsel während der Entwicklung und im erwachsenen Organismus. Die zugrunde liegenden Wirkungsmechanismen gilt es noch zu klären.

Eine wichtige Grundlage bildet hierbei die Lokalisation von IGFBP5 in der Zelle, zytosolische versus nukleäre Expression und mögliche Transportmechanismen zwischen den verschiedenen Zellkompartimenten. IGFBP5 konnte bereits im Jahre 2000 im Zellkern lokalisiert werden [36]. Auch Butt et al. beschreiben 2006 eine intranukleäre, allerdings ebenfalls eine extranukleäre Lokalisation von IGFBP5 in Brustkrebszellen [42]. IGFBP5 besitzt ein klassisches nukleäres Transportsignal für den Proteinimport in den Zellkern. Außerdem konnte eine Interaktion mit nukleären Proteinen wie FHL2 (Four And A Half LIM Domains 2) und dem Vitamin-D-Rezeptor nachgewiesen werden, was eine potenzielle Rolle von IGFBP5 als Transkriptionsfaktor vermuten lässt [81, 86-89]. Im Rahmen der von mir durchgeführten Untersuchungen wurde IGFBP5 sowohl in embryonalen Knochen- als auch Nierenzellen ausschließlich zytoplasmatisch detektiert (Abb. 14). Die Funktion von IGFBP5 im Zytoplasma dieser Zellen gilt es, in weiteren Untersuchungen zu klären.

Nach induzierter ubiquitärer Deletion von *Wt1* entwickeln adulte Mäuse eine signifikante Reduktion des Knochenvolumens [30]. Dabei kam es zu einer massiven Osteoklastenaktivierung, die innerhalb weniger Wochen zu einer ausgeprägten Osteoporose führte [30]. Nach dem gegenwärtigen Kenntnisstand scheinen WT1 und IGFBP5 gegensätzliche Wirkungen auf den Knochenumsatz auszuüben. Hierfür gibt es

verschiedene Erklärungsmöglichkeiten. Neben WT1 regulieren weitere (Transkriptions)-faktoren mit teilweise unterschiedlichen Effekten die Expression von *IGFBP5* [36,40, 90]. Weiterhin erscheint es plausibel, dass die Verfügbarkeit von IGF eine wichtige Rolle für die Wirkung von IGFBP5 spielt. IGFBP5 bindet extrazellulär an IGF und hemmt dadurch dessen Bindung an den IGF-Rezeptor [91]. In Knochenzellen hingegen scheint die Signaltransduktion IGF-unabhängig über die Bindung bestimmter Oberflächenmotive bzw. Phosphorylierung des IGFBP5-Rezeptors zu funktionieren [81, 92, 93]. Interessanterweise wurden bei Mäusen mit induzierter *Wt1*-Inaktivierung dramatische Veränderungen des IGF-Haushalts beobachtet. So zeigten die *Wt1*-depletierten Mäuse eine 85% Reduktion des IGF-Gehalts im Serum gegenüber den Kontrollen [30]. Da im Serum zirkulierendes IGF zu 95% an IGFBPs, insbesondere IGFBP3 und IGFBP5, gebunden ist [32, 35], legt dies die Vermutung nahe, dass auch die Konzentration von IGFBP5 bei *Wt1*-Defizienz dramatisch erniedrigt ist. Dies würde die These stützen, dass ein regulatorischer Zusammenhang zwischen IGFBP5 und WT1 im Knochenstoffwechsel besteht.

Einschränkend ist festzustellen, dass bislang kein überzeugender Nachweis von WT1-Protein im Knochen gelungen ist. Auch mit eigenen Immunfärbungen war dies nicht möglich. Es kann deshalb zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht ausgeschlossen werden, dass WT1 auf indirektem Weg, z.B. durch Aktivierung eines osteogenen Wachstumsfaktors außerhalb des Skelettsystems, den Knochenumbau beeinflusst.

5.3 Tumoren

Eine hohes *WT1*-Expressionsniveau ist bereits in einer Vielzahl hämatologischer und solider maligner Neoplasien beschrieben worden, u.a. in Ovarial- und Mammakarzinomen, in hepatozellulären Karzinomen, Glioblastomen sowie Osteo- und Weichteilsarkomen [94]. Auch IGFBP5 konnte in einigen dieser Tumoren nachgewiesen werde [32, 36, 95]. Daraus ergibt sich die Möglichkeit, dass die Regulation der *IGFBP5*-Expression durch WT1 in der Pathogenese von Tumoren eine Rolle spielt. WT1 kommt im Organismus des Erwachsenen nur in relativ wenigen Zelltypen vor, u.a. in den Podozyten der Nierenglomeruli, (→ 1.3 WT1 in der Embryogenese), einer Subpopulation hämatopoietischer Vorläuferzellen und im Mesothel [30]. Eine Hochregulation in Tumoren

legt deshalb die Vermutung nahe, dass WT1 neben seiner Eigenschaft als Tumorsuppressor auch eine Rolle als potenzielles Onkogen spielt [24]. Die molekularen Mechanismen, die diesen gegensätzlichen Funktionen von WT1 zugrunde liegen, sind bislang ungeklärt.

Auch IGFBP5 ist in zahlreichen Tumoren und Krebszelllinien vorhanden. Das Expressionsniveau in den unterschiedlichen Tumorzellen variiert zwar, ist jedoch in den meisten Fällen im Vergleich zu gesundem Gewebe deutlich erhöht [32]. IGFBP5 ist u.a. in den normalen Epithelien der Brustdrüse und Prostata, sowie in den Granulosazellen des Ovars nachweisbar. In der Brustdrüse und der Prostata ist IGFBP5 während der frühen Apoptosephase hochreguliert [32, 35], spielt aber auch eine Rolle in Zellwachstum und -differenzierung [36, 97]. *IGFBP5* wird in maligne entarteten Zellen der genannten Gewebe exprimiert. In verschiedenen Brustkrebszelllinien (Östrogenrezeptor-positiv und -negativ) war das Expressionsniveau von *IGFBP5* deutlich erhöht [99]. Weiterhin wurde in Mammakarzinomen *in situ* im Vergleich zum umgebenden gesunden Gewebe eine verstärkte *IGFBP5*-Expression festgestellt [100]. Eine andere Studie zeigte, dass exogenes IGFBP5 über einen IGF-unabhängigen Reaktionsweg die Apoptose hemmt und damit das Überleben von Brustkrebszellen *in vitro* verbessert [36, 101]. Eine aktuelle Studie kam allerdings zu dem Ergebnis, dass eine Herabregulation von IGFBP5 das Risiko für Brustkrebs deutlich erhöht [90]. Folglich besteht kein Konsens darüber, ob IGFBP5 in Mammakarzinomen eine pro-apoptische, das Tumorstadium hemmende Rolle oder aber eine anti-apoptische, das Tumorstadium stimulierende Rolle einnimmt.

