

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

DISSERTATION

Wilms-Tumor-Protein (WT1) abhängige Genexpression  
während der Nierenentwicklung

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Valentin Schmidt

aus Herdecke

Datum der Promotion: 04.03.2022

**Vorwort:**

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht in:

Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms 2021 Nov-Dec;1864(11-12):194764. doi: 10.1016/j.bbagr.2021.194764. Epub 2021 Sep 8. PMID: 34508900.

WT1 regulates HOXB9 gene expression in a bidirectional way.

Schmidt V, Sieckmann T, Kirschner KM, Scholz H.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>V</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>VIII</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>IX</b>
<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>X</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>XI</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Wilms-Tumorprotein WT1.....	1
1.1.1 <i>WT1</i> -Gen, Isoformen und Funktionen .....	1
1.1.2 WT1-Protein als Transkriptionsfaktor mit seinen Zielgenen und Kofaktoren ...	2
1.1.3 WT1 in der Embryonal- und Nierenentwicklung .....	3
1.1.4 WT1 in Tumoren.....	5
1.2 Homöobox ( <i>Hox</i> )-Genfamilie mit Vertreter <i>HoxB9</i> .....	6
1.2.1 Die <i>Hox</i> -Genfamilie .....	6
1.2.2 Regulation und Funktion von <i>HoxB9</i> .....	7
1.2.3 <i>HoxB9</i> in der Embryonalentwicklung.....	8
1.2.4 <i>HoxB9</i> in Tumoren.....	9
1.3 Zielsetzung der Arbeit.....	10
<b>2 Materialien und Methoden .....</b>	<b>12</b>
2.1 Materialien.....	12
2.1.1 Bezugsquellen .....	12
2.1.2 Geräteliste .....	13
2.1.3 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien .....	14
2.1.4 Puffer und Lösungen .....	16
2.1.5 Enzyme .....	18
2.1.6 Kommerzielle Kits.....	19
2.2 Zell- und Organkulturtechniken .....	19

2.2.1 Primäre Organkulturen .....	19
2.2.2 Konservierung und Kultivierung von Zelllinien .....	20
2.2.3 Knockdown durch Behandlung mit einem antisense <i>Vivo</i> -Morpholino bzw. Transfektion mit siRNA.....	21
2.2.4 Transiente Transfektionen.....	23
2.3 Molekularbiologische Techniken .....	23
2.3.1 RNA-Extraktion.....	23
2.3.2 Reverse Transkription .....	24
2.3.3 Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) .....	24
2.3.4 Proteinextraktion.....	27
2.3.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot.....	27
2.3.6 Konventionelle Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	29
2.3.7 Klonierung und Plasmidpräparation.....	30
2.3.8 Reportergenassay .....	32
2.3.9 Rekombinantes WT1-Protein und Elektromobilitäts-Shift-Assay (EMSA).....	33
2.3.10 Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) .....	35
2.3.11 RNA <i>in-situ</i> -Hybridisierung (RNA-ISH) mittels RNAscope® Technologie....	37
2.3.12 CRISPR/Cas 9 Knockout von <i>Wt1</i> in M15-Zellen.....	38
2.3.13 Hemmung der DNA- und Histonmethylierung in Zellen .....	40
2.4 Statistische Auswertung .....	40
<b>3 Ergebnisse .....</b>	<b>41</b>
3.1 Identifizierung potenzieller neuer WT1-Zielgene in der Nierenentwicklung .....	41
3.2 Analyse potenzieller WT1-Zielgene in verschiedenen Zelllinien auf mRNA-Niveau und Promotorebene.....	43
3.3 WT1-abhängige Transkription von <i>HoxB9</i> in verschiedenen Zelllinien.....	46
3.4 WT1 bindet an den <i>HoxB9</i> -Promotor .....	48
3.5 Lokalisation von WT1-Bindungsstellen im <i>HoxB9</i> -Promotor .....	50

3.6 WT1 reguliert den <i>HoxB9</i> -Promotor zelltypspezifisch .....	53
3.7 Die WT1-abhängige Hemmung der <i>HoxB9</i> -Expression erfordert kein EZH2 bzw. die Histonmethylierung H3K27me3 .....	56
3.8 Der WT1-Korepressor BASP1 bindet an den <i>HoxB9</i> -Promotor und beeinflusst die WT1-abhängige <i>HoxB9</i> -Regulation.....	59
3.9 Lokalisation der <i>Wt1</i> - und <i>HoxB9</i> -mRNA in der embryonalen Niere .....	62
<b>4 Diskussion .....</b>	<b>64</b>
4.1 Diskussion der Hauptergebnisse mit Schlussfolgerung.....	64
4.1.1 Identifizierung neuer potenzieller WT1-Zielgene in der Nierenentwicklung ...	64
4.1.2 Bedeutung von <i>HoxB9</i> als neues WT1-Zielgen .....	65
4.1.3 Bedeutung von BASP1 als Kofaktor in der WT1-abhängigen <i>HoxB9</i> -Regulation .....	68
4.1.4 Histonmethylierung/-acetylierung als regulatorische Mechanismen .....	70
4.1.5 Bedeutung der WT1-abhängigen <i>HoxB9</i> -Regulation für die Nieren- und Tumorentwicklung .....	71
4.2 Limitationen und Ausblick dieser Arbeit.....	74
<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>77</b>
<b>Eidesstattliche Versicherung .....</b>	<b>89</b>
<b>Curriculum Vitae.....</b>	<b>91</b>
<b>Publikationsliste .....</b>	<b>92</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>92</b>

## Abkürzungsverzeichnis

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
(v/v)	Volumenprozent
(w/v)	Massenkonzentration
Abb.	Abbildung
ADORA1	adenosine A1 receptor
AG	Arbeitsgruppe
AK	Antikörper
ANGPTL2	angiopoietin-related protein 2
ANOVA	analysis of variance
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AREG	Amphiregulin
AS	Aminosäure
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
BAK	BCL2 antagonist/killer 1
BASP1	brain acid soluble protein 1
BMP	bone morphogenetic proteins
bp	Basenpaar
BRG1	brahma-related gene 1
Cas	CRISPR-associated
CBP	CREB-binding protein
cDNA	complementary-DNA
ChIP	Chromatin-Immunpräzipitation
ChIP-seq	ChIP-Sequenzierung
CITED2	Cbp/p300-interacting transactivator 2
CREB	cAMP response element-binding protein
CRISPR	clustered regularly interspaced short palindromic repeats
C <sub>T</sub>	cycle of threshold
CTCF	CCCTC-binding factor
Cy5	Cyanine 5
DAAM2	disheveled-associated activator of morphogenesis 2
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNMT3A	de novo DNA methyltransferase 3A
DNA	Desoxyribonukleinsäure

dNTP	Nukleosidtriphosphat
E2F1	E2F transcription factor 1
EB	elution buffer
ECI	Elektrochemilumineszenz
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	epidermal growth factor receptor
EGR1	early growth response gene 1
EMSA	Elektromobilitäts-Shift-Assay
EMT	epithelial-mesenchymale Transition
ENCODE	Encyclopedia of DNA Elements
EREG	Epiregulin
EZH2	Enhancer of zeste homolog 2
FACS	fluorescence activated cell sorting
FAT10	leukocyte antigen-F adjacent transcript 10
FD	fast digest
FGF	fibroblast growth factor
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	green fluorescent protein
HDAC1	histone deacetylase 1
HoxB9	Homöobox Protein B9
HRP	horseradish peroxidase/ Meerrettichperoxidase
IL-8	Interleukin 8
IP	Immunpräzipitation
kb	Kilobase
KD	Knockdown
KO	Knockout
LB	lysogeny broth
MET	mesenchymal-epitheliale Transition
min	Minute
miR-192	MicroRNA 192
mRNA	messenger-RNA
MYCN	N-myc proto-oncogene protein
NHEJ	non-homologous end joining
NPHS	Nephrin
NPR3	natriuretic peptide receptor 3
NTRK2	Neurotrophic Receptor Tyrosine Kinase 2
PAR-4	prostate apoptosis response 4
PAX2	paired box 2

PBS	phosphate-buffered saline
PcG	polycomb group proteins
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PIP <sub>2</sub>	phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PODXL	podocalyxin like
Pol	Polymerase
PRC	polycomb repressive complex
qRT-PCR	quantitative Real-Time PCR
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
sgRNA	small-guiding-RNA
siRNA	small-interfering-RNA
SRPK1	SRSF protein kinase 1
TBS	Tris-buffered saline
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TGF $\beta$	transforming growth factor $\beta$
TSS	transcription start-side
U2AF65	U2 snRNP auxiliary factor 65-kDa subunit
UTX	Ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat, X chromosome
VEGF	vascular endothelial growth factor
WB	Western Blot
WNT4	wingless-type MMTV integration site family 4
WNT10B	Wnt family member 10B
WT	Wildtyp
WT1	Wilms-Tumor-Protein 1

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Lineare Darstellung des WT1-Proteins.....	3
Abb. 2: Verschiedene Stadien der Nierenentwicklung.....	5
Abb. 3: Histonmethylierung am Beispiel von <i>HoxB9</i> .....	8
Abb. 4: Nierenorgankulturen.....	22
Abb. 5: Western Blot des rekombinanten WT1-Proteins .....	33
Abb. 6: <i>Vivo</i> -Morpholino induzierter <i>Wt1</i> -Knockdown in Nierenorgankulturen .....	41
Abb. 7: Analyse differenziell exprimierter Gene im NGS-Datensatz .....	42
Abb. 8: Stichprobenartige Validierung der Sequenziererergebnisse mittels qRT-PCR.....	43
Abb. 9: mRNA-Expressionsanalyse der Top-WT1-Kandidatenzielgene in Nierenorgankulturen, M15- und UB27-/ UD28-Zellen.....	44
Abb. 10: Reportergenassays der Top-WT1-Kandidatenzielgene in U2OS-Zellen .....	45
Abb. 11: WT1-abhängige <i>HoxB9</i> -Expression in M15-, 786-0-Zellen und Nierenorgankulturen .....	47
Abb. 12: WT1-abhängige <i>HoxB9</i> -Expression in HEK293-Zellen .....	47
Abb. 13: WT1-abhängige <i>HoxB9</i> -Expression in UB27/UD28-Zellen .....	48
Abb. 14: WT1 bindet an den <i>HoxB9</i> -Promotor im Chromatin der UB27-/UD28- und M15-Zellen.....	50
Abb. 15: WT1-Bindungssequenzen .....	50
Abb. 16: EMSAs verschiedener <i>HoxB9</i> -Promotorsequenzen mit rekombinantem WT1-Protein .....	52
Abb. 17: Reportergenassays mit <i>HoxB9</i> -Konstrukten in U2OS-, M15del. <i>Wt1</i> - und HEK293-Zellen .....	54
Abb. 18: Reportergenassays von <i>HoxB9</i> -Promotorkonstrukten mit Basenpaarmutationen in vermuteten WT1-Bindungsstellen.....	56
Abb. 19: Western Blots zum Nachweis von H3K27me3 in verschiedenen Zelllinien .....	57
Abb. 20: Histonmethylierungsstatus des <i>HoxB9</i> -Promotors in M15- und U2OS-Zellen.....	58
Abb. 21: BASP1-Knockdown und CHIP in M15-, U2OS- und UB27-Zellen .....	60
Abb. 22: Reportergenassay eines <i>HoxB9</i> -Konstruktes mit <i>Basp1</i> -Überexpression in U2OS- und HEK293-Zellen .....	61
Abb. 23: RNA <i>in-situ</i> -Hybridisierung (RNA-ISH) mittels RNAscope® Technologie von <i>Wt1</i> und <i>HoxB9</i> in der embryonalen Niere .....	63

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Bezugsquellen mit Firmensitz.....	12
Tab. 2: Geräteliste mit Bezugsquellen.....	13
Tab. 3: Chemikalien mit Bezugsquellen .....	15
Tab. 4: Verbrauchsmaterialien mit Bezugsquellen .....	16
Tab. 5: Verwendete Lösungen und Puffer mit Zusammensetzung in der Reihenfolge ihrer Nennung im Material- und Methodenteil.....	17
Tab. 6: Enzyme mit Bezugsquellen .....	18
Tab. 7: Kommerzielle Kits mit Bezugsquellen.....	19
Tab. 8: Zelllinien mit Herkunft und Bezugsquellen.....	20
Tab. 9: Expressionsplasmide.....	23
Tab. 10: PCR-Primer in Leserichtung von 5'- zu 3'-Ende.....	25
Tab. 11: Primäre Antikörper für Western Blot.....	28
Tab. 12: Sekundäre Antikörper für Western Blot .....	29
Tab. 13: Primer für die konventionelle PCR in Leserichtung von 5'- zu 3'-Ende.....	30
Tab. 14: Reporterkonstrukte .....	32
Tab. 15: Cy5-gelabelte Oligonukleotide für EMSA in 5'-3'-Leserichtung für <i>HoxB9</i> (A-E) .....	34
Tab. 16: Antikörper für CHIP .....	36
Tab. 17: Chip-Primer in Leserichtung von 5'- zu 3'-Ende .....	37
Tab. 18: RNAscope-Sonden.....	38
Tab. 19: CRISPR/Cas 9 Oligonukleotide für die sgRNA.....	39
Tab. 20: Methylierungsinhibitoren.....	40

## Zusammenfassung

Der Wilms-Tumor-Transkriptionsfaktor WT1 ist essenziell für die Embryonalentwicklung verschiedener Organe, u.a. der Niere, und kann dabei seine Zielgene sowohl aktivieren als auch unterdrücken. Mutationen im *WT1*-Gen können zu gleichnamigen Tumoren der Niere, auch Nephroblastome genannt, führen.

Welche Prozesse im Rahmen der Nierenentwicklung durch WT1 reguliert werden, ist noch nicht vollständig geklärt. Da *Wt1*-Knockout-Mäuse mit einer Nierenagenesie embryonal letal sind, ist eine molekulare WT1-Zielgenanalyse an ihnen nur sehr eingeschränkt möglich. Daher besteht das Ziel dieser Arbeit in der Etablierung eines *In-vitro*-Modells zur Identifizierung und funktionellen Charakterisierung neuer WT1-Zielmoleküle während der Nierenentwicklung. Hierzu wurden Nierenorgankulturen von Mausembryonen *ex vivo* kultiviert und die *Wt1*-Expression durch Inkubation mit einem antisense *Vivo*-Morpholino gehemmt. In einem genomweiten Ansatz wurde das Transkriptom in Nierenorgankulturen mit normaler und reduzierter Expression von *Wt1* mittels Next Generation Sequencing (NGS) bestimmt und analysiert.

Unter Verwendung weiterer zell- und molekularbiologischer Techniken wird das Homöobox-Gen *HoxB9* im Rahmen dieser Arbeit als neues WT1-Zielgen beschrieben. *HoxB9* ist als Mitglied der *Hox*-Genfamilie für die räumlich und zeitlich koordinierte Entwicklung und Ausrichtung der anterior-posterioren Körperlängsachse während der Embryonalentwicklung notwendig und wird stark in verschiedenen Tumorarten exprimiert.

WT1 kann das *HoxB9*-Gen zelltypabhängig stimulieren und inhibieren. Die Hemmung von WT1 in *ex vivo* kultivierten murinen Nierenorgankulturen erhöht die *HoxB9*-Transkripte genauso wie ein siRNA-Knockdown von WT1 in den humanen, vom Nierenzellkarzinom abgeleiteten 786-0-Zellen und den mesonephrischen M15-Zellen der Maus. In Übereinstimmung mit der hemmenden Wirkung von WT1 auf die *HoxB9*-Expression werden beide Transkripte in einem sich nur marginal überlappenden Muster in embryonalen Mausnieren exprimiert. Im Gegensatz dazu erhöht WT1 die Expression von *HoxB9* sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene in humanen, vom Osteosarkom abgeleiteten U2OS-Zellen sowie in humanen embryonalen Nierenzellen (HEK293-Zellen). Die *HoxB9*-Promotoraktivität wird durch WT1 in transfizierten U2OS- und HEK293-Zellen stimuliert, aber in M15-Zellen gehemmt. Mittels Chromatin-Immunpräzipitationen (ChIP) und Elektromobilitäts-Shift-Assays (EMSA) konnte die

Bindung von WT1 an den *HoxB9*-Promotor in U2OS- und M15-Zellen nachgewiesen werden. Ebenso ist BASP1, ein transkriptioneller Korepressor von WT1, mit dem *HoxB9*-Promotor im Chromatin dieser Zelllinien assoziiert. Eine Kotransfektion von U2OS- und HEK293-Zellen mit BASP1 hebt die stimulierende Wirkung von WT1 auf den *HoxB9*-Promotor auf.

Zusammenfassend konnten im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe des genomweiten Ansatzes eine große Anzahl an Genen identifiziert werden, die entweder direkt oder indirekt durch WT1 reguliert werden. Je nach Zelltyp kann WT1 die Transkription von *HoxB9* entweder stimulieren oder unterdrücken, wobei an der hemmenden Wirkung BASP1 beteiligt ist. Die Regulierung der *HoxB9*-Expression durch WT1 könnte sowohl während der Nierenentwicklung als auch der Tumorprogression relevant werden.

## **Abstract**

The Wilms' tumor transcription factor WT1 is essential for the embryonic development of various organs, including the kidney, and can both activate and suppress its target genes. Mutations in the *Wt1* gene can lead to eponymous tumors of the kidney, also called nephroblastomas.

It is not yet fully understood which processes are regulated by WT1 in the context of renal development. Since *Wt1* knockout mice are embryonic lethal with agenesis of the kidney, they are of limited value for WT1 target gene analysis. Therefore, the aim of this work is to establish an *in vitro* model for the identification and functional characterization of new WT1 target molecules during renal development. For this purpose, *Wt1* expression in murine *ex vivo* kidney organ cultures was inhibited by incubation with an antisense *vivo*-morpholino. In a genome-wide approach, the transcriptome of kidney organ cultures with normal and reduced *Wt1* expression was analyzed by Next Generation Sequencing (NGS).

Using further cellular and molecular biological techniques, the homeobox gene *HoxB9* is described as a new WT1 target gene. *HoxB9* is necessary for specification of the anterior-posterior body axis during embryonic development. WT1 can stimulate and inhibit the *HoxB9* gene depending on the cell type. Silencing of *Wt1* in kidney organ cultures increases *HoxB9* mRNA levels as well as in human renal cell adenocarcinoma-derived 786-0 cells and murine mesonephric M15 cells. Consistent with the inhibitory effect of

WT1 on *HoxB9* expression, both transcripts are distributed in a mostly no-overlapping pattern in embryonic mouse kidneys. In contrast, WT1 increases *HoxB9* mRNA and protein levels in human, osteosarcoma derived U2OS cells and in human embryonic kidney cells (HEK293 cells). *HoxB9* promoter activity is stimulated by WT1 in transiently transfected U2OS and HEK293 cells but inhibited in M15 cells. The binding of WT1 to the *HoxB9* promoter in U2OS and M15 cells was demonstrated by chromatin immunoprecipitation (ChIP) and electromobility-shift assays (EMSA). Similarly, BASP1, a transcriptional co-repressor of WT1, is associated with the *HoxB9* promoter in the chromatin of these cell lines. Furthermore, co-transfection of U2OS and HEK293 cells with BASP1 represses the stimulatory effect of WT1 on the *HoxB9* promoter.

In summary, using the genome-wide approach this work identifies a large number of genes that are either directly or indirectly regulated by WT1. Depending on the cell type, WT1 can either stimulate or repress *HoxB9*, and the inhibitory effect involves BASP1. Regulation of *HoxB9* expression by WT1 might become relevant during kidney development and cancer progression.