In Malignomen bzw. Zelllinien anderer Ursprungsgewebe konnte hingegen gezeigt werden, dass IGFBP5 einen protektiven Effekt besitzt. So hemmt eine Überexpression von *IGFBP5* z.B. die Proliferation von Zervixkarzinom- [102] und Osteosarkomzellen [103, 104]. Auch in Neuroblastomzellen ließ sich eine *IGFBP5*-Expression nachweisen. Die Effekte von IGFBP5 auf Neuroblastomzellen erwiesen sich als dosisabhängig: Während eine moderate Menge des IGFBP5-Proteins einen stimulierenden Effekt auf die Zellteilung ausübte, wirkten höhere Konzentrationen proliferationshemmend [71]. Wie lassen sich diese zum Teil kontroversen Studienergebnisse erklären? Offensichtlich sind die Regulation der *IGFBP5*-Expression und die zellulären IGFBP5-Wirkungen vom jeweiligen Zelltyp bzw. Ursprungsgewebe abhängig [32]. Eine mögliche Erklärung ist,

dass erhöhtes IGFBP5 die lokale Wirkung von IGF-I verstärkt und damit das Tumorwachstum stimuliert. Oder aber, dass IGFBP5 die lokale Wirkung von IGF-I hemmt und somit die Tumorprogression mindert [32]. Möglicherweise sind beide Theorien zutreffend und die Wirkung von IGFBP5 ist allein von seiner Konzentration abhängig [71]. Interessant wäre es, die Rolle von IGFBP5 bei der Zellzyklusregulation und Apoptoseinduktion näher zu untersuchen. Fragen, die sich hierbei stellen, lauten: Verursacht IGFBP5 einen Zellzyklusarrest, und/oder beeinflusst es den programmierten Zelltod? Interagiert IGFBP5 mit weiteren Tumorsuppressoren wie z.B. p53? Zwischen den beiden Tumorsuppressoren WT1 und p53 ist eine funktionelle Interaktion am IGF-IR bekannt. p53 moduliert hierbei die Affinität von WT1 an den IGF-IR-Promotor, wobei nur die WT1(-KTS)-Spleißvariante an den Promotor binden und diesen supprimieren kann. Ist jedoch p53 durch eine Mutation verändert, kann WT1 den Promotor nicht mehr binden [105].

Idelmann et al. konnten zeigen, dass die transkriptionelle Aktivität und damit die biologische Funktion des WT1-Proteins entweder als Tumorsuppressor oder aber als Onkogen zu wirken, von p53 beeinflusst wird [105]. Auch IGFBP5 interagiert über IGF mit dem IGF-IR und scheint über einen p53-abhängigen-Signalweg eine Rolle in der Regulation des zellulären Alterungsprozesses zu spielen. Dies lässt einen funktionellen Zusammenhang der beiden Faktoren vermuten [106].

Die Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, die Rolle von IGFBP5 und WT1 in Knochentumoren näher zu betrachten. Osteosarkome sind die häufigsten primären Tumoren des Knochens im Kindes- und jungen Erwachsenenalter [107]. Da viele Osteosarkome radiologisch nicht detektierbar sind, erfolgt die Diagnosestellung bei 80% der Patienten erst nach Metastasierung [108]. Einen genetischen Marker zu finden, könnte den Krankheitsnachweis in einem früheren Stadium ermöglichen und die Prognose für die Patienten verbessern [95].

Im Gegensatz zu anderen soliden Tumoren, wie z.B. Mamma- oder Urothelkarzinomen, scheint IGFBP5 das Wachstum von Osteosarkomen zu verlangsamen [95]. Eine *IGFBP5* Überexpression *in vitro* hemmt die Proliferation, Migration und Invasion von Osteosarkomzellen [95]. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die forcierte Expression von *IGFBP5* in Osteosarkomzellen pro-apoptotisch wirkt, den Zellzyklusarrest in der G1 Phase fördert und die Invasivität der Tumorzellen signifikant verringert [95]. Ein siRNA-

vermittelter Knockdown von *IGFBP5* bewirkt hingegen *in vivo* ein vermehrtes Tumorwachstum sowie eine Zunahme der Invasivität um 110% [95]. Weiterhin treten bei Hemmung der *IGFBP5*-Expression große Fernmetastasen, insbesondere in den Lungen auf [95]. In einer früheren Studie verursachte die Überexpression von *IGFBP5* eine Reduktion der Proliferation von Osteosarkomzellen um 30% [40].

Auch *WT1* wird in humanen Osteosarkomzellen verstärkt exprimiert [109]. Ein hohes *WT1*-Niveau in den Tumoren ist mit einem aggressiven, metastasierenden Verlauf und einer schlechten Krankheitsprognose verknüpft [110]. Es scheint, als würden *WT1* und *IGFBP5* in soliden Knochentumoren als funktionelle Gegenspieler wirken. Die Fragen, die es in diesem Zusammenhang zu klären gilt, lauten: Warum wirkt *IGFBP5* in Tumoren verschiedener Ursprungsgewebe unterschiedlich? Nimmt der Knochen bzw. nehmen Knochentumoren eine Sonderrolle bezüglich der *IGFBP5*-Funktion und -Wirkung ein? In welcher Weise beeinflusst *WT1* die Funktion von *IGFBP5*?