# 1 Einleitung

## 1.1 Wilms-Tumorprotein WT1

### 1.1.1 *WT1*-Gen, Isoformen und Funktionen

Das Wilms-Tumor-Gen *WT1* kodiert für ein Protein mit vier C-terminalen Zinkfingern, die für die DNA-Bindung und damit für die Funktion als Transkriptionsfaktor notwendig sind (1). *WT1* kann seine Zielgene sowohl aktivieren als auch reprimieren, die 3'-UTRs verschiedener RNAs binden und stabilisieren (2) sowie als postranskriptioneller Regulator agieren (zusammengefasst in (3)). Seinen Namen verdankt es der Tatsache, dass biallelischen Mutationen im *WT1*-Gen Wilms-Tumore, auch Nephroblastome genannt, als Folge einer fehlgeleiteten Nierendifferenzierung verursachen können (4, 5). Neben seiner Funktion als klassischer Tumorsuppressor wirkt *WT1* auch als Onkogen (Kap. 1.1.4) und spielt eine entscheidende Rolle in der embryonalen Entwicklung und bei bestimmten Erkrankungen (3).

Die funktionelle Komplexität lässt sich in Teilen durch die über 24 verschiedenen *WT1*-Proteinvarianten erklären, die durch alternatives Spleißen, RNA-Editing und den Gebrauch unterschiedlicher Transkriptionsstartstellen gebildet werden (3, 6). Das *WT1*-Gen enthält 10 Exons, von denen Exon 5 und 9 alternativ gespleißt werden (4, 6). Durch Inklusion von Exon 5 werden 17 Aminosäuren (17AS) eingefügt, alternatives Spleißen im Bereich von Exon 9 resultiert im Einbau von drei zusätzlichen Aminosäuren - Lysin, Threonin und Serin (KTS) - zwischen dem dritten und vierten Zinkfinger des *WT1*-Proteins (3, 4). *WT1*(-KTS)-Isoformen, die keine KTS-Insertion enthalten, fungieren als Transkriptionsfaktoren (7), während die *WT1*(+KTS)-Variante sowohl DNA als auch RNA binden kann und über ihre transkriptionelle Funktion hinaus vermutlich eine Rolle in posttranskriptionellen Prozessen spielt (8, 9). Die unterschiedliche funktionelle Bedeutung der verschiedenen Isoformen lässt sich u.a. daran erkennen, dass die *WT1*(+KTS)-Variante bei Mäusen für die Festlegung des Geschlechts von Bedeutung ist (10). Darüber hinaus können Mutationen im Intron 9 des *WT1*-Gens zu einem selektiven Verlust der *WT1*(+KTS)-Variante mit resultierendem Frasier-Syndrom führen. Dieses beinhaltet u.a. einen männlichen Pseudo-Hermaphroditismus, d.h. chromosomal und gonadal männliches, bei äußerem weiblichen Geschlecht, und eine fortschreitende Nierenerkrankung, bei der es sich in der Regel um eine fokal segmentale Glomerulosklerose handelt (11). Hinweise auf eine Rolle von *WT1*-Proteinen beim

mRNA-Spleißen ergeben sich aus Beobachtungen, wonach WT1 mit Spleißfaktoren wie U2AF65 interagiert und in das Spliceosom integriert werden kann (12).

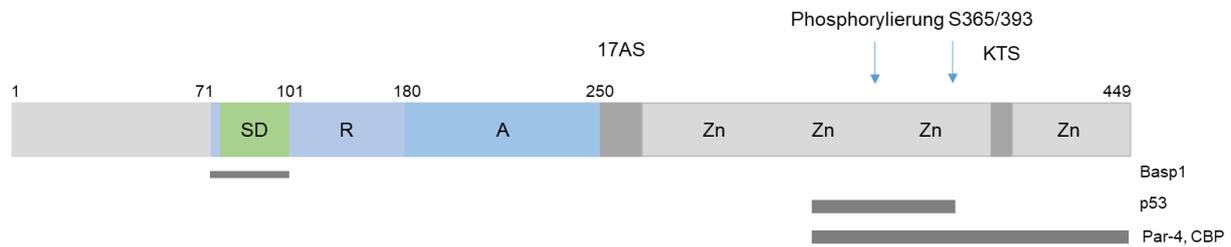
### **1.1.2 WT1-Protein als Transkriptionsfaktor mit seinen Zielgenen und Kofaktoren**

Das Wilms-Tumor-Protein WT1 enthält vier Zinkfinger im C-Terminus, über die es an DNA und RNA bindet (1). Weiterhin ermöglicht eine prolin- und glutaminreiche Region im N-Terminus (die ersten 180 Aminosäuren) die Ausbildung von Homodimeren und ist für die regulatorischen Eigenschaften von WT1 als Transkriptionsfaktor wesentlich (13). Die WT1-Repressions-Domäne konnte auf den Bereich zwischen Aminosäure 71-180, die Aktivierungsdomäne zwischen Aminosäure 180-250 eingegrenzt werden (1, 14) (Abb. 1). Innerhalb der Repressions-Domäne konnte eine 30 Aminosäuren lange Subregion identifiziert werden, die Suppressions-Domäne (AS 71-101) (15).

An letztere bindet u.a. der Kofaktor *BASP1*, der die transkriptionsaktivierenden Eigenschaften von WT1 hemmt (16) (Abb. 1). Die Bedeutung von *BASP1* als Koregulator von WT1 wurde in den letzten Jahren zunehmend erkannt. Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die Überexpression von *BASP1* in K562-Leukämiezellen in einer transkriptionellen Hemmung von über 90% der WT1-Zielgene resultiert (3, 17). Um als transkriptioneller Korepressor wirken zu können, muss *BASP1* an seinem N-Terminus myristoyliert werden (18). Dies erleichtert die sukzessive Bildung eines Repressor-Komplexes bestehend aus  $PIP_2$  und HDAC1 auf der Promotorregion des WT1-Zielgens (18). Über die weitere Rekrutierung von Prohibitin und BRG1 kann ein Chromatin-Remodelling-Komplex entstehen (19), dessen Funktion noch nicht vollständig geklärt ist. Neben *BASP1* existieren einige andere WT1-Kofaktoren wie zum Beispiel *PAR-4* (20) oder *CITED2* (21), die mit dem C-Terminus des WT1-Proteins interagieren (Abb. 1) und abhängig vom zellulären Kontext entweder als Koaktivator oder -repressor wirken können (3). Die Histonacetyltransferase *CBP* bindet in derselben Region wie *PAR-4* an das WT1-Protein, unterstützt aber in der Regel die Aktivierung des Zielgens (22). Ein weiterer Interaktionspartner von WT1 ist *p53* (23) (Abb. 1). Frühere Arbeiten haben gezeigt, dass WT1 durch Wechselwirkung mit Wildtyp *p53* von einem transkriptionellen Aktivator in einen Repressor konvertiert wird (24).

Die Fähigkeit von WT1, neben DNA auch an RNA zu binden, wird wahrscheinlich durch den ersten Zinkfinger vermittelt (12, 25). Durch die Proteinkinase A (PKA) oder C (PKC) können Serinreste im zweiten und dritten Zinkfinger jeweils phosphoryliert werden,

wodurch die Möglichkeit zur DNA-abhängigen, transkriptionellen Repression bei unveränderter RNA-bindender Aktivität gehemmt wird (26) (Abb. 1).



### Abb. 1: Lineare Darstellung des WT1-Proteins

Die Aminosäuren sind nummeriert und eine Auswahl an alternativen Spleißmustern (17AS, KTS) und post-translationalen Modifikationen (Phosphorylierung) sind abgebildet. Die einzelnen Domänen entsprechen der Aktivierungs- (A), Repressions- (R), Suppressions- (SD) und Zinkfinger-Domäne (Zn). Die Bindungsregionen einzelner Kofaktoren wie BASP1, p53, Par-4 oder CBP werden durch graue Balken visualisiert. Abbildung modifiziert nach (3).

Trotz einer Vielzahl bereits bekannter WT1-Zielgene hält die Suche nach neuen, bisher unbekanntem Zielgenen vor allem im Kontext der Embryonalentwicklung und Tumorentstehung an. Über die Regulation seiner Zielgene hat WT1 Einfluss auf wichtige Zellfunktionen wie Wachstum, Differenzierung, Signaltransduktion, Apoptose und epigenetische Ereignisse (zusammengefasst in (3)). WT1 ist essenziell für die Nierenentwicklung (27) und reguliert dabei u.a. die Gene *WNT4* (28) und *PAX2* (29). Die Expression von Genen, welche die Ureterverzweigung während der Nierenentwicklung ermöglichen, z.B. *AREG* (30) und *EREG* (31), wird ebenfalls durch WT1 beeinflusst. Genauso wie die Expression des in der Niere gebildeten Enzyms Renin (32) und von Erythropoetin (33). Darüber hinaus reguliert WT1 die Transkription von Wachstumsfaktoren und ihrer Rezeptoren wie z.B. TGF $\beta$  (34), EGFR (35), Insulinrezeptor (36) und viele mehr. Zudem scheint WT1 in Prozesse der epigenetischen DNA-Methylierung, der in der Embryonalentwicklung ebenfalls eine entscheidende Rolle zukommt, über die Regulierung der DNMT3A (37) eingebunden zu sein.

### 1.1.3 WT1 in der Embryonal- und Nierenentwicklung

Neben seiner Funktion als Tumorsuppressor ist WT1 ein Schlüsselmolekül in der Embryogenese und für die normale Entwicklung u.a. des Urogenitalsystems, sensorischer Neuroepithelien und des hämatopoetischen Systems notwendig (38-40). Darüber hinaus wird WT1 in der Netzhaut (41) sowie im Mesothel exprimiert (42). Im

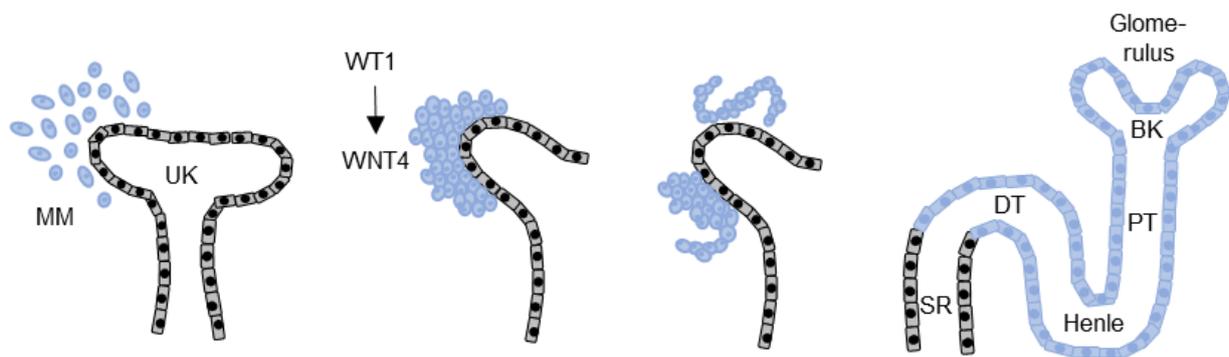
Herzen ist WT1 vor allem im Epikard und in den Koronargefäßen vorhanden (43, 44). *Wt1*-Knockout-Mäuse bilden keine Nieren, Gonaden (42), Milz (45) oder Nebennieren aus (46). In der Regel sterben die Mäuse bis zum Zeitpunkt E13.5, da Ventrikelmyokard, Epikard und Koronargefäße hypoplastisch ausgebildet sind (42).

Die Nieren entwickeln sich aus dem intermediären Mesoderm. Eine entscheidende Rolle spielen hierbei die gegenseitigen induktiven Signale zwischen dem metanephrischen Mesenchym und der Ureterknospe, einem Auswuchs aus dem Wolff-Gang (zusammengefasst in (47)). Nach dem Einwachsen der Ureterknospe verdichtet sich das proliferierende Mesenchym in der unmittelbaren Umgebung von deren Endverzweigungen. Über verschiedene Zwischenstadien, u.a. die komma- und s-förmigen Körperchen, entwickeln sich die Nephrone als Funktionseinheiten der Niere (47, 48) (Abb. 2). Im Verlauf der Nephrogenese wird WT1 zunächst im kondensierenden Mesenchym exprimiert (47). Dort induziert es die Expression von *WNT4*, welches essenziell für die mesenchymale-epitheliale-Transition (MET), d.h. die Umwandlung von Mesenchym in ein Epithelgewebe, und die nachfolgende Nephronbildung ist (48). In der adulten Niere wird WT1 ausschließlich in den glomerulären Podozyten exprimiert, für deren Differenzierung (46) und Integritätserhalt es eine zentrale Rolle spielt (43). Die Podozyten stellen mit ihren Fußfortsätzen und der dazwischen gelegenen Schlitzmembran eine wichtige Komponente der glomerulären Filtrationsbarriere dar (49). WT1 reguliert eine Vielzahl an Podozyten-typischen Genen wie *Nphs* und *Podxl* (50) und leistet dadurch einen wesentlichen Beitrag zur normalen Funktion dieses hochdifferenzierten Zelltyps.

Welche Prozesse im Rahmen der Nierenentwicklung durch WT1 reguliert werden, ist noch nicht vollständig geklärt. In *Wt1*-Knockout-Mäusen unterbleibt das Einwachsen der Ureterknospe in das metanephrische Mesenchym, welches daraufhin in Apoptose geht (42). Weitere Untersuchungen haben ergeben, dass ein Verlust von WT1 innerhalb des metanephrischen Mesenchyms zu einem Mangel an FGF führt und BMP/pSMAD-Signalkaskaden mit frühzeitiger Apoptose induziert (51). In Gain-of-function-Experimenten wurde die WT1-abhängige Stimulation von *VEGF-A* als weiteres induktives Signal für die Nierenentwicklung beschrieben (52).

Organübergreifend scheint WT1 eine wichtige Rolle für den Erhalt eines epithelial-mesenchymalen Gleichgewichts zu spielen. Offenbar kann WT1 zelltypabhängig diese Balance sowohl in Richtung einer epithelialen Differenzierung als auch zur Seite des

undifferenzierten Mesenchyms lenken (38). Für die Nierenentwicklung ist die Eigenschaft von *WT1*, eine MET einzuleiten, entscheidend, wohingegen die Ausbildung von Herzmuskelgefäßen aus dem embryonalen Epikard auf einer epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) beruht (53). Die Förderung eines mesenchymalen Zustands durch *WT1* spielt vermutlich auch in der Genese mancher Tumoren eine Rolle (54).



**Abb. 2: Verschiedene Stadien der Nierenentwicklung**

Im ersten Stadium wächst die Ureterknospe (UK) in das metanephrische Mesenchym (MM), in dem *WT1* exprimiert wird, ein. Im nächsten Stadium kondensiert das Mesenchym um die Knospe und *WT1* leitet die MET durch Steigerung der Expression des Zielgens *Wnt4* ein. Über verschiedene Zwischenstufen, wie den komma- und s-förmigen Körperchen, entsteht letztendlich das Tubulussystem bestehend aus proximalem (PT), distalem Tubulus (DT), Henle Schleife und Sammelrohr (SR) sowie den Nierenkörperchen aus Glomerulus und Bowman'scher Kapsel (BK). In diesem Stadium wird *WT1* vor allem in den Podozyten exprimiert, nicht aber im Tubulussystem. Abbildung modifiziert nach (47, 55).

#### 1.1.4 *WT1* in Tumoren

Postnatal wird *WT1* in den meisten Geweben herunterreguliert. Verschiedene Tumorarten mit epithelialer, mesenchymaler, hämatopoetischer und auch neuronaler Herkunft können allerdings eine hohe *WT1*-Expression aufweisen, obwohl *WT1* in den entsprechenden gesunden Geweben praktisch nicht vorkommt (47). Diese Beobachtungen haben zu der Vermutung geführt, dass *WT1* je nach zellulärem Kontext entweder als Tumorsuppressor oder als Onkogen fungieren kann (56).

Ursprünglich wurde *WT1* als klassischer Tumorsuppressor beschrieben, da bei Mutationen mit Funktionsverlust Wilms-Tumore/ Nephroblastome entstehen können (47). In den letzten Jahren haben jedoch zahlreiche Studien gezeigt, dass *WT1* in vielen malignen Tumoren überexprimiert wird. Dazu zählen neben der akuten myeloischen Leukämie (57), das Prostata- (58), Ovarial- (59), Pankreas- (60), Kolon- (61) und Mammakarzinom (62). Es bleibt allerdings bislang unklar, ob die *WT1*-Überexpression ursächlich für die Tumorentwicklung ist, oder ob es sich lediglich um eine Folge der

malignen Entartung handelt. Genauso sind die molekularen Mechanismen hinter der onkogenen bzw. tumorsupprimierenden Wirkung von WT1 bisher ungeklärt (63).

Eine Reexpression von WT1 in Tumoren ist häufig mit einer schlechten Prognose vergesellschaftet. Die weit-verbreitete Tumorexpression hat dazu geführt, dass WT1 zum Ziel-Epitop von Immuntherapien im Rahmen der Krebsbehandlung geworden ist (64). Ein Beispiel hierfür ist die Entwicklung von WT1-Peptid-Impfstoffen für die Therapie der akuten myeloischen Leukämie (65).

## **1.2 Homöobox (*Hox*)-Genfamilie mit Vertreter *HoxB9***

### **1.2.1 Die *Hox*-Genfamilie**

Die *Hox*-Gene sind evolutionär hoch konserviert, bestehen aus zwei Exons mit einem Intron und kodieren für Proteine, die im Zellkern als Transkriptionsfaktoren wirken (66). Die murine und humane *Hox*-Genfamilie umfasst jeweils 39 Mitglieder und ist in vier Clustern gruppiert, die als *Hox A-D* bezeichnet werden (67). Jedes Cluster ist auf einem anderen Chromosom lokalisiert (68) und enthält neun bis elf Mitglieder (69). Die namensgebende Homöobox kodiert für eine Homöodomäne, die für die Erkennung und Bindung der sequenz-spezifischen Konsensusmotive der Zielgene verantwortlich ist (70). Basierend auf chromosomaler Lokalisation und Sequenzähnlichkeit können die Mitglieder in weitere 13 Untergruppen kategorisiert werden (71).

Reguliert werden die *Hox*-Proteine über FGFs (72), BMPs (73) und PcG (74). Sie können ihre Zielgene sowohl aktivieren als auch reprimieren (75). Die Homöoproteine sind essenziell für die embryonale Entwicklung (76), nicht zuletzt auf Grund ihres Einflusses auf wichtige biologische Abläufe wie z.B. Wachstum und Differenzierung (77), Proliferation (78) und Zell-Zell-Interaktion (79).

Während der Entwicklung werden die *Hox*-Gene ab der Gastrulation exprimiert und kontrollieren die Entstehung der anterior-posterioren (a-p) Körperlängsachse vom Kiemenbogen bis nach kaudal (80). Die räumliche und zeitliche Expression der *Hox*-Gene im sich entwickelnden Embryo korreliert eng mit der chromosomalen DNA-Lokalisation bzw. der Einordnung im *Hox*-Cluster (81). Die 3' gelegenen *Hox*-Gene werden früher und anterior, die 5' gelegenen hingegen später und in posterioren Regionen des Embryos exprimiert (81). Diese Kollinearität führt dazu, dass die 3' gelegenen *Hox*-Gene der Gruppe 1-4 Teile der Hirnentstehung kontrollieren, die Gruppe 5-8 die thorakale Entwicklung und die 5' gelegenen Gene der Gruppen 9-13 die

lumbosakralen Regionen (82). Neben der hämatopoetischen Differenzierung, die eine koordinierte *Hox*-Genexpression erfordert (77), weisen adulte Organe wie beispielsweise die Niere ebenfalls ein charakteristisches *Hox*-Genexpressionsmuster auf (82). Vorherige Untersuchungen haben ergeben, dass einige *Hox*-Gene funktionell verknüpft sind und dass ein Ausfall eines Gens durch ein anderes kompensiert werden kann (83).