In weiteren Studien gilt es zu klären, inwiefern die Interaktion mit anderen (Transkriptions)- Faktoren entscheidend für die Wirkung von *IGFBP5* ist, und ob man dieses Wissen zukünftig zur Risikoabschätzung und Behandlung von Neoplasien nutzen kann. Ein erster Schritt in diese Richtung könnte die Etablierung von *IGFBP5* als Prognosefaktor bestimmter Tumorerkrankungen sein. So konnte nachgewiesen werden, dass in invasiven Brusttumoren das Expressionsniveau von *IGFBP5* deutlich höher ist als in nicht invasiven Tumoren [111]. Dementsprechend könnte *IGFBP5* als Marker bei Brustkrebserkrankungen sowie für die Prognose des Outcomes dienen [111]. Auch in Urothelkarzinomen war das *IGFBP5*-Expressionsniveau signifikant erhöht und korrelierte mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium sowie einem ungünstigen Krankheitsverlauf [112]. Es besteht deshalb die berechtigte Hoffnung, dass ein Verständnis der molekularen Wirkungsmechanismen von *IGFBP5* zu einer Verbesserung der Diagnose und Therapie maligner Tumoren führen kann.

6 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abkürzung	Bedeutung
Abb.	Abbildung
ANOVA	analysis of variance
ALS	Leucinreiches Glykoprotein
ATG	Adenin, Thymin, Guanin
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	komplementäre DNA
ChIP	Chromatinimmunpräzipitation
C _T	Cycle threshold
CTG	Cytosin, Thymin, Guanin
Cys	Cystein
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindole
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
EZM	extrazelluläre Matrix
EZP	Extrazelluläres Protein
FCS	fetales Kälberserum
FHL2	four and a half LIM domain protein
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
GAG	Glykosaminglykane
GC	Guanin, Cytosin
GH	Growth hormon
h	Stunde
His	Histidin

HRP	Horseradish peroxidase
<i>IGFBP5</i>	Insulin-like growth factor binding protein 5 -Gen, human
<i>Igfbp5</i>	Insulin-like growth factor binding protein 5 -Gen, murin
IGFBP5	IGFBP5 -Protein, human und nicht-human
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KTS	Lysin, Threonin, Serin
MET	mesenchymal-epitheliale Transition
min	Minute
mRNA	messenger RNA
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase
RT-qPCR	quantitative Real-Time PCR
rmp	Umdrehungen pro Minute
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
siRNA	small interfering RNA
Sp1	specificity protein 1
SRY	Sex determining region of Y
TBE	Tris, Borsäure, EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(trimethylsilyl)silan
TSH	Thyroidea stimulierendes Hormon
Wnt4	wingless-related MMTV integration site 4
<i>WT1</i>	Wilmstumor 1 -Gen, human
<i>Wt1</i>	Wilmstumor 1 -Gen, murin
WT1	WT1-Protein, human und nicht-human

7 LITERATURNACHWEIS

- 1 Hastie ND. The genetics of Wilms' tumor - a case of disrupted development. *Annu Rev Genet.* 1994; 28:523-58.
- 2 Beckwith JB, Kiviat NB, Bonadio JF. Nephrogenic rests, nephroblastomatosis, and the pathogenesis of Wilms' tumor. *Pediatr Pathol* 1990; 10:1-36.
- 3 Dome JS, Huff V. Wilms Tumor Overview. GeneReviews®. Seattle (WA): University of Washington, Seattle 1993-2014.
- 4 Gessler M, Poustka A, Cavenee W, Neve RL, Orkin SH, Bruns GAP. Homozygous deletion in Wilms' tumours of a gene identified by chromosome jumping. *Nature* 1990; 343:774-778.
- 5 Call KM, Galser T, Ito CY et al. Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus. *Cell* 1990; 60: 509-520.
- 6 Haber DA, Buckler AJ. WT1: a novel tumor suppressor gene inactivated in Wilms' tumor. *New Biol* 1992; 4(2):97-106.
- 7 Bruening W, Pelletier J. A non-AUG translational initiation event generates novel WT1 isoforms. *J Biol Chem* 1996; 271(15):8646-54.
- 8 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* 1991; 88:9618-22.
- 9 Sharma PM, Bowman M, Madden SL, Rauscher FJ, Sukumar S. RNA editing in the Wilms' tumor susceptibility gene, WT1. *Genes Dev* 1994; 8:720-31.
- 10 Hohenstein P, Hastie ND. The many facets of the Wilms' tumour gene, WT1. *Human Molecular Genetics* 2006; 15:196-201.
- 11 Scholz H, Kirschner KM. A Role for the Wilms' Tumor Protein in Organ Development. *Am Physiol Soc* 2005; 20:54-59.

- 12 Morris JF, Madden SL, Tournay OE, Cook DM, Sukhatme VP, Rauscher FJ. Characterization of the zinc finger protein encoded by the WT1 Wilms' tumor locus. *Oncogene* 1991; 6 (12):2339–48.
- 13 Lee SB, Haber DA. Wilms tumor and the WT1 gene. *Exp Cell Res* 2001; 264(1):74-99.
- 14 Davies RC, Calvio C, Bratt E, Larsson S, Lamond A, Hastie ND. WT1 interacts with the splicing factor U2AF65 in an isoform-dependent manner and can be incorporated into spliceosomes. *Genes Dev* 1998; 12:3217-3225.
- 15 Drummond IA, Madden SL, Rohwer-Nutter P, Bell GI. Repression of the insulin-like growth factor II gene by the Wilms tumor suppressor WT1. *Science* 1992; 257(5070):674–78.
- 16 Werner H, Rauscher FJ, Sukhatme VP, Drummond IA. Transcriptional repression of the insulin-like growth factor I receptor (IGF-I-R) gene by the tumor suppressor WT1 involves binding to sequences both upstream and downstream of the IGF-I-R gene transcription start site. *J Biol Chem* 1991; 269(17):12577–82.
- 17 Heckman C, Mochon E, Arcinas M, Boxer LM. The WT1 protein is a negative regulator of the normal bcl-2 allele in t(14;18) lymphomas. *J Biol Chem* 1997; 272(31):19609–14.
- 18 Loeb DM, Korz S, Katsnelson M, Burwell EA. Cyclin E is a target of WT1 transcriptional repression. *J Biol Chem* 2002; 277(22):19627–32.
- 19 Essafi A, Webb A, Berry RL, Slight J. A wt1-controlled chromatin switching mechanism underpins tissue-specific wnt4 activation and repression. *Dev Cell* 2011; 21(3):559–74.
- 20 Dame C, Kirschner KM, Bartz KV, Wallach T. Wilms tumor suppressor, Wt1, is a transcriptional activator of the erythropoietin gene. *Blood* 2006; 107(11):4282-90.

- 21 Kirschner KM, Hagen P, Hussels CS, Ballmaier M. The Wilms' tumor suppressor Wt1 activates transcription of the erythropoietin receptor in hematopoietic progenitor cells. *FASEB J* 2008; 22(8):2690–701.
- 22 Gu W, Hu S, Chen Z, Qiu G, Cen J, He B, He J, Wu W. High expression of WT1 gene in acute myeloid leukemias with more predominant WT1+17AA isoforms at relapse. *Leukemia Research* 2010; 34:46-49.
- 23 Ito K, Oji Y, Tatsumi N, Shimizu S, Kanai Y, Nakazawa T, Asada M, Jomgeow T, Aoyagi S, Nakano Y, Tamaki H, Sakaguchi N, Shirakata T, Nishida S, Kawakami M, Tsuboi A, Oka Y, Tsujimoto Y, Sugiyama H. Antiapoptotic function of 17AA(+)WT1 (Wilms' tumor gene) isoforms on the intrinsic apoptosis pathway. *Oncogene* 2006; 25(30):4217–29.
- 24 Toska E, Roberts SG. Mechanisms of transcriptional regulation by WT1 (Wilms' tumour 1). *Biochem J* 2014; 461(1):15-32.
- 25 Oka Y, Tsuboi A, Elisseeva OA, Nakajima H, Fujiki F. WT1 peptide cancer vaccine for patients with hematopoietic malignancies and solid cancers. *ScientificWorldJournal* 2007; 7:649–665.
- 26 Ueda T, Kakunaga S, Oka Y, Oji Y, Tsuboi A, Hashimoto N, Myoui A, Aozasa K, Sugiyama H, Yoshikawa H. Tumor immunotherapy targeting WT1 (Wilms' tumor gene) peptide for bone and soft-tissue sarcomas: A preliminary report. *Journal of Clinical Oncology* 2007; 25(18):10042.
- 27 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(4):679–91.
- 28 Rivera MN and Haber D. Wilms' Tumour: Connecting tumorigenesis and organ development in the kidney. *Nat Rev Cancer* 2005; 5(10):835.
- 29 Baum B, Settleman J, Quinlan MP. Transitions between epithelial and mesenchymal states in development and disease. *Semin Cell Dev Biol* 2008; 19(3): 294–308.

- 30 Chau YY, Brownstein D, Mjoseng H, Lee WC, Buza-Vidas N, Nerlov C, Jacobsen SE, Perry P, Berry R, Thornburn A, Sexton D, Morton N, Hohenstein P, Freyer E, Samuel K, van't Hof R, Hastie N. Acute multiple organ failure in adult mice deleted for the developmental regulator *Wt1*. *PLoS Genet* 2011; 7(12):e1002404.
- 31 Hohenstein P, Hastie ND. The many facets of the Wilms' tumour gene, *WT1*. *Hum Mol Genet* 2006; 15(2):R196-201.
- 32 Beattie J, Allan GJ, Lochrie JD, Flint DJ. Insulin-like growth factor-binding protein-5 (IGFBP-5): a critical member of the IGF axis. *Biochem J* 2006; 395:1-19.
- 33 http://www.igfsociety.org/joomla15/index.php?option=com_content&view=category&layout=blog&id=1&Itemid=7 [Zugriff 24. September 2014].
- 34 Sara VR, Hall K. Insulin-Like Growth Factors and Their Binding Proteins. *The American Physiological Society* 1990; 70(3):591-605.
- 35 Firth SM, Baxter RC. Cellular Actions of the Insulin-Like Growth Factor Binding Proteins. *The Endocrine Society (Endocrine Reviews)* 2002; 23(6):824-854.
- 36 Schneider MR, Wolf E, Hoeflich A, Lahm H. IGF-binding protein-5: flexible player in the IGF system and effector on its own. *J Encocrinol* 2002; 172(3):423-40.
- 37 Kornfeld S. Structure and function of the mannose 6-phosphate/ insulin-like growth factor II receptors. *Annual Review of Biochemistry* 1992; 61:307–330.
- 38 Twigg SM, Baxter RC. Insulin-like growth factor (IGF)-binding protein 5 forms an alternative ternary complex with IGFs and the acid-labile subunit. *J Biol Chem* 1998; 273:6074–6079.
- 39 Andress DL, Birnbaum RS. Human osteoblast-derived insulin-like growth factor (IGF) binding protein-5 stimulates osteoblast mitogenesis and potentiates IGF action. *J Biol Chem* 1992; 267:22467-22472.