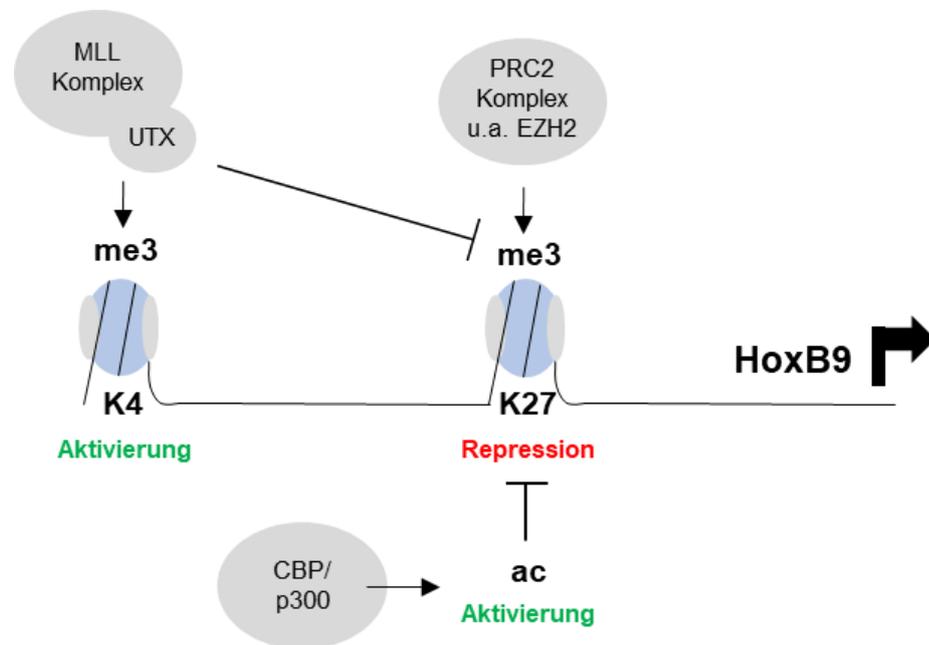
### 1.2.2 Regulation und Funktion von HoxB9

Das Homöobox-Gen 9 (*HoxB9*) gehört zur *Hox*-Genfamilie und kodiert für ein Protein mit einer Molekularmasse von etwa 28 kDa, welches eine Homöobox-DNA-bindende Domäne enthält und als Transkriptionsfaktor fungiert. Zu den beschriebenen Zielgenen von *HoxB9* gehört Renin, eine Aspartyl-Protease, die bei der Blutdruckregulierung mitwirkt (84), Wachstumsfaktoren wie bFGF und TGF sowie das proangiogene Molekül VEGF (85). Ähnlich wie WT1 spielt *HoxB9* eine entscheidende Rolle sowohl in der embryonalen Entwicklung als auch in der Pathogenese bestimmter Erkrankungen.

Wie *HoxB9* im Rahmen der embryonalen Entwicklung reguliert wird, ist bisher nicht vollständig verstanden. Die embryonale Entwicklung erfordert eine zeitlich und räumlich koordinierte Expression der *Hox*-Genfamilie. Die sequenzielle Aktivierung von *Hox*-Genen ist dabei genauso essenziell wie die zellspezifische Repression im Verlauf der Entwicklung. Zu den Faktoren, die zum *Hox*-Silencing beitragen, gehört der Polycomb-Repressionskomplex (PRC), der die Genexpression durch epigenetische Modifikationen steuert (86). Die Polycomb-Gruppe (PcG) von Genen wurde ursprünglich aufgrund ihrer Funktion, *Hox*-Gene während der Entwicklung in *Drosophila melanogaster* stabil zu reprimieren, entdeckt (87). PcG-Proteine können in zwei große Komplexklassen unterteilt werden. Der PRC1-Komplex beinhaltet u.a. *Ring1* (88). Der PRC2-Komplex, der u.a. aus *Eed*, *Suz12* sowie anderen katalytischen Untereinheiten wie *Ezh1* und *Ezh2* besteht, trimethyliert das Histon H3 bei Lysin<sup>27</sup> (H3K27me3) aufgrund der Aktivität der letztgenannten Histonmethyltransferasen (89-91) (Abb. 3). *HoxB9*, als Mitglied der *Hox*-Genfamilie, ist als Zielgen beider Komplexe in der Literatur beschrieben (92-94). Die Überexpression von *Ring1B* im sich entwickelnden Neuralrohr führte zur Repression von *HoxB9* im Huhn (92, 93). Darüber hinaus wurde *HoxB9* als Zielgen von EZH2 in *MYCN*-amplifizierten Neuroblastomzellen identifiziert (94).

PRC2 ist wahrscheinlich der einzige Methyltransferase-Komplex, der die Histonmethylierung H3K27me3 katalysieren kann, um Gene zu reprimieren (95, 96)

(Abb. 3). Antagonistisch wirken u.a. Lysin-Demethylasen wie UTX, die H3K27me3 entfernen (97) (Abb. 3). Methylierungen von H3K4 sowie eine Acetylierung von H3K27 stellen Histonmarkierungen dar, die im Zusammenhang mit einer Transkriptionsaktivierung stehen (98, 99) (Abb. 3).



**Abb. 3: Histonmethylierung am Beispiel von *HoxB9***

Eine Trimethylierung von H3K4 sowie eine Acetylierung von H3K27, die beispielsweise durch MLL-Komplexe oder CBP/p300 Acetyltransferasen etabliert werden können, stehen im Zusammenhang mit einer Transkriptionsaktivierung. Im Gegensatz dazu führt eine Trimethylierung von H3K27 zu einer Genrepression. PRC2 ist der einzige Methyltransferase-Komplex, der H3K27me3 katalysieren kann. Lysin-Demethylasen wie UTX, die mit dem MLL-Komplex physikalisch interagieren, entfernen wiederum H3K27me3. H3K4me3 oder H3K27ac hemmen darüber hinaus die Aktivität von PRC2 und stören die H3K27me3-Installation. Abbildung modifiziert nach (100).

### 1.2.3 *HoxB9* in der Embryonalentwicklung

Während der Embryogenese ist die sequenzielle *Hox*-Genexpression entscheidend für die räumlich und zeitlich koordinierte Gliedmaßen- und Organentwicklung entlang der anterior-posterioren Körperachse (101). Im sich entwickelnden Mausembryo wird *HoxB9* hauptsächlich im Rückenmark, im Darm, in den Nieren und in den Gonaden exprimiert (102, 103). Darüber hinaus ist *HoxB9* für die Formierung der thorakalen Skelettelemente von wesentlicher Bedeutung und reguliert die Brustdrüsenbildung während der Schwangerschaft (104, 105). Eine Beteiligung im Rahmen der Differenzierung von Blutzellen wurde ebenfalls beobachtet (106).

#### 1.2.4 HoxB9 in Tumoren

Neben der embryonalen Entwicklung spielt HoxB9 ebenfalls eine große Rolle in Tumoren. In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass eine abnormale Expression von *HoxB9* zur Tumorentstehung beitragen kann (zusammengefasst in (107)). Eine Überexpression korreliert häufig mit einem hohen Tumorstadium, einer Metastasierung, einem schlechten Ansprechen auf bestimmte Therapieformen, einer schlechten Prognose und einem verkürzten Gesamtüberleben (108-110).

Wie *HoxB9* die Tumorprogression fördert, ist nicht vollständig verstanden. Jüngste Ergebnisse deuten darauf hin, dass HoxB9 die Transkription des Zellzyklusregulators E2F3 stimuliert und die Migration von Endometrium-Krebszellen verbessert (111). Beim Mammakarzinom wurde HoxB9 als Zielgen des Zellzyklusregulators E2F1 beschrieben (112) und stimuliert die Expression von VEGF-A, bFGF, IL-8 und ANGPTL2 (113). Durch die Induktion von angiogenen Faktoren erhöht HoxB9 die Zellmotilität, Invasivität und Angiogenese (85). Über die Regulation von TGF- $\beta$  hat HoxB9 ebenfalls Einfluss auf den Prozess der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) und vermittelt eine Resistenz gegenüber Radiotherapie (108). Zudem konnte am Beispiel des Bronchialkarzinoms gezeigt werden, dass HoxB9 über die Aktivierung des WNT/TCF-Signalwegs die Metastasierung fördert (114). Beim kolorektalen Karzinom korreliert eine *HoxB9*-Überexpression mit einer schlechten Prognose und moduliert das Ansprechen auf eine anti-angiogene Therapieform (109, 110). Weitere Tumorarten, in denen HoxB9, z.B. über eine Aktivierung des TGF- $\beta$ /Smad2/Slug Signalwegs, den epithelial-mesenchymalen Übergang stimuliert, sind das hepatozelluläre (115), das orale Plattenepithel- (116), das Pankreas- (117) und das Prostatakarzinom (118). Interessanterweise wurde beim Magenkarzinom der gegenteilige Prozess, d.h. eine mesenchymal-epitheliale Transition (MET), unter HoxB9-Einfluss beschrieben (119). Da HoxB9 eine wichtige Rolle in der Regulierung der physiologischen, aber auch pathologischen Neovaskularisation zu spielen scheint, wurde es als wichtiges therapeutisches Ziel identifiziert, um die Tumorresistenz gegenüber anti-angiogenen Therapieformen zu überwinden (107).

Zuletzt haben einige Studien gezeigt, dass posttranslationale Modifikationen wie z.B. eine Acetylierung am Lysinrest (K27) von HoxB9 die tumorfördernden Eigenschaften aufheben und sogar umkehren können. Die acetylierte HoxB9-Variante geht einher mit reduzierter Zellmigration, einem geringeren Tumorwachstum sowie einer besseren Prognose beim Adenokarzinom der Lunge (120). Ähnliche Beobachtungen wurden beim

kolorektalen und Pankreaskarzinom gemacht (117, 121). Als mögliche Erklärung für dieses Phänomen dient die Beobachtung, dass die acetylierte Form im Zytoplasma lokalisiert wurde und daher nicht mehr als Transkriptionsfaktor aktiv zu sein scheint (121).

### 1.3 Zielsetzung der Arbeit

Mit dieser Arbeit sind zwei übergeordnete Zielsetzungen verbunden:

1. Es soll ein *In-vitro*-Modell etabliert werden, das die Identifizierung und funktionelle Charakterisierung neuer WT1-Zielmoleküle während der Nierenentwicklung ermöglicht. Da Mäuse mit homozygotem *WT1*-Gendefekt embryonal letal sind und keine Nierenanlagen ausbilden (42), sind sie für die geplanten Untersuchungen ungeeignet. Hinzu kommt, dass ein frühzeitiger Verlust von WT1 vor Beginn der mesenchymal-epithelialen Transition (MET) das Transkriptom in einer Weise verändert, dass es demjenigen von Wilms-Tumoren des Menschen ähnelt (122). Mit Nierenorgankulturen von Mausembryonen wurde deshalb ein alternativer methodischer Ansatz etabliert. Dazu wurden jeweils beide Nieren eines Embryos entnommen und paarweise *ex vivo* kultiviert. Die Expression von WT1 wurde durch Inkubation mit einem antisense *Vivo*-Morpholino in der einen Niere gehemmt, während jeweils die zweite Niere desselben Embryos zur Kontrolle mit einem mismatch *Vivo*-Morpholino behandelt wurde. Mit diesem paarweisen Protokoll sollte die Streuung der zu erwartenden Versuchsergebnisse aufgrund unterschiedlicher zeitlicher Entwicklungsverläufe reduziert werden. Anschließend wurde das Transkriptom in Nierenorgankulturen mit normaler und reduzierter Expression von WT1 mittels Next Generation Sequencing (NGS) bestimmt und analysiert. Einzelne Kandidatengene wurden durch qRT-PCR und Promotor-Reporterassays validiert.
2. Mit Hilfe von Nierenorgankulturen konnte u.a. *HoxB9* als ein neues potenzielles WT1-Zielgen ermittelt werden. Unter Verwendung zell- und molekularbiologischer Techniken sollte die Regulation von *HoxB9* durch WT1 näher untersucht und die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen entschlüsselt werden.

Dieser Ansatz kann dazu dienen, neue WT1-abhängige Netzwerke während der Nierenentwicklung zu identifizieren. Vor dem Hintergrund der Bedeutung von WT1 in Tumoren (s.o.) lassen sich damit möglicherweise auch neue Erkenntnisse zur Rolle von WT1 bei malignen Erkrankungen gewinnen.

## 2 Materialien und Methoden

### Allgemeine Bemerkungen:

Alle durchgeführten gentechnischen Arbeiten erfolgten im Labor der Arbeitsgruppe (AG) Scholz am Institut für Vegetative Physiologie der Charité-Universitätsmedizin Berlin unter Einhaltung der biologischen Sicherheitsstufe S1.

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Bezugsquellen

Dargestellt sind die Bezugsquellen aller verwendeten Geräte, Substanzen oder Chemikalien jeglicher Form. Daher wurde in den folgenden Abschnitten der Arbeit bei Erwähnung eines Firmennamens auf den jeweiligen Firmensitz verzichtet.

Tab. 1: Bezugsquellen mit Firmensitz

<b>Firma</b>	<b>Firmensitz</b>	<b>Land</b>	<b>Firma</b>	<b>Firmensitz</b>	<b>Land</b>
Abcam	Cambridge	Vereinigtes Königreich	Invitrogen	Carlsbad	USA
Addgene	Watertown	USA	Jackson Immuno	Hamburg	Deutschland
Advanced Cell Diagnostics	Newark	USA	Labnet International	Edison	USA
Advansta	Menlo Park	USA	LAUDA- Brinkmann	Delran	USA
Amsbio	Abingdon	Vereinigtes Königreich	Life Technologies	Carlsbad	USA
Applied Biosystems	Bedford	USA	Merck Millipore	Burlington	USA
Beckman- Coulter	Brea	USA	Nikon	Minato	Japan
Binder	Tuttlingen	Deutschland	PAA Laboratories	Cölbe	Deutschland
Bioline	London	Vereinigtes Königreich	PJK	Kleinblit- tersdorf	Deutschland
Biometra	Göttingen	Deutschland	Promega	Fitchburg	USA
Bio-Rad	Hercules	USA	Qiagen	Hilden	Deutschland
Biosan	Riga	Lettland	Qualitron	Karachi	Pakistan
Biozol	Houston	USA	Roche	Basel	Schweiz
Biozym	Hessisch Oldendorf	Deutschland	Santa Cruz Biotechnology	Dallas	USA
Calbiochem	San Diego	USA	Sarstedt AG	Nümbrecht	Deutschland

Carl Roth	Karlsruhe	Deutschland	Sartorius	Göttingen	Deutschland
Carl Zeiss	Oberkochen	Deutschland	Scientific Industries	New York	USA
Cayman Chemical	Ann-Arbor	USA	SERVA	Heidelberg	Deutschland
Corning Life Sciences	Corning	USA	Severin	Sundern	Deutschland
Dharmacon	Lafayette	USA	Sigma Aldrich	St. Louis	USA
Diagenode	Liege	Belgien	SPOT Imaging	Burroughs	USA
Eppendorf AG	Hamburg	Deutschland	Taylor-Wharton	Baytown	USA
GeneTools	Philomath	USA	Thermo Fisher Scientific	Waltham	USA
Greiner BioOne	Kremsmünster	Österreich	Th. Geyer/ChemSolute	Renningen	Deutschland
Heidolph Intruments	Schwabach	Deutschland	Titertek-Berthold	Pforzheim	Deutschland
Heraeus	Hanau	Deutschland	TPP	Trasadingen	Schweiz
Hettich	Tuttlingen	Deutschland	Vector Laboratories	Burlingame	USA
Intas Science Imaging	Göttingen	Deutschland			

## 2.1.2 Geräteliste

Tab. 2: Geräteliste mit Bezugsquellen

<b>Gerät</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Blautisch	Blue light transilluminator	Thermo Fisher Scientific
Durchlichtmikroskop	Axiovert 35 Phase Contrast Microscope	Carl Zeiss
Durchlichtmikroskop Kamera	SPOT RT SE Monochrome CCD Scientific Digital Camera System for Microscopy	SPOT Imaging
Elektrophorese Netzteil	Bio-Rad PowerPac 3000	Bio-Rad
Feinwaage	Analytical AC 120S MC-1	Sartorius
Flüssigstickstofftank	Taylor-Wharton LS3000 LN2 capacity 81L	Taylor-Wharton
Fluoreszenzmikroskop	Eclipse Ti2	Nikon
Fluoreszenzmikroskop Kamera	DS-Ri2	Nikon
Folienschweißgerät	FS 3602 Folio	Severin
Hybridisierungssofen	HybEZ™ II Oven	Advanced Cell Diagnostics

Imager für Western Blot und Gelelektrophorese	ECL Chemostar Imager	Intas Science Imaging Instruments
Luminometer	FB 12 Single Tube Luminometer	Titertek-Berthold
Magnetrührer	Magnetrührer MR 3001 K	Heidolph Instruments
Minirotator	Multi Bio RS-24	Biosan
Quantitative RT-PCR	StepOnePlus Real-Time PCR Systems	Applied Biosystems
Quantitative RT-PCR	CFX96 Real-Time System, C1000 Touch Thermal Cycler	Bio-Rad
Schüttelinkubator	311DS 71L Shaking Incubator	Labnet International
Semidry Blotting Apparatur	Trans-Blot® SD semi-dry transfer cell	Bio-Rad
Spektrophotometer	NanoDrop™ 2000/2000c Spektralphotometer	Thermo Fisher Scientific
Taumelschüttler	Taumelschüttler WT12	Biometra
Thermoblock	BioTron UNO II Thermoblock	Biometra
Thermocycler	T100 Thermal Cycler	Bio-Rad
Thermomixer	ThermoMixer® F1.5	Eppendorf AG
Ultraschallbehandlung	Bioruptor® Plus sonication device	Diagenode
Ultraschallbehandlung Sonotrode	Fisherbrand™ Model 120 Sonic Dismembrator	Thermo Fisher Scientific
Vortexer	SI™ Vortex-Genie™ 2	Scientific Industries
Wasserbad	Lauda EcoLine 003 E100	LAUDA-Brinkmann
Zellkulturinkubator	CO <sub>2</sub> Butschrank CB 160	Binder
Zellkultur Werkbank	HERAsafe® HS Sicherheitswerkbank der Klasse II	Heraeus
Zentrifuge (Labor)	Laborzentrifuge Universal 30RF Modell 1402	Hettich
Zentrifuge (Labor)	Laborzentrifuge Universal 30F Modell 1400	Hettich
Zentrifuge (Tisch)	Mikrozentrifuge 5415R	Eppendorf AG
Zentrifuge (Tisch)	Minizentrifuge DW-41	Qualitron
Zentrifuge (Tisch)	Minizentrifuge ROTILABO®	Carl Roth

### 2.1.3 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Alle Chemikalien wurden in der höchsten Reinheitsstufe verwendet.