- 40 Mukherjee A and Rotwein P. Insulin-like growth factor binding protein-5 in osteogenesis: facilitator or inhibitor? *Growth Horm IGF Res* 2007; 17 (3):179-85.
- 41 James PL, Jones SB, Busby WH, Clemmons DR, Rotwein P. A highly conserved insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP-5) is expressed during myoblast differentiation. *Journal of Biological Chemistry* 1993; 268:22305-22312.
- 42 Butt AJ, Dickson K A, Jambazov S and Baxter RC. Enhancement of tumornecrosis factor- α -induced growth inhibition by insulin-like growth factor-binding protein-5 (IGFBP-5), but not IGFBP-3 in human breast cancer cells. *Endocrinology* 2005; 146:3113–3122
- 43 Bautista CM, Baylink DJ, Mohan S. Isolation of a novel insulin-like growth factor (IGF) binding protein from human bone: a potential candidate for fixing IGF-II in human bone. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991. 176:756–763.
- 44 Rajaram S, Baylink DJ, Mohan S. Insulin-like growth factor-binding proteins in serum and other biological fluids: regulation and functions. *Endocr Rev* 1997; 18(6):801-31.
- 45 Rosen CJ. IGF-I and osteoporosis. *Clinical Laboratory Medicine* 2000; 20:591-602.
- 46 Jehle PM, Ostertag A, Schulten K, Schulz W, Jehle DR, Stracke S, Fiedler R, Deuber HJ, Keller F, Boehm BO, Baylink DJ, Mohan S. Insulin-like growth factor system components in hyperparathyroidism and renal osteodystrophy. *Kidney International* 2000; 57:423–436.
- 47 Larsson SH, Charlieu JP, Miyagawa K, Engelkamp D, Rassoulzadegan M, Ross A, Cuzin F, Van H, V, Hastie ND. Subnuclear localization of WT1 in splicing or transcription factor domains is regulated by alternative splicing. *Cell* 1995; 81(3):391-401.
- 48 Alibaba: <http://www.gene-regulation.com/pub/programs/alibaba2/index.html>. [Zugriff 24. September 2014].

- 49 DNA-pattern: http://www.bioinformatics.org/sms2/dna_pattern.html [Zugriff 24. September 2014].
- 50 Motamedi FJ, Badro DA, Clarkson M, Lecca MR, Bradford ST, Buske FA, Saar K, Hübner N, Brändli AW, Schedl A. WT1 controls antagonistic FGF and BMP-pSMAD pathways in early renal progenitors. *Nat Commun* 2014; 17(5):4444.
- 51 Kilkenny C, Browne W, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG; NC3Rs Reporting Guidelines Working Group. Animal research: reporting in vivo experiments: the ARRIVE guidelines. *J Gene Med* 2010; 12(7):561-3.
- 52 Russell WM. The development of the three Rs concept. *Altern Lab Anim* 1995. 23(3):298-304.
- 53 Untergrasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG. Primer3 - new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*. 2012; 40(15):e115; Available at: <http://primer3.ut.ee/>
- 54 Koressaar T, Remm M. Enhancements and modifications of primer design program Primer3 *Bioinformatics* 2007; 23(10):1289-91.
- 55 <http://www.ensembl.org/index.html> [Zugriff 24. September 2014].
- 56 http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Summary?db=core;g=ENSG00000115461;r=2:216672105-216695525;t=ENST00000233813 [Zugriff 24. September 2014].
- 57 http://www.ensembl.org/Mus_musculus/Gene/Summary?db=core;g=ENSMUSG00000026185;r=1:72857932-72874884 [Zugriff 24. September 2014].
- 58 Hartwig S, Ho J, Pandey P, Maclsaac K, Taglienti M, Xiang M, Alterovitz G, Ramoni M, Fraenkel E, Kreidberg JA. Genomic characterization of Wilms' tumor suppressor 1 targets in nephron progenitor cells during kidney development. *Development* 2010; 137:1189-1203
- 59 Wagner KD, Wagner N, Wellmann S, Schley G, Bondke A, Theres H, Scholz H. Oxygen-regulated expression of the Wilms' tumor suppressor Wt1 involves hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *FASEB J*. 2003; 17(10):1364-6.

- 60 Schödel J, Oikonomopoulos S, Ragoussis J, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Mole DR. High-resolution genome-wide mapping of HIF-binding sites by ChIP-seq. *Blood*. 2011; 117(23):e207-17.
- 61 Wagner KD, Wagner N, Bondke A, Nafz B, Flemming B, Theres H, Scholz H. The Wilms' tumor suppressor Wt1 is expressed in the coronary vasculature after myocardial infarction. *FASEB J* 2002; 16(9):1117-9.
- 62 Wagner KD, Wagner N, Wellmann S, Schley G, Bondke A, Theres H, Scholz H. Oxygen-regulated expression of the Wilms' tumor suppressor Wt1 involves hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *FASEB J* 2003; 17(10):1364-6.
- 63 Wagner KD, Wagner N, Sukhatme VP, Scholz H. Activation of vitamin D receptor by the Wilms' tumor gene product mediates apoptosis of renal cells. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12(6):1188-96.
- 64 Wagner KD, Wagner N, Vidal VP, Schley G, Wilhelm D, Schedl A, Englert C, Scholz H. The Wilms' tumor gene Wt1 is required for normal development of the retina. *EMBO J* 2002; 21(6):1398-405.
- 65 Wagner N, Wagner KD, Hammes A, Kirschner KM, Vidal VP, Schedl A, Scholz H. A splice variant of the Wilms' tumour suppressor Wt1 is required for normal development of the olfactory system. *Development* 2005; 132(6):1327-36.
- 66 Armstrong JF, Pritchard-Jones K, Bickmore WA, Hastie ND, Bard JB. The expression of the Wilms' tumour gene, WT1, in the developing mammalian embryo. *Mech Dev* 1993; 40(1-2):85-97.
- 67 Meester-Smoor MA, Molijn AC, Zhao Y, Groen NA, Groffen CA, Boogaard M, van Dalsum-Verbiest D, Grosveld GC, Zwarthoff EC. The MN1 oncoprotein activates transcription of the IGFBP5 promoter through a CACCC-rich consensus sequence. *J Mol Endocrinol* 2007; 38(1-2):113-25.
- 68 Meester-Smoor MA, Vermeij M, van Helmond MJ, Molijn AC, van Wely KH, Hekman AC, Vermey-Keers C, Riegman PH & Zwarthoff EC. Targeted disruption of the Mn1 oncogene results in severe defects in development of membranous

- bones of the cranial skeleton. *Molecular and Cellular Biology* 2005; 25:4229–4236.
- 69 Erclik MS and Mitchell J. Activation of the insulin-like growth factor binding protein-5 promoter by parathyroid hormone in osteosarcoma cells requires activation of an activated protein-2 element. *Journal of Molecular Endocrinology* 2005; 34:713–722.
- 70 Cesi V, Vitali R, Tanno B, Giuffrida ML, Sesti F, Mancini C, Raschella G. Insulin-like growth factor binding protein 5: contribution to growth and differentiation of neuroblastoma cells. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2005; 1028 59–68.
- 71 Tanno B, Negroni A, Vitali R, Pirozzoli MC, Cesi V, Mancini C, Calabretta B, Raschella G. Expression of insulin-like growth factor-binding protein 5 in neuroblastoma cells is regulated at the transcriptional level by c-Myb and B-Myb via direct and indirect mechanisms. *J Biol Chem* 2002; 277:23172–23180.
- 72 Ji C, Chen Y, Centrella M & McCarthy TL. Activation of the insulin-like growth factor-binding protein-5 promoter in osteoblasts by cooperative E box, CCAAT enhancer-binding protein, and nuclear factor-1 deoxyribonucleic acid-binding sequences. *Endocrinology* 1999; 140:4564–4572.
- 73 Gabbitas B, Pash JM, Delany AM & Canalis E. Cortisol inhibits the synthesis of insulin-like growth factor-binding protein-5 in bone cell cultures by transcriptional mechanisms. *Journal of Biological Chemistry* 1996; 271:9033–9038.
- 74 Tucci M, Nygard K, Tanswell BV, Farber HW, Hill DJ, Han VK. Modulation of insulin-like growth factor (IGF) and IGF binding protein biosynthesis by hypoxia in cultured vascular endothelial cells. *J Endocrinol* 1998; 157(1):13-24.
- 75 Rahman MS, Thomas P. Characterization of three IGFBP mRNAs in Atlantic croaker and their regulation during hypoxic stress: potential mechanisms of their upregulation by hypoxia. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2011; 301(4):E637-48.
- 76 Olney RC, Mougey EB. Expression of the components of the insulin-like growth factor axis across the growth-plate. *Mol Cell Endocrinol* 1999; 156:63–71.

- 77 Kiepe D, Andress DL, Mohan S, Standker L, Ulinski T, Himmele R, Mehls O, Tonshoff B. Intact IGF-binding protein-4 and -5 and their respective fragments isolated from chronic renal failure serum differentially modulate IGF-I actions in cultured growth plate chondrocytes. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12:2400–2410.
- 78 Bauss F, Lang K, Dony C, Kling L. The complex of recombinant human insulin-like growth factor-I (rhIGF-I) and its binding protein-5 (IGFBP-5) induces local bone formation in murine calvariae and in rat cortical bone after local or systemic administration. *Growth Horm IGF Res* 2001; 11:1–9.
- 79 Zhao G, Monier-Faugere MC, Langub MC, Geng Z, Nakayama T, Pike JW, Chernausek SD, Rosen CJ, Donahue LR, Malluche HH, Fagin JA, Clemens TL. Targeted overexpression of insulin-like growth factor I to osteoblasts of transgenic mice: increased trabecular bone volume without increased osteoblast proliferation. *Endocrinology* 2000; 141:2674–2682
- 80 Miyakoshi N, Richman C, Kasukawa Y, Linkhart TA, Baylink DJ, Mohan S. Evidence that IGF-binding protein-5 functions as a growth factor. *J Clin Invest* 2001; 107:73–81
- 81 Pérez-Casellas LA, Wang X, Howard K, Rehage MW, Strong DD, Linkhart TA. Nuclear Factor I transcription factors regulate IGF binding protein 5 gene transcription in human osteoblasts. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1789(2): 78–87.
- 82 Andress DL. Insulin-like growth factor-binding protein-5 (IGFBP-5) stimulates phosphorylation of the IGFBP-5 receptor. *Am J Physiol* 1998; 274:E744–750
- 83 Salih DA, Mohan S, Kasukawa Y, Tripathi G, Lovett FA, Anderson NF, Carter EJ, Wergedal JE, Baylink DJ, Pell JM. Insulin-like growth factor-binding protein-5 induces a gender-related decrease in bone mineral density in transgenic mice. *Endocrinology* 2005; 146:931–940.
- 84 Peruzzi B, Cappariello A, Del Fattore A, Rucci N, De Benedetti F, Teti A. c-Src and IL-6 inhibit osteoblast differentiation and integrate IGFBP5 signalling. *Nat Commun* 2012; 3:630

- 85 Malpe R, Baylink DJ, Linkhart TA, Wergedal JE, Mohan S. Insulin-like growth factor (IGF)-I, -II, IGF binding proteins (IGFBP)-3, -4, and -5 levels in the conditioned media of normal human bone cells are skeletal site-dependent. *J Bone Miner Res* 1997; 12:423–430
- 86 Schedlich LJ, Young TF, Firth SM, Baxter RC. Insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP)-3 and IGFBP-5 share a common nuclear transport pathway in T47D human breast carcinoma cells. *J Biol Chem* 1998; 273:18347–18352
- 87 Amaar YG, Thompson GR, Linkhart TA, Chen ST, Baylink DJ, Mohan S. Insulin-like growth factor-binding protein 5 (IGFBP-5) interacts with a four and a half LIM protein 2 (FHL2) *J Biol Chem* 2002; 277:12053–12060
- 88 Schedlich LJ, Muthukaruppan A, O'Han M K, Baxter RC. Insulin-like growth factor binding protein-5 interacts with the vitamin d receptor and modulates the vitamin d response in osteoblasts. *Mol Endocrinol* 2007; 21:2378–2390.
- 89 Zhao Y, Yin P, Bach LA, Duan C. Several acidic amino acids in the N-domain of insulin-like growth factor-binding protein-5 are important for its transactivation activity. *J Biol Chem* 2006; 281:14184–14191.
- 90 Ghossaini M, Edwards SL, Michailidou K, Nord S, Cowper-Sal Lari R, Desai K, Kar S, Hillman KM, Kaufmann S, Glubb DM, Beesley J, Dennis J, Bolla MK, Wang Q, Dicks E, Guo Q, Schmidt MK, Shah M, Luben R, Brown J, Czene K, Darabi H, Eriksson M, Klevebring D, Bojesen SE, Nordestgaard BG, Nielsen SF, Flyger H, Lambrechts D, Thienpont B, Neven P, Wildiers H, Broeks A, Van't Veer LJ, Th Rutgers EJ, Couch FJ, Olson JE, Hallberg E, Vachon C, Chang-Claude J, Rudolph A, Seibold P, Flesch-Janys D, Peto J, Dos-Santos-Silva I, Gibson L, Nevanlinna H, Muranen TA, Aittomäki K, Blomqvist C, Hall P, Li J, Liu J, Humphreys K, Kang D, Choi JY, Park SK, Noh DY, Matsuo K, Ito H, Iwata H, Yatabe Y, Guénel P, Truong T, Menegaux F, Sanchez M, Burwinkel B, Marme F, Schneeweiss A, Sohn C, Wu AH, Tseng CC, Van Den Berg D, Stram DO, Benitez J, Zamora MP, Perez JI, Menéndez P, Shu XO, Lu W, Gao YT, Cai Q, Cox A, Cross SS, Reed MW, Andrulis IL, Knight JA, Glendon G, Tchatchou S, Sawyer EJ, Tomlinson I, Kerin MJ, Miller N, Haiman CA, Henderson BE,