Tab. 3: Chemikalien mit Bezugsquellen

<b>Bezeichnung</b>	<b>Bezugsquelle</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Acrylamid/ Bisacrylamid	Carl Roth	Lithiumchlorid (LiCl)	Merck Millipore
Agarose Protein A, G	Santa Cruz	Magermilchpulver	Carl Roth
APS	Carl Roth	Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Sigma-Aldrich
Ampicillin	Carl Roth	Magnesiumsulfat (MgSO <sub>4</sub> )	Merck Millipore
ATP	Thermo Fisher Scientific, PJK	Mercaptoetethanol	Carl Roth
Borsäure	Merck Millipore	Methanol	Thermo Fisher
BSA	SERVA	Mini Complete	Merck Millipore
Calf Thymus DNA	Sigma-Aldrich	Natriumacetat (NaAc)	Carl Roth
Chloroform	Sigma-Aldrich	Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )	Sigma-Aldrich
Coelenterazin	PJK	Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth
Coenzym A	PJK	Natriumdesoxy- cholsäure	Sigma-Aldrich
Dharmafect Transfektionsreagenz	Dharmacon	Natriumdihydrogen- phosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Carl Roth
DEPC	Sigma-Aldrich	NatriumEDTA (Na <sub>2</sub> EDTA)	Carl Roth
DMSO	Santa Cruz	Natriumhydrogen- carbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	Merck Millipore
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, PJK	Natriumhydroxid (NaOH)	Merck Millipore
D-Luciferin	PJK	Nonidet P-40 (NP-40)	Roche
DNA Gel Loading Dye	Thermo Fisher	Oligo(dT)	Thermo Fisher
dNTP 10mM	Bioline	Orange G	Carl Roth
Ethanol	Th. Geyer	Phenol/Chloroform/ Isoamylalkohol (25:24:1)	Carl Roth
Ethylendiamintetra- acetat (EDTA)	Carl Roth	Phenylmethylsulfonyl- fluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich
FKS	Sigma-Aldrich	Phosphate-buffered saline (PBS)	Thermo Fischer
Formaldehyd (16%)	Thermo Fisher	Precision Protein™ StrepTactin-HRP Conjugate	Bio-Rad
FuGENE6 Transfektionsreagenz	Roche	Reinstwasser	Sigma-Aldrich
G418	Calbiochem	RNA-Bee	Amsbio
Glukose	Sigma-Aldrich	Rotiphorese Gel 30	Carl Roth
Glutathion-Agarose	Sigma Aldrich	Saccharose	Carl Roth
Glycerin	Th. Geyer	SYBR Green	Life Technologies

Glycin	Carl Roth	SYBR Safe	Life Technologies
Glykogen	Thermo Fisher	Tetramethylethylen-diamin (TEMED)	Carl Roth
Harnstoff	Sigma-Aldrich	Tetrazyklin	PAA Laboratories
Hefeextrakt	Carl Roth	Tricin	Sigma-Aldrich
HEPES	Carl Roth	Tris Base	Sigma-Aldrich
Isopropanol	Merck Millipore	Tris HCl	Carl Roth
Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Carl Roth	Triton X-100	Carl Roth
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth	Trypanblau	Sigma-Aldrich
Kaliumdihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	Merck Millipore	Trypsin	Merck Millipore
Kaliumhydroxid (KOH)	Merck Millipore	Trypton	Carl Roth
LB-Agar	Carl Roth	Tween 20	SERVA
LB-Medium	Carl Roth	Xylencyanol	Carl Roth
L-Glutathion reduziert	Sigma-Aldrich	$\epsilon$ -Aminocapronsäure	Carl Roth

Tab. 4: Verbrauchsmaterialien mit Bezugsquellen

<b>Verbrauchsmaterial</b>	<b>Bezugsquelle</b>
6-, 12- und 24-Well-Zellkulturplatten	TPP
96-Well-PCR-Platten farblos (Unskirted und Sub Skirt)	Biozym
Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Blotting-Membran	Carl Roth
Deckgläser	Carl Roth
Filterpapier	Carl Roth
Kryoröhrchen	Greiner BioOne
Magnetic beads Magna ChIP Protein A + G	Merck Millipore
Minisäulen	Qiagen
Objektträger	Carl Roth
Pipettenspitzen	Sarstedt, Carl Roth
Serologische Pipetten Dispenser	TPP
Tubes (1,5 ml und 2,0 ml)	Eppendorf
Tubes TPX (1.5 ml Bioruptor <sup>®</sup> Plus)	Diagenode
Zellkulturschalen (96 x 21 mm und 146 x 21 mm)	TPP
Zellschaber	TPP
Zentrifugenröhrchen (15 ml und 50 ml)	TPP

### 2.1.4 Puffer und Lösungen

Alle Puffer und Lösungen wurden entweder mit doppelt destilliertem Reinstwasser (ddH<sub>2</sub>O) oder Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandeltem Wasser angesetzt.

Tab. 5: Verwendete Lösungen und Puffer mit Zusammensetzung in der Reihenfolge ihrer Nennung im Material- und Methodenteil

<b>Methode/ Name</b>	<b>Zusammensetzung</b>
<i>Primäre Organkulturen</i>	
1 x PBS	10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 2 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; pH 7,4
<i>Kryokonservierung Zellen</i>	
Gefriermedium	70% (v/v) Kulturmedium; 20% (v/v) FKS; 10% (v/v) DMSO
<i>Zellkultur Transfektion</i>	
DEPC-H <sub>2</sub> O	0,1% (v/v) DEPC; dd-H <sub>2</sub> O; bei 37°C für eine Stunde inkubieren und danach 45 min lang autoklavieren
5 x siRNA Puffer	0,72% (w/v) HEPES; 2,24% (v/v) KCl; 0,02% (w/v) MgCl; DEPC-H <sub>2</sub> O ad 30 ml; 2 M KOH bis pH 7,3-7,6; DEPC-H <sub>2</sub> O ad 100 ml
<i>Agarose-Gelelektrophorese</i>	
1 x DNA-Ladepuffer	0,15% Orange G; 10 mM Tris-HCl (pH 7,6); 0,03% Xylencyanol; 60% Glycerin; 60 mM EDTA
1 x TBE-Puffer	89 mM Tris-Base (pH 8,0); 89 mM Borsäure; 2 mM Na <sub>2</sub> EDTA
<i>Proteinextraktion</i>	
SDS-Probenpuffer/ Laemmli-Puffer	50 mM Tris-HCl (pH 6,8); 4 M Harnstoff; 1% (w/v) SDS; 7,5 mM DTT
<i>SDS-Page, Western Blot</i>	
Trenngelpuffer	0,4% (w/v) SDS (pH 8,8); 1,5 M Tris-HCl
Sammelgelpuffer	0,8% (w/v) SDS (pH 6,8); 1 M Tris-HCl
Trenngel	10% (v/v) Acrylamid/ Bisacrylamid; 25% (v/v) Trenngelpuffer; 40% (v/v) ddH <sub>2</sub> O; 0,5% (v/v) APS; 0,05% (v/v) TEMED
Sammelgelgemisch	11% (v/v) Acrylamid/ Bisacrylamid; 12,5% (v/v) Sammelgelpuffer; ddH <sub>2</sub> O ad 50 ml
Sammelgel	2 ml Sammelgelgemisch; 2 µl TEMED; 20 µl APS
10 x SDS-Laufpuffer	0,25 M Tris-Base; 1,92 M Glycin; 1% (v/v) SDS; ddH <sub>2</sub> O ad 2000 ml
Blottingpuffer	10 mM ε-Aminocaprionsäure; 10% (v/v) Methanol; ddH <sub>2</sub> O ad 2000 ml
TBST-Puffer	20 mM Tris-Base; 137 mM NaCl; 0,05% Tween 20 (pH 7,6)
<i>Klonierung</i>	
LB-Medium	1% (w/v) NaCl; 0,1% (v/v) 1 M NaOH (pH 7,0); 1% (w/v) Trypton; 0,05% (w/v) Hefeextrakt; ddH <sub>2</sub> O ad 1000 ml
Ampicillin-Agarplatten	LB-Medium; 15 g/l Agarose; 100 µg/ml Ampicillin
Gefriermedium für Bakterien	0,1 M MgSO <sub>4</sub> ; 65% (v/v) Glycerin; 25 mM Tris-HCl (pH 8,0)

Super Optimal Broth - Medium (SOB)	1% (v/v) KCl; 2% (w/v) Trypton; 0,5% (w/v) Hefeextrakt; 0,05% (w/v) NaCl; ddH <sub>2</sub> O ad 990 ml; 10 ml MgCl <sub>2</sub>
Super Optimal Broth + Glukose-Medium (SOC)	2% (w/v) sterilfiltrierte Glukose (1 M); SOB-Medium ad 1000 ml
<i>Reportergenassay</i>	
Firefly-Puffer	0,47 mM D-Luciferin; 0,27 mM Coenzym A; 33,3 mM DTT; 0,53 mM ATP; 2,67 mM MgSO <sub>4</sub> ; 20 mM Tricin; 0,1 mM Na <sub>2</sub> EDTA (pH 7,8)
Renilla-Puffer	1,1 M NaCl; 0,22 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 5,1); 2,2 mM Na <sub>2</sub> EDTA; 1,3 mM NaN <sub>3</sub> ; 0,44 mg/ml BSA
<i>rekombinantes Protein, EMSA</i>	
Glutathionreduktionslösung	30% (w/v) L-Glutathion reduziert; 50 mM Tris-Base (pH 9,0)
Tris-Glycin-EDTA-Puffer	25 mM Tris-Base; 192 mM Glycin; 1 mM EDTA; ddH <sub>2</sub> O ad 1000 ml (pH 8,3)
Polyacrylamidgel 6%	20% Acrylamid/ Bisacrylamid (30%); 10% Tris-Glycin-EDTA-Puffer; 69% ddH <sub>2</sub> O; 0,75% APS; 0,05% TEMED
5 x EMSA-Bindepuffer	250 mM KCl; 50 mM Tris-HCl (pH 7,5); 250 mM NaCl; 5 mM MgCl <sub>2</sub> ; 25 mM DTT; 25 mM PMSF
<i>ChIP</i>	
ChIP-Lysepuffer (hypoton)	0,25 M Saccharose; 3 mM β-Mercaptoethanol; 20 mM HEPES; 3 mM MgCl <sub>2</sub> ; 0,2% (w/w) NP-40
SDS-Lysepuffer	1% (v/v) SDS; 10 mM EDTA; 50 mM Tris-HCl (pH 8,1)
IP-/Dilutionspuffer	0,01% (v/v) SDS; 167 mM NaCl; 1,1% Triton X-100; 1,2 mM EDTA; 16,7 mM Tris-HCl (pH 8,1)
Waschpuffer: Niedriger Salzanteil	0,1% (v/v) SDS; 150 mM NaCl; 1% Triton X-100; 2 mM EDTA; 20 mM Tris-HCl (pH 8,1)
Waschpuffer: Hoher Salzanteil	0,1% (v/v) SDS; 500 mM NaCl; 1% Triton X-100; 2 mM EDTA; 20 mM Tris-HCl (pH 8,1)
LiCl-Waschpuffer	0,25 M LiCl; 1% NP-40; 1 mM EDTA; 1% Natriumdesoxycholsäure; 10 mM Tris-HCl (pH 8,1)
TE Puffer	1 mM EDTA; 10 mM Tris-HCl (pH 8,0)
Elutionspuffer	0,1 M NaHCO <sub>3</sub> ; 1% (v/v) SDS

## 2.1.5 Enzyme

Tab. 6: Enzyme mit Bezugsquellen

Enzym	Bezugsquelle
Proteinase K	Qiagen
Restriktionsenzyme FastDigest	Thermo Fisher Scientific
Reverse Transkriptase SuperScript III	Thermo Fisher Scientific
RNase A	Roche
T4 DNA Ligase	Promega

## 2.1.6 Kommerzielle Kits

Tab. 7: Kommerzielle Kits mit Bezugsquellen

<b>Kit</b>	<b>Bezugsquelle</b>
PureYield™ Plasmid Miniprep Systems	Promega
Expand Long Template PCR System	Roche
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
RNeasy Micro and Mini Kit	Qiagen
WesternBright ECL HRP substrate	Advansta
RNAscope Multiplex Fluorescent Reagent Kit v2 Assay	Advanced Cell Diagnostics
DIG Oligonucleotide 3'-End Labeling Kits (2 <sup>nd</sup> Generation)	Roche

## 2.2 Zell- und Organkulturtechniken

### 2.2.1 Primäre Organkulturen

Die zur Etablierung der Organkulturen notwendigen Tiertötungen wurden im Vorhinein dem Landesamt für Gesundheit und Soziales (LAGeSo) Berlin angezeigt und durch die Behörde bestätigt (Registriernummer T0308/12). Der Umgang mit den Tieren erfolgte entsprechend der Richtlinien zur Versuchstierhaltung der Charité-Universitätsmedizin Berlin.

Primäre Organkulturen zeichnet aus, dass Organe für eine bestimmte Zeit *ex vivo* kultiviert werden. Dies ermöglicht Untersuchungen der Organentwicklung unter kontrollierten *in vitro* Bedingungen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden mit freundlicher Unterstützung von Frau Dr. Karin Kirschner Mausembryonen von terminiert verpaarten C57BL/6J-Mäusen zum Entwicklungszeitpunkt E12.5 bis E14 (Theiler stage 20/21) entnommen. Anschließend wurden die Nieren der Mausembryonen entfernt. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die gepaarten Nierenanlagen jedes Embryos jeweils auf einem separaten Polyethylenterephthalat Transwell® Filter (Porengröße 0,4 µm, Corning) *ex vivo* kultiviert wie bereits ausführlich beschrieben (123, 124). Als optimale Kultivierungsbedingungen erwiesen sich eine Umgebungstemperatur von 37°C sowie ein CO<sub>2</sub>-Gehalt der Luft von 5%. Das Kulturmedium DMEM/F-12 (1:1) versetzt mit L-Glutamin (PAA Laboratories) und 10% fetalem Kälberserum (FKS) (Sigma-Aldrich) wurde durch Penicillin (100 I.E./ml, PAA Laboratories) und Streptomycin (100 µg/ml, PAA Laboratories) zur antibiotischen Prophylaxe ergänzt. Die embryonalen Nieren wurden in der Folge mit speziellen *Vivo*-Morpholinos behandelt (s. Kap. 2.2.3)

## 2.2.2 Konservierung und Kultivierung von Zelllinien

Tab. 8: Zelllinien mit Herkunft und Bezugsquellen

Zelllinie	Name/ Herkunft	Bezugsquelle
293	humane embryonale Nierenzellen (125)	Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig
786-0	Humane Nierenzellen des klarzelligen Adenokarzinoms (126)	ATCC, Wesel, Deutschland
M15	Murine Mesonephroszellen (8)	Prof. Dr. Christoph Englert, Leibniz Institut für Altersforschung, Fritz Lipmann Institut, Jena
U2OS	humane Osteosarkomzellen	ATCC, Wesel, Deutschland
UB27	humane Osteosarkomzellen abstammend von U2OS-Zellen; stabil transfiziert mit einem Tetrazyklin abhängigen Wt1(-KTS)-Expressionsplasmid (35)	Prof. Dr. Christoph Englert, Leibniz Institut für Altersforschung, Fritz Lipmann Institut, Jena
UD28	humane Osteosarkomzellen abstammend von U2OS-Zellen; stabil transfiziert mit einem Tetrazyklin abhängigen Wt1(+KTS)-Expressionsplasmid (35)	Prof. Dr. Christoph Englert, Leibniz Institut für Altersforschung, Fritz Lipmann Institut, Jena

Alle genannten Zelllinien wachsen in adhärennten Monolayerkulturen. Die Zelllinien unterscheiden sich bezüglich des Organismus und Gewebes, aus dem sie ursprünglich isoliert und angelegt wurden. Die M15-Zellen entstammen dem Mesonephros (Urnere) der Maus (8), wohingegen die 293-Zellen aus einer menschlichen embryonalen Niere etabliert wurden (125). Die 786-0-Zellen sind maligne humane Nierenzellen eines klarzelligen Adenokarzinoms (126). Im Gegensatz dazu entstammen die U2OS-, UB27- und UD28-Zellen einem malignen humanen Knochentumor, dem Osteosarkom. Die UB27- und UD28-Zellen leiten sich von den U2OS-Zellen ab (35). Sie wurden genetisch derart verändert, dass sie eine induzierbare Expression unterschiedlicher *WT1*-Spleißvarianten ermöglichen (35).

Die Kultivierung aller Zelllinien erfolgte in Kunststoffzellschalen (TPP) in einem Zellkulturinkubator (Binder) bei 37°C Umgebungstemperatur, 95% Luftfeuchtigkeit und einem O<sub>2</sub>- bzw. CO<sub>2</sub>-Gehalt von 21% bzw. 5%. Dem Nährmedium Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM/F-12 (1:1) Gibco, PAA Laboratories) der M15-, 293- und U2OS-Zellen wurde zusätzlich 2 mmol/l L-Glutamin (PAA Laboratories) und 10% fetales Kälberserum (FKS) (Sigma-Aldrich) hinzugefügt. In den UB27- und UD28-Zelllinien erfolgt die Expression der *Wt1(-KTS)*- bzw. *Wt1(+KTS)*-Spleißvariante jeweils unter der

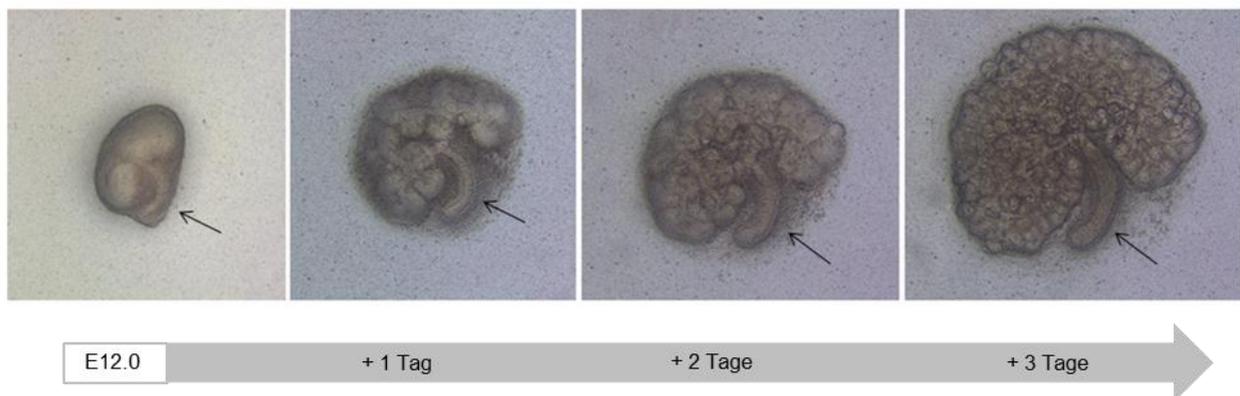
Kontrolle eines Tetrazyklin reprimierbaren Promotors. Um die *WT1*-Expression in diesen Zellen zu inhibieren, wurde dem DMEM Medium neben 10% FKS zusätzlich 1 µg/ml Tetrazyklin beigefügt. Die *WT1*-Induktion erfolgte mittels tetrazyklinfreiem Medium für 72 Stunden (127, 128). Die 786-0-Zellen wurden im RPMI 1640 Medium („high“ glucose“, PAA Laboratories) mit 10% FKS kultiviert.