- Schumacher F, Le Marchand L, Lindblom A, Margolin S, Teo SH, Yip CH, Lee DS, Wong TY, Hooning MJ, Martens JW, Collée JM, van Deurzen CH, Hopper JL, Southey MC, Tsimiklis H, Kapuscinski MK, Shen CY, Wu PE, Yu JC, Chen ST, Alnæs GG, Borresen-Dale AL, Giles GG, Milne RL, McLean C, Muir K, Lophatananon A, Stewart-Brown S, Siriwanarangsana P, Hartman M, Miao H, Buhari SA, Teo YY, Fasching PA, Haeberle L, Ekici AB, Beckmann MW, Brenner H, Dieffenbach AK, Arndt V, Stegmaier C, Swerdlow A, Ashworth A, Orr N, Schoemaker MJ, García-Closas M, Figueroa J, Chanock SJ, Lissowska J, Simard J, Goldberg MS, Labrèche F, Dumont M, Winqvist R, Pylkäs K, Jukkola-Vuorinen A, Brauch H, Brüning T, Koto YD, Radice P, Peterlongo P, Bonanni B, Volorio S, Dörk T, Bogdanova NV, Helbig S, Mannermaa A, Kataja V, Kosma VM, Hartikainen JM, Devilee P, Tollenaar RA, Seynaeve C, Van Asperen CJ, Jakubowska A, Lubinski J, Jaworska-Bieniek K, Durda K, Slager S, Toland AE, Ambrosone CB, Yannoukakos D, Sangrairang S, Gaborieau V, Brennan P, McKay J, Hamann U, Torres D, Zheng W, Long J, Anton-Culver H, Neuhausen SL, Luccarini C, Baynes C, Ahmed S, Maranian M, Healey CS, González-Neira A, Pita G, Alonso MR, Alvarez N, Herrero D, Tessier DC, Vincent D, Bacot F, de Santiago I, Carroll J, Caldas C, Brown MA, Lupien M, Kristensen VN, Pharoah PD, Chenevix-Trench G, French JD, Easton DF, Dunning AM. Evidence that breast cancer risk at the 2q35 locus is mediated through IGFBP5 regulation. *Nat Commun* 2014; 23(4):4999.
- 91 Mukherjee A, Rotwein P. Insulin-like growth factor-binding protein-5 inhibits osteoblast differentiation and skeletal growth by blocking insulin-like growth factor actions. *Mol Endocrinol* 2008; 22(5):1238-50.
- 92 Andress DL. Heparin modulates the binding of insulin-like growth factor (IGF) binding protein-5 to a membrane protein in osteoblastic cells. *J Biol Chem* 1995; 270:28289–28296.
- 93 Mohan S, Nakao Y, Honda Y, Landale E, Leser U, Dony C, Lang K, Baylink DJ. Studies on the mechanisms by which insulin-like growth factor (IGF) binding

- protein-4 (IGFBP-4) and IGFBP-5 modulate IGF actions in bone cells. *Journal of Biological Chemistry* 1995; 270:20424–20431.
- 94 Qi XW, Zhang F, Wu H, Liu JL, Zong BG, Xu C, Jiang J. Wilms' tumor 1 (WT1) expression and prognosis in solid cancer patients: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep* 2015; 9(5):8924.
- 95 Su Y, Wagner ER, Luo Q, Huang J, Chen L, He BC, Zuo GW, Shi Q, Zhang BQ, Zhu G, Bi Y, Luo J, Luo X, Kim SH, Shen J, Rastegar F, Huang E, Gao Y, Gao JL, Yang K, Wietholt C, Li M, Qin J, Haydon RC, He TC, Luu HH. Insulin-like growth factor binding protein 5 suppresses tumor growth and metastasis of human osteosarcoma. *Oncogene* 2011; 30(37):3907-17.
- 96 Flint DJ, Tonner E, Allan GJ. Insulin-like growth factor binding proteins: IGF-dependent and -independent effects in the mammary gland. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2000. 5:65–73
- 97 Miyake H, Nelson C, Rennie PS, Gleave ME. Overexpression of insulin-like growth factor binding protein-5 helps accelerate progression to androgen-independence in the human prostate LNCaP tumor model through activation of phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Endocrinology* 2000; 141:2257–2265.
- 98 Miyake H, Pollak M, Gleave ME. Castration-induced up-regulation of insulin-like growth factor binding protein-5 potentiates insulin-like growth factor-I activity and accelerates progression to androgen independence in prostate cancer models. *Cancer Research* 2000; 3058–3064.
- 99 Sheikh MS, Shao ZM, Clemmons DR, LeRoith D, Roberts Jr CT and Fontana JA. Identification of the insulin-like growth factor binding proteins 5 and 6 (IGFBP-5 and 6) in human breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 183:1003–1010.
- 100 Pekonen F, Nyman T, Ilvesmaki V, Partanen S. Insulin-like growth factor binding proteins in human breast cancer tissue. *Cancer Res* 1992; 52:5204–5207.
- 101 Perks CM, McCaig C, Holly JM. Differential insulin-like growth factor (IGF) independent interactions of IGF binding protein-3 and IGF binding protein-5 on