Die Zellkulturarbeit erfolgte ausschließlich an einer Zellkultur Werkbank (Heraeus) mit sterilen Materialien zur Vermeidung etwaiger Kontaminationen. Die Zellen wurden täglich mikroskopisch begutachtet und abhängig von Zelldichte und -morphologie ca. dreimal wöchentlich passagiert. Dabei wurden die Zellen zweimalig mit PBS gewaschen, vorsichtig trypsiniert und von der Zellkulturschale abgelöst. Anschließend wurde die Zellmenge im benötigten Verhältnis in frischem Medium verdünnt und erneut ausgesät. Um die Originalzelllinien zu bewahren, wurden nach ausreichender Expansion Kryostocks von einer möglichst frühen Passage angelegt. Die Zellen einer konfluenten 10 cm Zellkulturschale wurden trypsiniert, abzentrifugiert und in Gefriermedium in den Kryoröhrchen aufgenommen, bevor sie bei -196°C in einen Flüssigstickstofftank eingelagert wurden. Zum Auftauen der Zellen wurden die Kryoröhrchen innerhalb kurzer Zeit auf 37 °C erwärmt, in frischem Medium resuspendiert, abzentrifugiert, erneut in frisches Medium aufgenommen und ausgesät.

### **2.2.3 Knockdown durch Behandlung mit einem antisense *Vivo*-Morpholino bzw. Transfektion mit siRNA**

In den Nierenorgankulturen wurde die *Wt1*-Expression durch eine 72-stündige Inkubation mit einem *Vivo*-Morpholino gehemmt. Dafür wurde dem Kulturmedium der Organkulturen pro Well 10 µM entweder eines spezifischen *Wt1* antisense (5'-CAGGTCCCGCACGTCGGAACCCATG-3') oder eines mismatch (5'-CAGCTCCGGCACCTCGCAACCGATG-3') *Vivo*-Morpholinos (GeneTools) hinzugefügt (129). Der spezifische *Wt1* antisense *Vivo*-Morpholino ist komplementär zur bekannten *Wt1* mRNA-Sequenz und hemmt durch seine Bindung im Bereich des ATG-Startcodons die Proteintranslation. Der mismatch *Vivo*-Morpholino enthält keine bekannte Zielsequenz im Mausgenom. Von jedem Embryo wurde jeweils die eine Niere mit *Wt1* antisense *Vivo*-Morpholino und die zweite Niere mit einem mismatch *Vivo*-Morpholino behandelt.

Da die gewonnenen Gewebemengen in den Einzelversuchen gering ausfielen, wurden die kultivierten Nierenanlagen gepoolt sowie Gesamt-RNA und Protein präpariert (s. Kap. 2.3.1). Die Überprüfung der *Wt1*-Knockdown-Effizienz erfolgte mittels Western Blot (s. Kap. 2.3.5). Aus den RNA-Proben wurden cDNA-Bibliotheken hergestellt (s. Kap. 2.3.2) und anschließend in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Wei Chen (Max-Delbrück-Centrum Berlin) tiefensequenziert. Die Nephronbildung in den Organkulturen wurde täglich unter dem Durchlichtmikroskop betrachtet (Abb. 4).



**Abb. 4: Nierenorgankulturen**

Beginnende Nephronbildung v.l.n.r.: Tag 0, Tag 1, Tag 2, Tag 4 nach Inkulturnahme; der Harnleiter ist jeweils mit einem Pfeil markiert. Die Aufnahme wurde freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Frau Dr. Karin Kirschner.

Um die *Wt1*- bzw. *Basp1*-Expression in den M15- und 786-0-Zellen zu hemmen, wurden small interfering RNAs (siRNAs) eingesetzt. Dies sind 20 bis 25 Basenpaar lange RNA-Moleküle, die an die jeweilige Ziel-RNA binden und über deren Degradierung zu einem temporären Knockdown führen (130), (131).

Die M15-Zellen wurden dafür auf eine 6-Well-Platte (9,6 cm<sup>2</sup> pro Well) ausgesät. Ab einer Konfluenz von ca. 60% wurden die Zellen mit einem Pool aus vier verschiedenen, gegen das murine *Wt1*-Gen gerichteten siRNAs (ON-TARGETplus, SMARTpool siRNA, L-040686-01-0005, Dharmacon) mit 50 pmol/ Well transfiziert. Analog dazu wurden für den Knockdown des murinen *Basp1*-Gens die entsprechenden siRNAs (ON-TARGETplus, SMARTpool siRNA, L-062605-01-0005, Dharmacon) verwendet. Als Negativkontrolle dienten in gleicher Konzentration vier siRNAs ohne Zielsequenz im Mausgenom (siGENOME non-targeting siRNA pool 2, D-001206-14-20, Dharmacon). Neben dem siRNA-Puffer wurde das Transfektionsreagenz Dharmafect 1 (Dharmacon) mit 10 pmol/ Well sowie DMEM/F-12 Medium ohne Zusätze (PAA Laboratories) verwendet. In gleicher

Weise wurden die 786-0-Zellen mit siRNAs gegen das menschliche *WT1*-Gen transfiziert (ON-TARGETplus, SMARTpool siRNA, L-009101-00-0005, Dharmacon). Hierbei wurde allerdings das RPMI 1640 Medium ohne Zusätze (PAA Laboratories) verwendet. 48 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen geerntet und RNA bzw. Protein präpariert (s. Kap 2.3.1 und 2.3.5).

## 2.2.4 Transiente Transfektionen

Eine *Wt1*-Überexpression erfolgte u.a. in den 293-Zellen. Die Zellen wurden auf eine 6-Well-Platte (9,6 cm<sup>2</sup> pro Well) ausgesät und bei Erreichen einer Konfluenz von ca. 60% transfiziert. Der Transfektionsansatz pro Well bestand neben 0,5 µg Plasmid-DNA aus 2 µl Transfektionsreagenz FuGENE6 sowie DMEM/F-12 Medium ohne Zusätze (PAA Laboratories). Als Plasmid-DNA dienten die in Tabelle 9 dargestellten *Wt1*- und *Basp1*-Expressionsplasmide, mit denen auch eine selektive Überexpression der jeweiligen *Wt1*-Spleißvarianten durchgeführt wurde. Als Negativkontrolle fungierte der jeweilige Leervektor. Zwei Tage nach Transfektion wurden die Zellen geerntet und RNA bzw. Protein präpariert (s. Kap 2.3.1 und 2.3.5). Die im Rahmen der Reporterassays erfolgten Transfektionen sind unter Kap. 2.3.8 vermerkt.

Tab. 9: Expressionsplasmide

Plasmid	Beschreibung	Bezugsquelle
pCB6+	pCB6+-Leervektor	Invitrogen, Carlsbad, USA
pCB6+ mWt1(-KTS)	<i>Wt1</i> -Expressionsplasmid (-KTS)-Spleißvariante	Dr. Daniel A. Haber, Massachusetts General Hospital, Boston, USA
pCB6+ mWt1(+KTS)	<i>Wt1</i> -Expressionsplasmid (+KTS)-Spleißvariante	Dr. Daniel A. Haber, Massachusetts General Hospital, Boston, USA
pcDNA3	pcDNA3-Leervektor	Professor Stefan G. E. Roberts, Bristol, UK
pcDNA3 <i>Basp1</i>	<i>Basp1</i> -Expressionsplasmid	Professor Stefan G. E. Roberts, Bristol, UK

## 2.3 Molekularbiologische Techniken

### 2.3.1 RNA-Extraktion

Aufgrund der unterschiedlichen Menge an Ausgangs-RNA unterscheidet sich die Gesamt-RNA-Extraktion von Organkulturen und Zelllinien (M15, 293, 786-0, UB27 und UD28) grundlegend. Letztere wurden zu Beginn mit Hilfe von RNA-bee (1 ml auf 5 x 10<sup>6</sup> Zellen) lysiert, und die folgende RNA-Aufreinigung orientierte sich am Herstellerprotokoll.

Durch Zugabe von Chloroform (200 µl) mit anschließender Zentrifugation (12.000 g für 15 min bei 4°C) erfolgte eine Phasenseparation und die sich in der oberen, wässrigen Phase befindende RNA wurde abgenommen. Daraufhin wurde die RNA mit Isopropanol (0,5 ml) präzipitiert, mit Ethanol (75%) gewaschen und in RNase-freiem Wasser gelöst. Mit Hilfe des NanoDrop™ 2000 wurde die RNA-Konzentration spektrophotometrisch bestimmt. Die nicht für die Umschreibung (siehe Kap. 2.3.3) benötigte RNA-Menge wurde bei -80°C eingefroren.

Die RNA-Präparation der Organkulturen erfolgte mit Hilfe des RNeasy® Micro Kits gemäß des Herstellerprotokolls. Aufgrund der geringen RNA-Menge der Organkulturen wurde die gesamte RNA ohne vorherige Konzentrationsbestimmungen in cDNA umgeschrieben (siehe Kap. 2.3.3).

### **2.3.2 Reverse Transkription**

Basierend auf den RNA-Konzentrationen der Proben, die von den Zelllinien stammten, wurde das Volumen für 2 µg RNA errechnet und die Differenz auf 12,5 µl mit RNase-freiem Wasser aufgefüllt. Bei den Organkulturproben wurde die gesamte RNA ohne eine vorherige Konzentrationsbestimmung eingesetzt.

Zu Beginn wurde zu jeder RNA-Lösung 1 µl Oligo(dT) (50 µM) und 1 µl dNTP Mix (10 mM) hinzu pipettiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation bei 65°C im Thermocycler für 5 min mit nachfolgender Abkühlung auf Eis. Daraufhin wurde jeder Probe 4 µl vom 5x First Strand Buffer, 1 µl 0,1 M DTT und 0,5 µl SuperScript™ III Reverse Transkriptase (alle Invitrogen) hinzugegeben. Im Anschluss wurden die Proben 60 min lang bei 50°C und 15 min lang bei 72 °C inkubiert, ehe die cDNA bei -20°C gelagert oder mittels quantitativer Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) vermessen wurde.

### **2.3.3 Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)**

Die Original-Primer (Übersicht in Tabelle 10) mit einer Originalkonzentration von 100 µM wurden für 5 min auf 55°C erhitzt.

Danach wurde eine Primer Mix Verdünnung aus je 10 µM Vorwärts- bzw. Rückprimern hergestellt. Vor dem Einsatz in der qRT-PCR wurden die Primer einmalig mittels konventioneller PCR (s. Kap. 2.3.6) und Agarose-Gelelektrophorese des entstandenen PCR-Produktes auf Funktionalität überprüft.

Tab. 10: PCR-Primer in Leserichtung von 5'- zu 3'-Ende

<b>Gen</b>	<b>Spezies</b>	<b>Ensembl ID</b>	<b>Sequenz</b>
β-Aktin	F murin	ENSMUSG000000	CCGCGAGCACAGCTTCT
	R	29580	GGGTACTTCAGGGTCAGGAT
Wnt10B	F murin	ENSMUSG000000	CCGTGAGTTAGGTTCGAGCAG
	R	22996	GGGCTTAAACCGTGGGGAAA
Adora1	F murin	ENSMUSG000000	TGAAATGACTGGGGTGTCCC
	R	42429	CCGGCCTTTCAAGCAATCAC
Daam2	F murin	ENSMUSG000000	AGCCTTCACACCCACTGAAG
	R	40260	CTCAGTTCTGTGGGCACTCG
Npr3	F murin	ENSMUSG000000	GGCCTAGAAGAATCTGCAGTGA
	R	22206	GCGAGAGGGGCATCTCTTTT
WT1	F murin	ENSMUSG000000	GATGTTCCCCAATGCGCCCTA
	R	16458	TGCCCTTCTGTCCATTTCACT
HoxB9	F murin	ENSMUSG000000	TCCAGCCAAGTTTCCTTCGG
	R	20875	TAGGGGTGGTAGACAGACGG
Basp1	F murin	ENSMUSG000000	TGGCCGTCAAAGAGTAACCG
	R	45763	CCCTGATGGGACACATCCTC
β-Aktin	F human	ENSG00000075624	AGAAAATCTGGCACCACACC
	R		GCCATCTCTTGCTCGAAGTC
Wnt10B	F human	ENSG00000169884	GAGCTCGGTGAGAGCAAAGC
	R		GCTTAAACCGTGGGGAGACT
Adora1	F human	ENSG00000163485	CATCCCTCTGGAGCTTACCG
	R		CACCTCGATGCCGATGTAGG
Daam2	F human	ENSG00000146122	TGGAGGTGGAGCTGGAGTATC
	R		CTCCCCGAAGTGCATCAAGG
Npr3	F human	ENSG00000113389	GCACCCAGGAGGTTATTGGT
	R		TCCTGTCACTGCCGATTCTT
WT1	F human	ENSG00000184937	TCCCAGCTTGAATGCATGAC
	R		CACACGTCGCACATCCTGAAT
HoxB9	F human	ENSG00000170689	TGTCCATTTCTGGGACGCTT
	R		GTAAGGGTGGTAGACGGACG
Basp1	F human	ENSG00000176788	AGGAGACCAAAGTGACGGG
	R		TTGGTCGGAATTAGCTGCCG
Wnt10A	F murin	ENSMUSG000000	CACAGTGTGCCTGACATTGCC
	R	26167	TCGCAACCGCAAGCCTTCAGT
TPP1	F murin	ENSMUSG000000	ACACAAGTTCCGCCCTAGC
	R	30894	CCCAAACACTGGAGTAGAGGC

PDCD6IP	F murin	ENSMUSG000000	AAGCTGTGCAAGCGGATGGAC
	R	32504	ATCACGCCATCTTGGGCCAGA
PLIN2	F murin	ENSMUSG000000	GCGTCTCTTTTCTCCAGGAGG
	R	28494	GGCATAGGTATTGGCAACCGC
PARP14	F murin	ENSMUSG000000	AGTTCAGTCAGGATGGCAGC
	R	34422	TGGGCATCAGGACAGTCAAC
CCZ1	F murin	ENSMUSG000000	CAGGAGAAGCAGTTCCCGC
	R	29617	GCAGGTTTCGATGGGCTAAA
AQP2	F murin	ENSMUSG000000	CGCCATCCTCCATGAGATTAC
	R	23013	AGTGACAACCTGCTGGAGCCAG
ABI3BP	F murin	ENSMUSG000000	CAGTTCAGGGTTGCAAGGCA
	R	35258	GTGGGAAGAGGGAAGTACTGG
PCSK5	F murin	ENSMUSG000000	GCGAGGATGGACAGTTCTTCA
	R	24713	CCCAGGACTCTTCCGTAGC
LECT1	F murin	ENSMUSG000000	GGATCCGTTTTGCTGGAGGA
	R	22025	TGCTTTTGGATACATGGGCT
GSDMC2	F murin	ENSMUSG000000	GTATGCATACATGAGGGCCTG
	R	56293	TAACCACATCCTTGCTAGCCC
ITFG1	F murin	ENSMUSG000000	AACAAGTGTGGTCCCTGGTG
	R	31703	GTATCTGCGGTTGGCTGGAT

Zur Durchführung der quantitativen RT-PCR wurden das StepOnePlus™ Real-Time PCR System sowie das CFX96 Real-Time System verwendet. Die Reaktionsansätze wurden in 96-Well TW-MT-Platten pipettiert, die nach Befüllung mit einer adhäsiven Folie (Adhesive Clear PCR Seal, beides Biozym) versiegelt wurden, um einer Verdunstung vorzubeugen. Alle Proben wurden grundsätzlich in Doppelansätzen pipettiert und für jedes Primerpaar eine Negativkontrolle, bestehend aus destilliertem Wasser anstatt der jeweiligen cDNA, mitgeführt.

Der PCR-Reaktionsansatz enthielt 5 µl SYBR® Green PCR Master Mix, 0,2 µl Primer Mix (Endkonzentration 400 nM) und 2,8 µl ddH<sub>2</sub>O. Ergänzt wurde dies durch 2 µl cDNA, die 1:10 verdünnt eingesetzt wurde. Das standardmäßig verwendete qRT-PCR-Programm bestand in einer initialen Denaturierung (95°C für 10 min), gefolgt von 45 Zyklen mit Denaturierung (95°C für 15 s), Primer Annealing und Elongation (60°C für 60 s) sowie SYBR Green Fluoreszenzdetektion (77°C für 30 s) (132). Nach dem letzten Zyklus wurden die entstandenen PCR-Produkte schrittweise auf 95°C erwärmt und die produktspezifischen Schmelzkurven bestimmt, anhand derer im Nachhinein eine Aussage zur Richtigkeit der PCR-Produkte getroffen werden konnte.

Die Auswertung bzw. die Quantifizierung der in jeder Probe enthaltenen cDNA erfolgte mit Hilfe der  $\Delta\Delta C_T$ -Methode (133). Der  $C_T$ -Wert (cycle of threshold) ist der Amplifikationszyklus, bei dem das Fluoreszenzsignal die angesetzte Hintergrund-Fluoreszenzschwelle (threshold) von 0,1 überschreitet. Um die einzelnen Messungen vergleichen zu können, wurden die  $C_T$ -Werte der Zielgene mittels Subtraktion ins Verhältnis zu einem Referenzgen (in der Regel  $\beta$ -Aktin) gesetzt. Die dabei erhaltenen  $\Delta C_T$ -Werte wurden von der dazu gehörigen Kontrolle subtrahiert und als negative logarithmische Potenz dargestellt (133).

$$\Delta C_T = C_T (\text{Zielgen}) - C_T (\beta\text{-Aktin})$$

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T (\text{Probe}) - \Delta C_T (\text{Kontrolle})$$

$$2^{-\Delta\Delta C_T} = \text{relativer Genexpressionsunterschied}$$

### **2.3.4 Proteinextraktion**

Nach Abnahme des Mediums wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und anschließend mit SDS-Probenpuffer (70  $\mu$ l pro Well bei einer 6-Well-Platte) lysiert. Nach Abschaben der Zellen wurde das Zellgemisch homogenisiert und zum Zellaufschluss mit Ultraschall behandelt. Dies erfolgte mit Hilfe einer Sonotrode. Abhängig von der Viskosität wurden die Proben zwei bis dreimal für jeweils zwei Sekunden sonifiziert.

Die Proteinkonzentration konnte nach Bestimmung der Absorptionwerte bei 260 bzw. 280 nm Wellenlänge mit Hilfe des NanoDrop™ 2000 nach der Warburg-Christian-Formel errechnet werden (134).

### **2.3.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot**

Für die SDS-Gelelektrophorese wurden Polyacrylamid-Gele verwendet, die aus einem unteren Trenn- und einem oberen Sammelgel bestanden. Abhängig von der Größe der nachzuweisenden Proteine können unterschiedliche Acrylamidkonzentrationen gewählt werden. In dieser Arbeit wurde ein Trenngel mit 10% und ein Sammelgel mit 5% Acrylamidanteil hergestellt. Basierend auf den Proteinkonzentrationen wurde das jeweilige Volumen für eine Gesamt-Proteinmenge von 20  $\mu$ g errechnet und mit einem 6x Probenpuffer versetzt. Anschließend folgte eine Proteindenaturierung bei 95°C für 5 min im Thermoblock. In der Zwischenzeit wurden die Polyacrylamid-Gele für den Elektrophoreselauf in die Laufkammern eingesetzt und letztere mit 1x SDS-Laufpuffer

aufgefüllt. Die Geltaschen wurden mit den Proteinproben sowie einem Proteinmarker beladen und eine Spannung von 80 Volt angelegt. Sobald die Proben im Trenngel sichtbar wurden, erfolgte eine Erhöhung der Spannung auf 100 Volt. Nach ca. einer Stunde hatten sich die Proteine mit Erreichen des Unterrandes des Gels im elektrischen Feld abhängig von ihrer Molekülgröße aufgetrennt (135).

Die aufgetrennten Proteine wurden nun mit Hilfe einer Semidry-Blotting-Apparatur auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran übertragen. Dafür wurde die Membran für 15 Sekunden in Methanol aktiviert, mit destilliertem Wasser gespült und zusammen mit dem Filterpapier im Blotting-Puffer äquilibriert. Der Aufbau der Semidry-Blotting-Apparatur bestand nun von der Anodenplatte ausgehend aus Faservlies, Filterpapier, PVDF-Membran, Polyacrylamid-Gel, Filterpapier und Faservlies. Der Transfer wurde mit konstant 15 Volt für 45 Minuten durchgeführt. Durch das senkrecht zum Polyacrylamid-Gel gerichtete elektrische Feld wandern die negativ geladenen Proteine in Richtung der positiv geladenen Anode und somit vom Gel auf die PVDF-Membran.

Um die unspezifischen Bindungsstellen der PVDF-Membran zu blockieren, wurde sie für eine Stunde in einer Lösung aus 5% Magermilchpulver (in TBS-T) inkubiert und anschließend mit TBS-T gewaschen. Die nachfolgende Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte über Nacht bei 4°C. Eine Übersicht über alle verwendeten Primärantikörper gibt die Tabelle 11.

Tab. 11: Primäre Antikörper für Western Blot

<b>Antigen</b>	<b>Host</b>	<b>Klonalität</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Katalognummer</b>	<b>Verdünnung</b>
Aktin	Maus	monoklonal	Merck Millipore	MAB1501R	1:10.000
GAPDH	Maus	monoklonal	Merck Millipore	MAB374	1:2.000
Wt1	Kaninchen	monoklonal	Abcam	ab89901	1:1.000
Wt1 C19	Kaninchen	polyklonal	Santa Cruz	Sc-192	1:1.000
HoxB9	Kaninchen	polyklonal	Sigma-Aldrich	AV32639	1:500
HoxB9 (H-8)	Maus	monoklonal	Santa Cruz	sc-398500	1:500
Basp1	Kaninchen		Roberts Lab (16)		1:1.000
Pan-Histon H3	Kaninchen	polyklonal	Merck Millipore	07-690	1:25.000
H3K27me3	Kaninchen	polyklonal	Diagenode	C15410195	1:500

Am nächsten Tag wurde die Membran mit TBS-T gewaschen, mit dem Sekundärantikörper (Tab. 12) für eine Stunde inkubiert und abschließend erneut gewaschen.

Tab. 12: Sekundäre Antikörper für Western Blot

<b>Antigen</b>	<b>Host</b>	<b>Konjugat</b>	<b>Klonalität</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Katalognummer</b>
Anti Kaninchen	Ziege	IgG-HRP	polyklonal	1:30.000	Santa Cruz	sc-2004
Anti Maus	Ziege	IgG-HRP	polyklonal	1:30.000	Santa Cruz	sc-2005
Anti Kaninchen	Ziege	IgG-HRP	polyklonal	1:40.000	Jackson Immuno	111-035-003
Anti Maus	Ziege	IgG-HRP	polyklonal	1:40.000	Jackson Immuno	115-035-003

Unter Verwendung des WesternBright ECL HRP substrate katalysierten die HRP-gekoppelten Sekundärantikörper eine Chemolumineszenz-Reaktion. Für den Proteinmarker wurde das Precision Protein™ StrepTactin-HRP Conjugate in einer Verdünnung von 1:100.000 eingesetzt. Das entstehende Signal konnte am ECL Chemostar Advanced Imager detektiert werden. Im Anschluss wurde in der Regel  $\beta$ -Aktin als Referenzgen angefärbt, um eine ungleichmäßige Probenbeladung auszuschließen. Stammt die zu verwendende Sekundärantikörper von der gleichen, zuvor verwendeten Spezies, wurde ein Stripping mit 0,2 M NaOH für 10 Minuten durchgeführt. Falls sich die Spezies unterschieden, wurde ein einfaches HRP-Stripping gewählt, wie es bei der Kombination aus Wt1 und dem Referenzprotein  $\beta$ -Aktin der Fall war. Zur densitometrischen Analyse wurde die Software ImageJ genutzt.

### **2.3.6 Konventionelle Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Die konventionelle PCR wurde sowohl zur Testung der Funktionalität der Primer (siehe Kap. 2.3.3) als auch zur Herstellung von Promotorabschnitten, die im weiteren Verlauf in Vektoren kloniert wurden (siehe 2.3.7), genutzt. Für letzteres wurde in der Regel das Expand Long Template PCR System verwendet. Ein Reaktionsansatz bestand aus single dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP je 350  $\mu$ M Endkonzentration), Vorwärts-/ Rückprimern (je 300 nM), 10x Expand Long Template Puffer 1 (1,75 mM), template DNA (400 ng) und dem Expand Long Template Enzym-Mix (0,75 $\mu$ l). Auf dem T100 Thermal Cycler wurde folgendes PCR-Programm genutzt: initiale Denaturierung (95°C für 5 min), gefolgt von

35 Zyklen aus Denaturierung (94°C für 15 s), Primer Annealing (58°C für 30 s) und Elongation (68°C für 90 s) sowie einer abschließenden Elongation (68°C für 7 min). Tabelle 13 gibt eine Übersicht über die verwendeten Primer, wobei mit Hilfe einiger manuell, veränderter Primer Nukleotidmutationen erzeugt werden konnten. Diese mutierten Sequenzen wurden ebenfalls im Rahmen der Reporterkonstrukte verwendet (siehe Kap. 2.3.7).

Tab. 13: Primer für die konventionelle PCR in Leserichtung von 5'- zu 3'-Ende.

Mutierte Basen sind rot gekennzeichnet.

DNA-Region	Nr.	Sequenz
Wnt10B Promotor WT	F 3178	AGTGGACCATGCTGTGCTTGGGGCTGCGGTC T
	R 3179	ACGCTCGAGAACTCACGGGTGGTTCTGCTCG AG
Adora1 Promotor WT	F 3180	AGCGGTACCTGAGCCAGTGATGAAGTGAGGG CC
	R 3181	TGCCTCGAGTGTGCGGAGCCCGATTGTCACT CA
Daam2 Promotor WT	F 3172	AGCGGTACCGGAGATGGTTCACTGCAGATGG TC
	R 3173	ATTCTCGAGTGAAAGCAGGCTGTTCCCTCCGG
Npr3 Promotor WT	F 3170	ATTGGACCTGTGACCTCGGCACCGCTGCGATT
	R 3171	GCGCTCGAGTGCTAAGTTGCTTTTGAAAGCGT
HoxB9 Promoter WT	F 3270	ATCGGTACCGGTCGCTGTAAGTGTGTTGT
HoxB9 Promoter WT	R 3271	ATTACGCGTGAAAAGGTGGCACACGGACC
HoxB9 Promoter WT	F 3499	ATCGGTACCTAATTACCCTGTCCGGGCCTC
HoxB9 Promoter WT	F 3293	ATCGGTACCCCATCGCCCATGTTGAGAA
HoxB9 Promoter WT	F 3311	ATTGGTACCCGGAGCCCTGACGTGATAG
HoxB9 Promoter WT	F 3272	AGCGGTACCTATGTCGGAGCTGACGCTTT
HoxB9 Promoter Mut	F 3294	AGGGGGT <b>AGGATT</b> GGGAGGG
HoxB9 Promoter Mut	R 3295	CCCTCCA <b>ATCCT</b> ACCCCT
HoxB9 Promoter Mut	F 3305	TAAAAGCG <b>AGAGGAG</b> CCCGT
HoxB9 Promoter Mut	R 3306	<b>ACGGGCTCCTCT</b> CGCTTTTA
HoxB9 Promoter Mut	F 3307	GAGAAGTTGAGCAT <b>TGGAGTAGG</b>
HoxB9 Promoter Mut	R 3308	<b>CCTACTCCATGCTCA</b> ACTTCTC
HoxB9 Promoter Mut	F 3309	GG <b>ATCTAGGGAGT</b> GTCCGTC
HoxB9 Promoter Mut	R 3310	GACGCGAC <b>ACTCCCTAGATCCC</b>
HoxB9 Promoter Mut	F 3500	GG <b>TGTGGTTCGACA</b> AAGACTACC
HoxB9 Promoter Mut	R 3501	GGTAGTCTTGT <b>CGAACCACACC</b>

### 2.3.7 Klonierung und Plasmidpräparation

Die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Reporterkonstrukte setzen sich zusammen aus einem Leervektor, dem pGL3basic Luciferase Reporter Vektor (Promega), und einem

DNA-Insert. Das gewünschte DNA-Insert wurde mit Hilfe der konventionellen PCR und den zugehörigen Primern (siehe Kap. 2.3.6) hergestellt. Als DNA-Template für die PCR wurde genomische DNA der Maus verwendet. Im Anschluss an die PCR wurde ein Teil zur Bandenkontrolle des Produktes auf ein Agarosegel aufgetragen. Lief das PCR-Produkt auf der zu erwartenden Höhe, wurde es mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kits nach Herstellerangaben aufgereinigt. Um das PCR-Produkt in den geschlossenen Leervektor klonieren zu können, erfolgte ein Restriktionsverdau. Dafür wurden sowohl der pGL3basic Vektor (3 µg) als auch das gesamte, aufgereinigte PCR-Produkt jeweils mit einem 10x Fast Digest Puffer (3 µl) und den zugehörigen Restriktionsenzymen KpnI und MluI (je 1,5 µl, beides Thermo Fisher Scientific) versetzt. Die Differenz zu einem Gesamtvolumen von 30 µl wurde mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Die Restriktionsansätze wurden für 30 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert und die Enzyme im Anschluss bei 80°C für 5 Minuten durch Hitze inaktiviert. Der Leervektor wurde im Anschluss mit einer thermosensitiven alkalischen Phosphatase und dem passenden 10x Fast Digest Puffer (beides Thermo Fisher Scientific) für 25 Minuten bei 37°C dephosphoryliert. Alle Restriktionsansätze wurden nun auf ein Agarosegel 0,8% geladen, die Bandenhöhe wurde kontrolliert und die DNA unter Verwendung des QIAquick Gel Extraction Kits nach Herstellerprotokoll extrahiert. Für die nachfolgende Ligation wurden Vektor und Insert im Verhältnis ihrer Größe (v/v: 3:1) mit einem 2x Ligationspuffer sowie der T4 Ligase (1 µl pro 10 µl Ansatz, beides Promega) für eine Dauer von 30 Minuten versetzt. Als Negativkontrolle wurde statt eines Inserts destilliertes Wasser verwendet. Etwa 2 µl des Ligationsmix wurden vorsichtig auf die One Shot™ TOP10 Chemically Competent *E. coli* (Thermo Fischer Scientific) pipettiert und 30 Minuten auf Eis stehen gelassen. Danach wurden die Proben für 20 Sekunden im Wasserbad bei 42°C erwärmt, zwei Minuten auf Eis abgekühlt und 500 µl SOC-Medium hinzugegeben.

Es folgte eine Stunde Schüttelinkubation, eine Abnahme von ca. 400 µl Überstand nach Zentrifugation mit anschließender vorsichtiger Resuspension. Zur Selektion wurden jeweils 100 µl der Proben auf einer vorgewärmten, Ampicillin-beschichteten Agarplatte verteilt und über Nacht bei 37°C inkubiert. In der Leervektorkontrolle sollten über Nacht deutlich weniger Einzelkulturen gewachsen sein. Am nächsten Tag wurden die Einzelkulturen mit Hilfe einer Pipettenspitze gepickt, in eine Schüttelkultur aus LB-Medium und Ampicillin (1:1.000) transferiert und erneut über Nacht im Inkubator

geschüttelt. Am darauffolgenden Tag wurden zum Erhalt Glycerinkulturen aus Freezing Medium und Kultur im Verhältnis von 1:1 angelegt. Die Plasmidpräparation erfolgte mittels des PureYield™ Plasmid Miniprep Systems gemäß Herstellerangaben. Zur Überprüfung des erzeugten Konstruktes wurde ein Plasmidverdau unter den oben beschriebenen Bedingungen durchgeführt und auf ein Agarosegel 1% aufgetragen. Bei korrekter Bandenlänge wurde das Plasmid abschließend bei Eurofins Genomics (Luxemburg) sequenziert.

### 2.3.8 Reportergenassay

Im Rahmen der durchgeführten Reportergenassays wurden verschiedene Zelllinien auf eine 24-Well-Kulturplatte ausgesät und ab einer Konfluenz von ca. 70% transient transfiziert (siehe Kap. 2.2.4). Der Transfektionsansatz pro Well setzte sich zusammen aus Medium ohne Zusätze (50 µl), dem jeweiligen Promotor-Reporterkonstrukt (100 ng, Tabelle 14), einem *Wt1*-Expressionsplasmid (100 ng) sowie einem Renilla-Luciferase-Plasmid (50 ng) zur Normalisierung der Transfektionseffizienzen. Dieses Gemisch wurde mit dem Transfektionsreagenz FuGENE6 (1,25 µl pro Well) für eine halbe Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, bevor es für 48 Stunden auf die Zellen gegeben wurde. Nach Ablauf dieser Zeit wurde das Medium abgenommen, die Zellen zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und in 1x Passive Lysis Puffer (50µl pro Well, Promega) lysiert. Die Proben wurden daraufhin für ein bis zwei Stunden eingefroren, bis sich Eiskristalle gebildet hatten. Nach dem Auftauen wurde die Lumineszenz von je 20 µl Zelllysat unter Verwendung des Luciferase- und Renilla-Puffer (je 100 µl) in einem Luminometer FB12 (Berthold) gemessen. Das Substrat Coelenterazin (100 mg/1 ml EtOH) wurde immer erst kurz vor der Messung zum Renilla-Puffer hinzugegeben (Endkonzentration im Puffer: 1,43 µM). Es wurden stets Doppelbestimmungen durchgeführt und die erhobenen Werte ins Verhältnis zu den Kontrollen gesetzt.

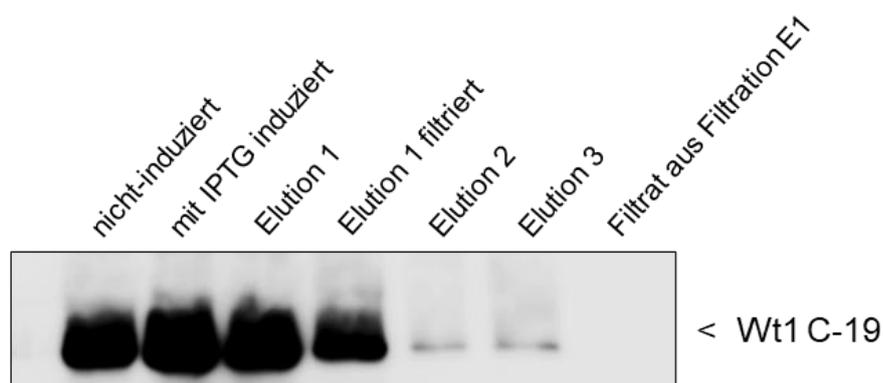
Tab. 14: Reporterkonstrukte

Bezeichnung	Produktlänge	WT/ Mutation
pGL3basic Luciferase Reporter Vektor	Klonierungsvektor	
Wnt10B_(3178/3179)	1032 bp	WT
Adora1_(3180/3181)	1041 bp	WT
Daam2_(3172/3173)	1130 bp	WT
Npr3_(3170/3171)	1057 bp	WT
HoxB9_959_(3270/3271)	678 bp	WT

HoxB9_981_(3499/3271)	559 bp	WT
HoxB9_966_(3293/3271)	399 bp	WT
HoxB9_980_(3311/3271)	311 bp	WT
HoxB9_960_(3272/3271)	200 bp	WT
HoxB9_983_(3293/3271)_(3305/06)	399 bp	Mutation
HoxB9_984_(3293/3271)_(3307/08)	399 bp	Mutation
HoxB9_985_(3293/3271)_(3309/10)	399 bp	Mutation
HoxB9_986_(3270/3271)_(3500/01)	678 bp	Mutation
HoxB9_982_(3270/3271)_(3305/06)	678 bp	Mutation
HoxB9_967_(3270/3271)_(3294/95)	678 bp	Mutation

### 2.3.9 Rekombinantes WT1-Protein und Elektromobilitäts-Shift-Assay (EMSA)

Die Gewinnung von rekombinantem WT1-Protein erfolgte durch Plasmidaufreinigung der entsprechenden Glycerinkulturen bestehend aus One Shot™ TOP10 Chemically Competent *E. coli* (Thermo Fischer Scientific). Die präparierten Plasmide pGEX-6P-1 WT1A (-/-) und pGEX-6P-1 WT1C (-/+) kodieren dabei für Teile der WT1(-KTS)- und Wt1(+KTS)-Proteinvarianten. Im Rahmen der Aufreinigung wurde zu Beginn eine Bakterienkultur (100 ml) angesetzt und vier bis fünf Stunden lang bei 37°C inkubiert, bevor eine Induktion mit IPTG (100 mM) für die gleiche Zeitdauer folgte. Nach Zentrifugation wurde das Bakterienpellet in eiskaltem PBS (10 ml) aufgenommen, fraktioniert und mit Ultraschall lysiert. Die weitere Präparation erfolgte mit Hilfe von Triton X-100 (Endkonzentration 1%), Glutathion-Agarose und einer Glutathionreduktionslösung. Die Fraktionen wurden getrennt gesammelt und mittels Western Blot (Abbildung 5, Kap. 2.3.5) überprüft.



**Abb. 5: Western Blot des rekombinanten WT1-Proteins**

Zur Durchführung der Elektromobilitäts-Shift-Assays (EMSAs) wurde das oben beschriebene, mit GST aufgereinigte, rekombinante WT1-Proteinfragment sowie doppelsträngige DNA-Oligonukleotide (Eurofins Genomics) verwendet. Die am 5'-Ende

mit Cy5 fluoreszenzmarkierten Oligonukleotide enthielten v.a. Sequenzen des murinen Promotors des *HoxB9*-Gens (WT oder mutiert), die als potenzielle WT1-Bindungsstellen untersucht wurden. Eine Übersicht gibt Tabelle 15. Zu Beginn erfolgte ein Annealing der sense/antisense Oligonukleotide (jeweils 100 pmol) mit Hilfe des DIG Oligonucleotide 3'-End Labeling Kits (2<sup>nd</sup> Generation) gemäß Herstellerangaben. Anschließend wurde die Bindungsreaktion aus rekombinantem WT1-Protein (2,5 µg), dem 5 x EMSA-Bindepuffer, Calf Thymus DNA (1 µg) sowie Glycerin (5%) für 15 Minuten auf Eis begonnen, ehe die DIG-markierten Oligonukleotide (jeweils 1 pmol) für weitere 15 Minuten hinzugegeben wurden (136). Die Bindungsreaktionen wurden danach auf ein nicht-denaturierendes Polyacrylamid-Gel (6% aus Tris-Glycin-EDTA-Puffer) aufgetragen und für ca. eine Stunde bei 80 V aufgetrennt. Die von den Oligonukleotiden emittierte Fluoreszenz wurde mit dem ECL Chemostar Imager nachgewiesen. Darüber hinaus wurde die Protein-DNA-Interaktion kompetitiert durch Zugabe verschiedener Konzentrationen eines unmarkierten Oligonukleotids einer zuvor identifizierten WT1-Bindungssequenz im Promotor des murinen *Ntrk2*-Gens (44).