- apoptosis in human breast cancer cells. Involvement of the mitochondria. *Journal of Cellular Biochemistry* 2000; 80:248–258.
- 102 Higo H, Duan C, Clemmons DR and Herman B. Retinoic acid inhibits cell growth in HPV negative cervical carcinoma cells by induction of insulin-like growth factor binding protein-5 (IGFBP-5) secretion. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 239:706–709
- 103 Schneider MR, Zhou R, Hoeflich A, Krebs O, Schmidt J, Mohan S, Wolf E, Lahm H. Insulin-like growth factor-binding protein-5 inhibits growth and induces differentiation of mouse osteosarcoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 288:435–442.
- 104 Kiefer MC, Schmid C, Waldvogel M, Schlapfer I, Futo E, Masiarz FR, Green K, Barr PJ, Zapf J. Characterization of recombinant human insulin-like growth factor binding proteins 4, 5, and 6 produced in yeast. *Journal of Biological Chemistry* 1992; 267:12692–12699.
- 105 Idelman G, Glaser T, Roberts CT Jr, Werner H. WT1-p53 interactions in insulin-like growth factor-I receptor gene regulation. *J Biol Chem.* 2003; 278(5):3474-82.
- 106 Kwang SK, Young BS, Suk-Hwan B, Mi Jin K, Keuk Jun K, Jung HK, Jae-Ryong K. Induction of Cellular Senescence by Insulin-like Growth Factor Binding Protein-5 through a p53-dependent Mechanism. *Mol Biol Cell.* 2007; 18(11): 4543–4552.
- 107 Whelan JS. Osteosarcoma. *Eur J Cancer* 1997; 33:1611–1618.
- 108 Yonemoto T, Tatezaki S, Ishii T, Satoh T, Kimura H, Iwai N. Prognosis of osteosarcoma with pulmonary metastases at initial presentation is not dismal. *Clin Orthop* 1998; 349:194–199.
- 109 Ueda T, Oji Y, Naka N, Nakano Y, Takahashi E, Koga S, Asada M, Ikeba A, Nakatsuka S, Abeno S, Hosen N, Tomita Y, Aozasa K, Tamai N, Myoui A, Yoshikawa H, Sugiyama H. Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in human bone and soft-tissue sarcomas. *Cancer Sci* 2003; 94(3):271-6.

- 110 Srivastava A, Fuchs B, Zhang K, Ruan M, Halder C, Mahlum E, Weber K, Bolander ME, Sarkar G. High WT1 expression is associated with very poor survival of patients with osteogenic sarcoma metastasis. *Clin Cancer Res.* 2006; 12:4237-43.
- 111 Becker MA, Hou X, Harrington SC, Weroha SJ, Gonzalez SE, Jacob KA, Carboni JM, Gottardis MM, Haluska P. IGFBP ratio confers resistance to IGF targeting and correlates with increased invasion and poor outcome in breast tumors. *Clin Cancer Res* 2012; 18(6):1808-17.
- 112 Liang PI, Wang YH, Wu TF, Wu WR, Liao AC, Shen KH, Hsing CH, Shiue YL, Huang HY, Hsu HP, Chen LT, Lin CY, Tai C, Wu JY, Li CF. IGFBP-5 overexpression as a poor prognostic factor in patients with urothelial carcinomas of upper urinary tracts and urinary bladder. *J Clin Pathol.* 2013; 66(7):573-82.

8 EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG + ANTEILSERKLÄRUNG

„Ich, Miriam Müller, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Regulation von insulin-like growth factor binding protein 5 (IGFBP5) durch den Wilmstumor Transkriptionsfaktor WT1 – Mechanismen und pathophysiologische Konsequenzen“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Miriam Müller hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1 (Editorial):

Persson PB, Mueller M. Transcription. Acta Physiol (Oxf) 2015; 215(4):159-60.

Konzeption des Artikels, Literaturrecherche und Koauthorschaft.

Publikation 2 (Originalarbeit):

Müller M, Persson AB, Krueger K, Kirschner KM, Scholz H. The Wilms tumor protein WT1 stimulates transcription of the gene encoding insulin-like growth factor binding protein 5 (IGFBP5). Gene. 2017 Jul 1; 619:21-29.

Mitarbeit an Konzeption der Arbeit, Durchführung der Experimente, Verfassen des Manuskripts.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

9 LEBENS LAUF

“Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.”

10 PUBLIKATIONSLISTE

Mueller M, Bondke Persson A, Kirschner KM, Persson PB, Scholz H. The IGF binding protein-5 is a novel downstream signaling molecule of the Wilms' tumor suppressor WT1. *Acta Physiol (Oxf)*. 2014 Mar; 210 (695): 98. Abstract.

Persson PB, **Mueller M**. Transcription. *Acta Physiol (Oxf)*. 2015 Dec; 215(4): 159-60

Müller M, Persson AB, Krueger K, Kirschner KM, Scholz H. The Wilms tumor protein WT1 stimulates transcription of the gene encoding insulin-like growth factor binding protein 5 (IGFBP5). *Gene*. 2017 Jul 1; 619:21-29.

11 DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Vegetative Physiologie in der Arbeitsgruppe Zelluläre Entwicklungsphysiologie und Pathophysiologie unter der Leitung von Prof. Dr. Holger Scholz durchgeführt. Ich danke meiner ganzen Arbeitsgruppe für die freundliche Aufnahme.

Lieber Holger, danke für die interessante Fragestellung und die stete Förderung meiner Arbeit. Mein ganz besonderer Dank geht an meine Betreuerin Dr. Anja Bondke Persson. Liebe Anja, danke für deine immerwährende Unterstützung, für die Einarbeitung in die Methodik, die vielen Treffen zum Besprechen der Ergebnisse, die schnellen Korrekturen und für deinen Rat in allen Lebenslagen. Außerdem danke ich Dr. Karin Kirschner für ihre Unterstützung. Danke Ulrike Neumann für die ausgezeichnete technische Assistenz der experimentellen Arbeiten.

Ich danke meiner Familie für die Unterstützung meiner medizinischen Ausbildung.