Tab. 15: Cy5-gelabelte Oligonukleotide für EMSA in 5'-3'-Leserichtung für *HoxB9* (A-E)

<b>Bezeichnung</b>	<b>Sequenz</b>
Oligo A-sense	Cy5-TATGCTGGTCCTCCCCCCCCCCCCAATCTG
Oligo A-antisense	Cy5-CAGATTGGGGGGGGGGGGGACCAGCATA
Oligo A_mut-sense	Cy5-TATGCTGGTCCTAACCTCACACTCAATCTG
Oligo A_mut-antisense	Cy5-CAGATTGAGTGTGAGGTTAGGACCAGCATA
Oligo B-sense	Cy5-GCCTCTCCTCCGCCCCCATCGCCCCATGTT
Oligo B-antisense	Cy5-AACATGGGGCGATGGGGGCGGAGGAGAGGC
Oligo B_mut-sense	Cy5-GCCTCTCATCCGAACCTATCGCTTCATGTT
Oligo B_mut-antisense	Cy5-AACATGAAGCGATAGGTTCCGGATGAGAGGC
Oligo C-sense	Cy5-AGCGCGAGCGCAGCCCCCTCGCCCGATTGA
Oligo C-antisense	Cy5-TCAATCGGGCGAGGGGGGCTGCGCTCGCGCT
Oligo C_mut-sense	Cy5-AGCGCGAGTGCAGAACCTTAGCTCGATTGA
Oligo C_mut-antisense	Cy5-TCAATCGAGCTAAGGTTCTGCACTCGCGCT
Oligo D-sense	Cy5-GAGCAGGGGGTGGGGGTGGGAGGGTGGGGGTCT
Oligo D-antisense	Cy5-AGACCCCCACCCTCCCACCCCCACCCCCTGCTC

Oligo D_mut-sense	Cy5-GAGCAGGATGTGGTAGTGTAGAGTTAGGGTCT
Oligo D_mut-antisense	Cy5-AGACCCTAACTCTAACACTACCCACATCCTGCTC
Oligo E-sense	Cy5-GGAGGGTGGGGGTGTGGGGGGGGTTCGCGTCCGAA
Oligo E-antisense	Cy5-TTCGGACGCGACCCCCCCCAGACCCCCACCCTCC
Oligo E_mut-sense	Cy5-GGAGTGTGGAAGTCTGAAGGTTGTCGCGTCCGAA
Oligo E_mut-antisense	Cy5-TTCGGACGCGACAACCTTCAGACTTCCACACTCC
Oligo mNtrk2-sense	Cy5-TGTGAACTCCCACATGCTGCTG
Oligo mNtrk2-antisense	Cy5-CAGCAGCATGTGGGAGTTCACA

### 2.3.10 Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)

Die ChIP-Experimente wurden, wie in den Publikationen der Arbeitsgruppe beschrieben, durchgeführt (136, 137). Die M15-, U2OS-, UB27- und UD28-Zellen wurden jeweils auf eine 15 cm Zellkulturschale ausgesät und bis zum Erreichen einer Konfluenz von 100% kultiviert. Dabei wurden die UB27- und UD28-Zellen sowohl mit als auch ohne tetrazyklinhaltigem Medium inkubiert.

Die Quervernetzung erfolgte mit Formaldehyd (1% Endkonzentration) für 10 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von Glycin (125 mM Endkonzentration) terminiert, die Zellen zweimal mit eiskaltem PBS und 1x Proteaseinhibitor (Mini Complete (MC)) gewaschen, abgeschabt und in 4 ml der Lösung aufgenommen.

Nach Zentrifugation (5 min bei 4°C und 1.350 xg) wurde der Überstand entfernt und die Zellyse mit 6 ml hypotonem Lysepuffer + 1x MC eingeleitet. Zum weiteren Zellaufschluss wurden die Proben mit Ultraschall (2 x 5 s, power 1/3; Fisherbrand™ Model 120 Sonic Dismembrator) behandelt, gefolgt von der Zugabe von 2 ml hypotonem Lysepuffer + 1x MC sowie abschließend SDS Lysepuffer + 1x MC (450 µl pro Probe). In den Zwischenschritten wurden die Zellen jeweils 5 min lang bei 4°C und 3.000 xg zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellen im SDS Lysepuffer wurden gleichmäßig auf drei TPX-Tubes verteilt und unter Verwendung des Bioruptor® Plus Sonication Systems mit Ultraschall behandelt. Das Programm setzte sich zusammen aus 20 Zyklen mit 30 s hoher Ultraschallintensität und 45 s Pause sowie 10 Zyklen mit ebenfalls 30 s hoher Ultraschallintensität aber 30 s Pause. Abschließend wurden die Proben für 5 min bei 4°C und 14.000 xg zentrifugiert, der Überstand gepoolt und bei -80°C eingefroren oder für die nachfolgende Immunpräzipitation verwendet. Nach Komplettierung der DNA-Scherung

sollte die Fragmentlänge zwischen 200-800 bp liegen. Dies konnte durch Auftragen eines Probenanteils auf ein Agarosegel überprüft werden. Die Chromatinkonzentration wurde mit Hilfe des NanoDrop™ 2000 bestimmt.

Anschließend wurden Protein A/G gekoppelte Magnetpartikel (Magna HiSens Protein A/G, Merck Millipore) mit 5 x Immunpräzipitat (IP) + MC gewaschen, in 200 µl IP-/Dilutionspuffer + MC resuspendiert und durch zweistündige Inkubation bei 4°C und 200 rpm im Rotator (Biosan) an den gewünschten Antikörper (1 µg) gebunden. Eine Übersicht über die verwendeten Antikörper gibt Tabelle 16, wobei das Kaninchen IgG als Negativ- und die Pan-Histon 3-Antikörper als Positivkontrolle eingesetzt wurden.

Zur Immunpräzipitation wurde nun das gescherte Chromatin (40 µg pro Ansatz) mit dem Magnetpartikel-Antikörper-Gemisch über Nacht bei 4°C inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Immunpräzipitate jeweils 5 Minuten lang in unterschiedlichen Puffern gewaschen, zuerst in den Waschpuffern mit niedrigem und hohem Salzanteil, gefolgt vom LiCl-Waschpuffer, zweimal im TE-Puffer und abschließend im Elutionspuffer.

Mit 30 µl 5 M NaCl und einer Inkubation bei 65°C für drei Stunden wurden die Querverbindungen aufgelöst und die Proben anschließend mit Proteinase K verdaut. Die DNA wurde daraufhin mit Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1)-Extraktion aufgereinigt und mit Ethanol (1 ml, 100%) über Nacht bei -80°C gefällt.

Tab. 16: Antikörper für CHIP

<b>Antigen</b>	<b>Host</b>	<b>Klonalität</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Katalognummer</b>
WT1	Kaninchen	polyklonal	Abcam	ab15249
WT1	Kaninchen	polyklonal	Santa Cruz	Sc-192
Basp1	Kaninchen		Roberts Lab (16)	
K3K4me3	Kaninchen	polyklonal	Diagenode	C15410030
H3K27me3	Kaninchen	polyklonal	Diagenode	C15410195
H3K27me3	Kaninchen	polyklonal	Diagenode	C15410069
H3K27ac	Kaninchen	polyklonal	Diagenode	C15410174
RNA Pol II	Kaninchen	polyklonal	Santa Cruz	sc-899X
Pan-Histon 3	Kaninchen	polyklonal	Merck Millipore	07-690
Kaninchen IgG	Kaninchen	polyklonal	Diagenode	C15410206

Am folgenden Tag wurde nach 20-minütiger Zentrifugation bei maximaler Drehzahl der Überstand abgenommen und das DNA-Pellet mit Ethanol gewaschen. Nach einer

Trocknungsphase erfolgte die Resuspension in 70 µl TE-Puffer. Potenziell vorhandene RNAs wurden durch einen abschließenden RNase A-Verdau (30 min bei 37°C) eliminiert. Für die Messungen der qRT-PCR wurde der gleiche Reaktionsansatz wie in Kap. 2.3.3 gewählt. Allerdings wurde stets 2 µl unverdünnte DNA eingesetzt. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 17 aufgelistet. *Gene desert regions* auf dem humanen Chromosom 11 (NC\_000011) und dem Mauschromosom 7 (NC\_000073) dienten als Kontroll-Loci.

Tab. 17: Chip-Primer in Leserichtung von 5'- zu 3'-Ende

Gen	Nr.		Spezies	Ensembl ID	Sequenz
HoxB9	3372	F	murin	NC_000077	ATTACGCGTGAAAAGGTGGCACA
	3371	R			CGGACC
HoxB9	3371	R		NC_000077	AGCGGTACCTATGTCCGAGCTGA
					CGCTTT
HoxB9	4210	F	murin	NC_000077	TTATGTCCGAGCTGACGCTT
	4211	R			ACAAAGTACAGTGGAGCAGCC
Chip negativ	2623	F	murin	NC_000073	AGGTGTCAGTAATGCGGCAC
	2624	R			TGGGTGGAGGCTTTTGGTAA
Chip negativ	2641	F	murin	NC_000072	GGAAACTTTCTTGGTCGGCT
	2642	R			CAGTAGGAGACAACCGGGAT
HoxB9	3312	F	human	NC_000017	TTGCAAGGAGAGCTGAGACG
	3313	R			AGACATTATCCGGGCGCTTG
HoxB9	3314	F	human	NC_000017	AGGGCTCTACAGCCTGCG
	3315	R			CCGCACTCCATATCGAGGAT
Chip negativ	2627	F	human	NC_000011	ACAGTAAGGCCCAACTGC
	2628	R			AACCGGCCAGGCAATAACTG

### 2.3.11 RNA *in-situ*-Hybridisierung (RNA-ISH) mittels RNAscope® Technologie

Für die RNA-ISH mittels RNAscope® wurden die Nierenanlagen von Mausembryonen (E14.5) terminiert verpaarter C57BL/6J-Mäuse verwendet. Das entnommene Gewebe wurde in ROTI Histofix 10% fixiert, anschließend über eine aufsteigende Ethanol-Reihe beginnend bei 70% in Zehnerschritten mit einer Dauer von jeweils 30 Minuten sowie mit Isopropanol entwässert. Daraufhin wurden die Organe in Paraffin eingebettet, 1,5 µm breite Gewebeschnitte angefertigt und die Objektträger bei -80°C gelagert.

Mit Hilfe der RNA-ISH und dem Einsatz speziell angefertigter, komplementärer Sonden kann die Ziel-mRNA-Expression in Geweben nachgewiesen werden. Für die fluoreszierende Färbung wurde das RNAscope Multiplex Fluorescent Reagent Kit v2 gemäß des Herstellerprotokolls verwendet (138). Zu Beginn wurden die Objektträger eine

Stunde lang bei 60°C im HybEZ Ofen (Advanced Cell Diagnostics) getrocknet und mit Hilfe von Xylene-Ersatz (Neo-Clear) und anschließend Ethanol (100%) entparaffiniert. Um die spätere Hintergrundfärbung zu reduzieren, wurde die auf den Schnitten vorhandene endogene Peroxidase mit dem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Reagenz geblockt. Anschließend wurde das Gewebe mit Hilfe des Target Retrieval Reagenz für den späteren Einsatz der Sonden permeabilisiert und mit dem Protease Plus Reagenz behandelt. Im nächsten Schritt erfolgte die Hybridisierung der Sonden, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden (Tabelle 18). Durch die anschließende, in drei Teilabschnitten ablaufende Amplifikation wurde das Sonden-Signal verstärkt. Zwischen den drei Teilabschnitten wurde das Gewebe jeweils mit einem Waschpuffer gewaschen. Abschließend erfolgte eine HRP-Markierung in ebenfalls drei Schritten C1-3, ehe die Färbung am Fluoreszenzmikroskop Eclipse Ti-2 mit der DS-Ri2 Kamera (beides Nikon) aufgenommen wurde. Zur Gegenfärbung und Darstellung von DNA bzw. Zellkernen wurde ein Tropfen DAPI (Thermo Fischer Scientific) pro Schnitt eingesetzt, 30 Sekunden inkubiert und abschließend eingedeckelt. Zum Eindeckeln wurde das Vectashield® Antifade Mounting Medium (Vector Laboratories) verwendet.

Tab. 18: RNAscope-Sonden

Bezeichnung	Spezies	Konjugation	Hersteller	Katalognummer
<i>HoxB9</i>	Maus	C1	ACD	452821
<i>Wt1</i>	Maus	C2	ACD	432711-C2

### 2.3.12 CRISPR/Cas 9 Knockout von *Wt1* in M15-Zellen

Das CRISPR/Cas 9 („clustered regularly interspaced short palindromic repeats“ und „CRISPR associated protein 9“) System wurde verwendet, um einen *Wt1*-Knockout in M15-Zellen durchzuführen (139). Mit Hilfe der Technologie können an ausgewählten Stellen im Genom DNA-Doppelstrangbrüche erzeugt werden, die wiederum DNA-Reparatur-Mechanismen (wie z.B. nicht-homologe Endverknüpfung (NHEJ)) aktivieren und in Deletionen oder Insertionen resultieren können (140, 141). Mit Ausnahme der Deletionen/ Insertionen, die aus einem Vielfachen von 3 Nukleotiden – für einen Aminosäure kodierend – bestehen, kommt es in der Regel zu einer Verschiebung des Leserasters (Frameshift Mutation). Dies kann im vorzeitigen Einbau eines Stoppcodons resultieren. Liegt die Mutation in der Nähe des Transkriptionstarts, ist das translatierte Protein häufig funktionslos und der Knockout erfolgreich.

Die CRISPR-Technologie, welche zum Beispiel in Bakterien als Abwehrmechanismus gegenüber eindringenden Nukleinsäuren fungiert, erfordert u.a. das Vorhandensein bestimmter variabler und repetitiver Sequenzen sowie einer zur Prozessierung unerlässlichen transactivating RNA (142-144). Diese Anteile konnten zu einer single guide RNA (sgRNA) verbunden werden, die in der Nähe einer PAM-Sequenz 5'-NGG zum Schneiden der Ziel-DNA-Sequenz durch die Cas9-Nuklease führt (141).

Zu Beginn wurde mit Hilfe einer CRISPRdirect-Software jeweils eine spezifische single guide RNA für das *Wt1*-Gen (5'-TTCAAACACGAGGACCCCATGGG-3') entworfen (145). Mit Hilfe von Oligonukleotiden (Tabelle 19) wurden jene Sequenzen in das CRISPR/Cas9-GFP Plasmid pSpCas9 (BB)-2A-GFP (PX458; Addgene plasmid #48138) kloniert (146).

Tab. 19: CRISPR/Cas 9 Oligonukleotide für die sgRNA

<b>Bezeichnung</b>	<b>Spezies</b>	<b>Sequenz</b>
Wt1-gRNA-F2	murin	CACCGTTCAAACACGAGGACCCCAT
Wt1-gRNA-R2	murin	AAACATGGGGTCCTCGTGTTTCAAC

Dafür wurde das Plasmid mit dem Restriktionsenzym Bpi I FD (Thermo Fischer) linearisiert und mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Analog zu den Erläuterungen aus Kap. 2.3.7 wurde eine Gelelektrophorese mit DNA-Aufreinigung durchgeführt, gefolgt von einem Annealing der Oligonukleotide, die im Anschluss in das linearisierte und dephosphorylierte Plasmid ligiert wurden. In One Shot™ TOP10 Chemically Competent *E. coli* (Thermo Fischer Scientific) wurde das Plasmid vervielfältigt und anschließend mit dem PureYield Plasmid Miniprep System aufgereinigt.

Die M15-Zellen wurden in 6 cm Schalen ab einer Konfluenz von ca. 50% mit dem *Wt1* CRISPR/Cas9-GFP Plasmid sowie einer jeweiligen Leervektor-Kontrolle transfiziert. Bei ausreichender Transfektionseffizienz, die mit Hilfe des GFP-Signals unter dem Fluoreszenzmikroskop zu beurteilen war, wurden einzelne Zellen mittels Durchflusszytometrie (Charité/ BIH Cytometry Core Facility) isoliert und auf 96-Well-Zellkulturplatten verteilt. Die Zellklone wurden hochgezogen, bis bei geeigneter Koloniegröße genomische DNA und Protein gewonnen werden konnte. Die Regionen mit den zu erwarteten Mutationen im *Wt1*-Gen wurden mit Hilfe einer qRT-PCR amplifiziert und durch DNA-Sequenzierung (Eurofins Genomics) verifiziert. Basierend auf den Sequenzierungsergebnissen konnte eine Aussage zu einem homo- bzw. heterozygoten

Knockout getroffen werden. Der Knockout wurde durch den Verlust der betreffenden Proteine mittels Western Blot (siehe Kap. 2.3.5) überprüft.

### 2.3.13 Hemmung der DNA- und Histonmethylierung in Zellen

Die Inhibitoren, die zur Hemmung der DNA- und Histonmethylierung eingesetzt wurden, sind Tabelle 20 zu entnehmen. GSK 126 und Tazemetostat wurden zu Beginn jeweils in DMSO gelöst. Anschließend wurde mit Hilfe einer Konzentrationsreihe die optimale Menge an Inhibitor ermittelt, bei der sich die Abnahme der Histonmethylierung von H3K27me3 bei gleichzeitig noch erhaltener Zellproliferation die Waage hielt.

Tab. 20: Methylierungsinhibitoren

<b>Bezeichnung</b>	<b>Inhibition</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Bestellnummer</b>
GSK126	Selektive EZH2 Inhibition	Cayman Chemical	15415
Tazemetostat (EPZ-6438)	Selektive EZH2 Inhibition	Biozol	S7128

Dabei wurde dem Medium der M15-Zellen für 48 bis 72 Stunden der jeweilige Inhibitor hinzugegeben, während DMSO als Negativkontrolle fungierte. Für Tazemetostat wurde eine optimale Menge von 40  $\mu$ M ermittelt, GSK 126 lag bei 20  $\mu$ M.

## 2.4 Statistische Auswertung

Zur Ermittlung statistisch signifikanter Unterschiede zwischen zwei Stichproben wurde im Rahmen dieser Arbeit der zweiseitige t-Test (gepaarte und ungepaart) sowie eine Varianzanalyse (ANOVA) mit dem Tukey Post-hoc-Test durchgeführt. P-Werte unter 0,05 wurden dabei als statistisch signifikant erachtet.

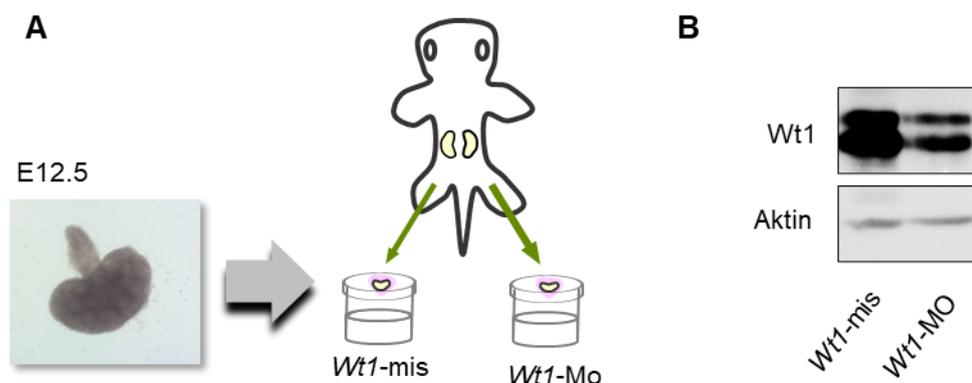
Die Werte werden als arithmetisches Mittel  $\pm$  SEM oder SD dargestellt. In den Diagrammen sind stets die Mittelwerte zusammen mit der Standardabweichung als Fehlerbalken visualisiert.

Zur Verfassung der Dissertation wurde das Textprogramm Microsoft Word 2016 verwendet. Die Datenanalyse und graphische Darstellung erfolgte mittels GraphPad Prism 5.01, Microsoft Excel 2016 und Microsoft Power Point 2016. Die Literaturdatenbank wurde mithilfe des Programms Endnote X9 erstellt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Identifizierung potenzieller neuer WT1-Zielgene in der Nierenentwicklung

WT1 wird stark in embryonalen Nieren sowie Gonaden exprimiert und mehrere Studien zeigen, dass WT1 essenziell für die normale Urogenitalentwicklung ist (42, 147). Durch die Identifizierung von WT1-Zielgenen können somit Signalwege, die für die Nierenentwicklung relevant sind, analysiert werden. Da Mäuse mit homozygotem Keimbahn-Knockout von *Wt1* embryonal letal sind und keine Nieren ausbilden (42), sind alternative Methoden erforderlich, um das WT1-abhängige Genexpressionsnetzwerk zu erforschen. Durch die Kombination aus *Vivo*-Morpholino induziertem *Wt1*-Knockdown in embryonalen Nierenorgankulturen und Next Generation Sequencing (NGS) wurde eine neue Strategie etabliert, um WT1-abhängig exprimierte Gene in der Nierenentwicklung zu identifizieren. Hierzu wurden die Nierenanlagen aus Mausembryonen zum Entwicklungszeitpunkt E12.5 entnommen und 72 Stunden lang entweder mit einem *Wt1* antisense- oder mismatch-Morpholino *ex vivo* kultiviert. Aus den gepoolten Nierenanlagen wurden Gesamt-RNA und Protein isoliert. Die Kontrolle des *Wt1*-Knockdowns erfolgte mittels Western Blot (Abb. 6).

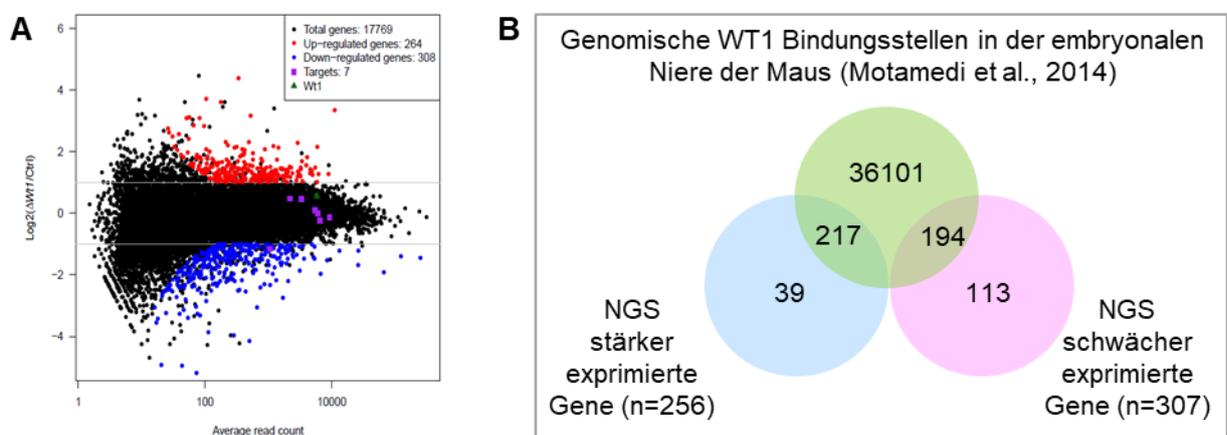


**Abb. 6: *Vivo*-Morpholino induzierter *Wt1*-Knockdown in Nierenorgankulturen**

(A) Die Nierenanlagen wurden aus Mausembryonen (E12.5) entnommen und in Tröpfchenkulturen mit Nährmedium für 72 Stunden inkubiert. Eine Niere wurde mit einem spezifischen antisense *Vivo*-Morpholino transfiziert (*Wt1*-Mo), während die kontralaterale Niere jedes Embryos zur Kontrolle mit einem *Vivo*-Morpholino ohne eine bekannte Zielsequenz im Mausgenom (*Wt1*-mis) behandelt wurde. (B) Der *Wt1*-Knockdown wurde mittels Western Blot überprüft.

Die Nephronbildung in den Organkulturen wurde täglich unter dem Durchlichtmikroskop betrachtet. In Übereinstimmung mit bereits veröffentlichten Daten (124) bewirkte der

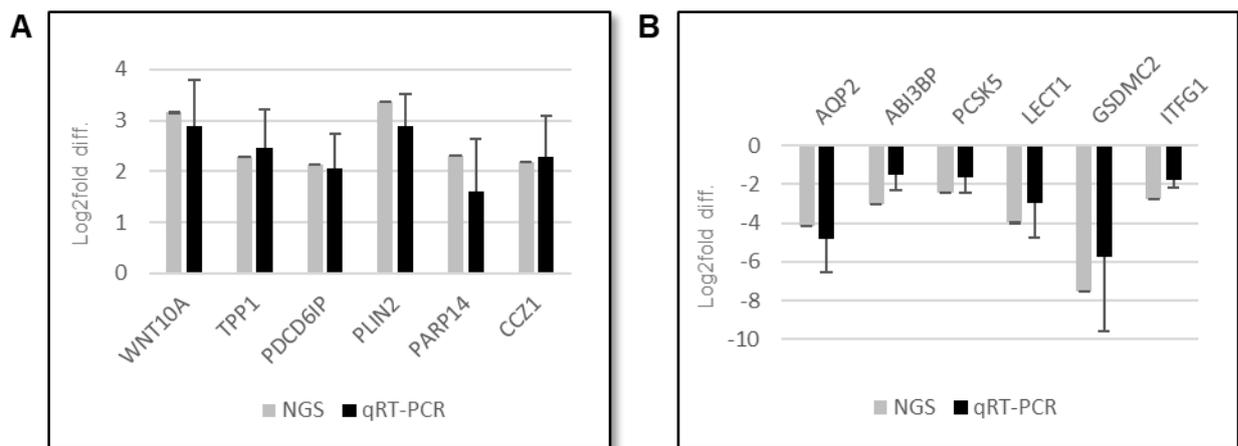
Knockdown von WT1 eine deutliche Hemmung des verzweigenden Ureterwachstums. Dies bestätigt die essenzielle Rolle von WT1 im Rahmen der Nierenentwicklung. Basierend auf den gewonnenen RNA-Proben wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Wei Chen (Max-Delbrück-Centrum Berlin) Tiefensequenzierungen durchgeführt und durch Dr. Qingsong Gao ein Next Generation Sequencing (NGS) Datensatz erstellt. Die Analyse hinsichtlich differenziell exprimierter Gene zeigte eine Reduktion von 307 und eine Erhöhung von 256 mRNAs nach *Wt1*-Knockdown in den Nierenorgankulturen. In Übereinstimmung mit vorherigen Publikationen weist dies darauf hin, dass der Effekt von WT1 auf seine Zielgene sowohl aktivierend als auch reprimierend sein kann (zusammengefasst von (3)). Basierend auf den Expressionsdaten ist allerdings eine Unterscheidung zwischen direkten transkriptionellen Effekten von WT1 und indirekten Wirkungen, zum Beispiel über parakrine Mechanismen, nicht möglich. Um potenzielle direkte WT1-Zielgene zu ermitteln, wurden deshalb die eigenen Sequenzierdaten mit den Ergebnissen von Motamedi et al., 2014 abgeglichen (51). Diese haben genomische WT1-Bindungsstellen in murinen embryonalen Nieren mittels ChIP-Sequenzierung identifiziert. Für 217 der herunter- und für 194 der hochregulierten Gene ergaben sich prognostizierte genomische WT1-Bindungsstellen (Abb. 7).



**Abb. 7: Analyse differenziell exprimierter Gene im NGS-Datensatz**

(A) Die RNA-Tiefensequenzierung erfolgte in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Wei Chen (Max-Delbrück-Centrum), den NGS-Datensatz hat Herr Dr. Qingsong Gao erstellt. Als Auswertungskriterien wurden eine Verdopplung der Readcounts (Log<sub>2</sub>fold change von >1 bzw. (-1)) sowie eine statistische Signifikanz bei einem p-Wert < 0,05 angesetzt. Die Abbildung wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Wei Chen zur Verfügung gestellt. (B) Der *Vivo*-Morpholino Knockdown von WT1 reduzierte 307 und erhöhte 256 mRNAs in Nierenorgankulturen. Die differenziell exprimierten Gene wurden im Rahmen der Datenanalyse mit einem ChIP-Sequenzierungsdatensatz von WT1-Bindungsregionen der embryonalen Niere (51) abgeglichen. Die kleinen Abweichungen der jeweiligen Genanzahl der beiden Abbildungen erklären sich durch anfängliche Doppelnennung einzelner Transkripte.

Neben einigen, bereits in der Literatur als WT1-abhängig beschriebenen Genen wie z.B. den Insulinrezeptor (36) oder Dickkopf-related protein 2 (*DKK2*) (148), zeigte sich eine große Anzahl an potenziellen neuen Zielgenen. Die Validierung der Sequenziererergebnisse erfolgte mittels qRT-PCR von zufällig ausgewählten Transkripten. Die Genexpressionsdaten des NGS-Datensatzes zeigten ausnahmslos eine enge Korrelation mit den durch qRT-PCR ermittelten Werten (Abb. 8).



**Abb. 8: Stichprobenartige Validierung der Sequenziererergebnisse mittels qRT-PCR**

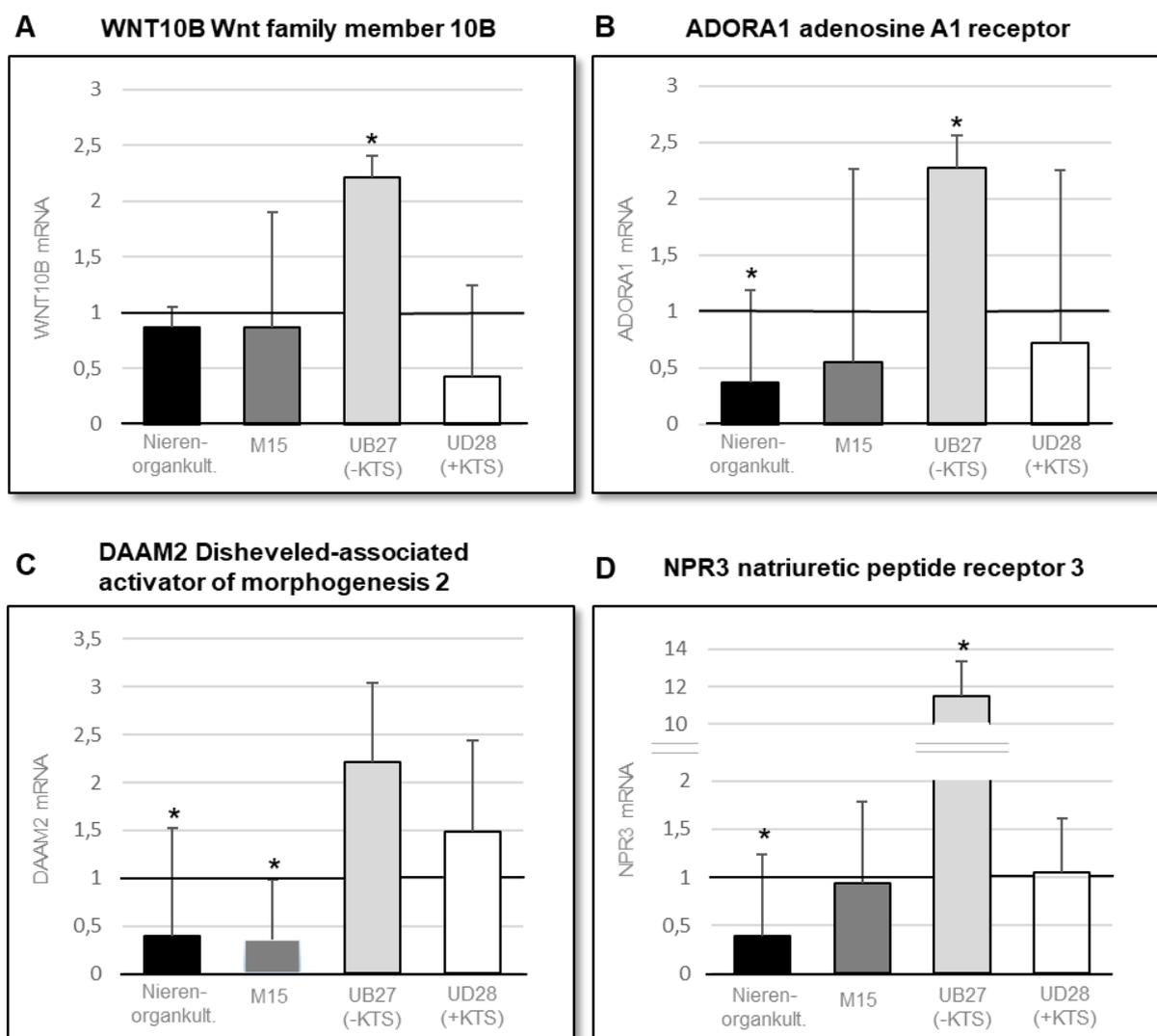
Rein zufällig ausgewählte, nach *Wt1*-Knockdown hoch- (A) bzw. herunterregulierten (B) Transkripte in logarithmischer Darstellung nach NGS und qRT-PCR. Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SD, alle  $n=4$  mit Ausnahme von Aqp2, Parp14, Gsdmc2 und Lect1 mit  $n=6$ .

### 3.2 Analyse potenzieller WT1-Zielgene in verschiedenen Zelllinien auf mRNA-Niveau und Promotorebene

Nach genomweiter Analyse der WT1-abhängigen Genexpression in der embryonalen Niere wurden einzelne Kandidatengene ausgewählt, die möglicherweise direkt durch WT1 reguliert werden. Es wurde der Versuch unternommen, die Ergebnisse aus dem komplexen organischen System, den Nierenorgankulturen, auf ein Zellkulturmodell zu übertragen.

Die WT1-Top-Kandidatengene wurden anhand bestimmter Kriterien wie der bekannten Expression in der embryonalen bzw. adulten Niere, einem möglichen funktionellen Zusammenhang mit WT1 sowie fakultativ dem Vorkommen in bereits publizierten, genomweiten Sequenzierdatensätzen ausgewählt (129, 149, 150). Die WT1-abhängigen mRNAs der Gene *Wnt10b*, *Adora1*, *Daam2* und *Npr3* wurden durch quantitative RT-PCR in drei verschiedenen Zelllinien gemessen. Hierfür wurden M15-Zellen, die sich von der

Urniere der Maus ableiten sowie die humanen UB27-/ UD28-Zellen, die von einer Osteosarkomzelllinien (U2OS) abstammen, verwendet. In den M15-Zellen wurde die *Wt1*-Expression mittels siRNA inhibiert. Die UB27-/ UD28-Zellen bilden endogen kein WT1. Sie sind jedoch so modifiziert, dass durch Inkubation mit tetrazyklinfreiem Medium entweder die WT1(-KTS)- (UB27) oder die WT1(+KTS)-Isoform (UD28) überexprimiert wird (35). Alle ausgewählten Kandidatenzielgene weisen eine zellabhängig ausgeprägte Stimulation durch WT1 auf (Abb. 9).

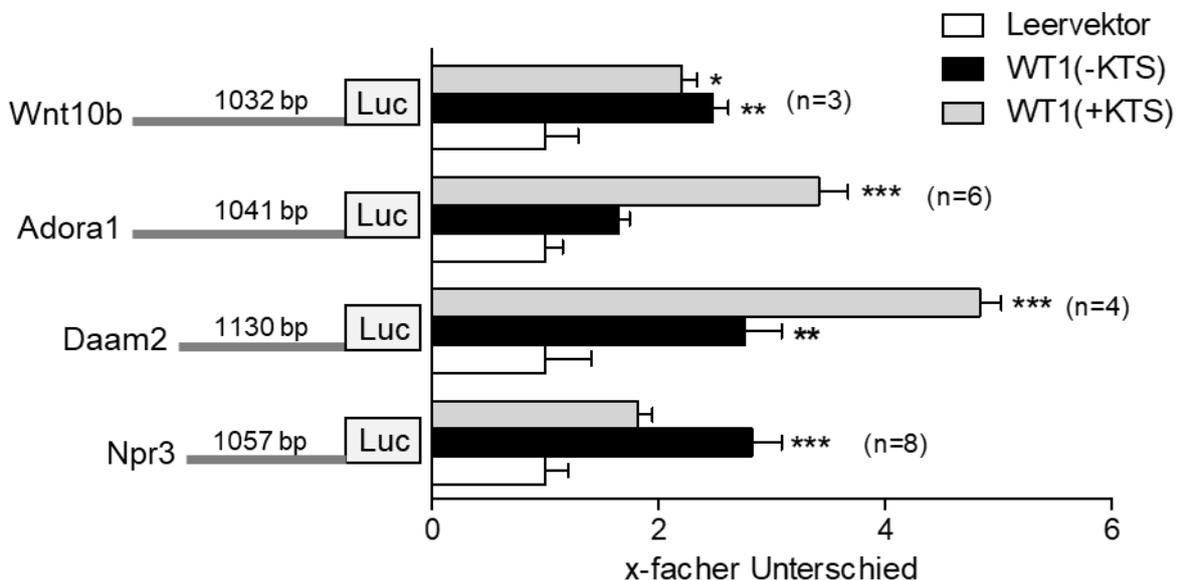


**Abb. 9: mRNA-Expressionsanalyse der Top-WT1-Kandidatenzielgene in Nierenorgankulturen, M15- und UB27-/ UD28-Zellen**

In den Nierenorgankulturen und den M15-Zellen wurde ein *Wt1*-Knockdown durchgeführt, wohingegen in den UB27-/ UD28-Zellen die Überexpression der WT1(-KTS)- bzw. WT1(+KTS)-Variante erfolgte (s. Abb. 11). Die WT1-abhängigen mRNAs der potenziellen Zielgene *Wnt10b* (A), *Adora1* (B), *Daam2* (C) und *Npr3* (D) wurden mittels quantitativer RT-PCR gemessen. Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SD, Nierenorgankulturen alle n=7 mit Ausnahme von *Wnt10b* mit n=4, M15-Zellen alle n=4 mit Ausnahme von *Wnt10b* mit n=6; UB27-Zellen alle n=3 mit Ausnahme von *Npr3* mit n=4, UD28-Zellen alle n=3; \*p<0.05, jeweils gepaarter t-Test.

Die mRNAs dieser Gene wurden in den M15-Zellen durch *Wt1*-Knockdown reduziert und nahmen in den UB27-Zellen bei WT1(-KTS)-Überexpression zu. Die Ergebnisse der UD28-Zellen, die eine induzierbare WT1(+KTS)-Isoform exprimieren, fielen dagegen nicht signifikant aus (Abb. 9).

Um einen möglichen Effekt von WT1 auf die Promotoren der ausgewählten Gene zu untersuchen, erfolgten im Anschluss Kotransfektionsexperimente mit verschiedenen Reporterkonstrukten und *Wt1*-Expressionsplasmiden in U2OS-Zellen. Die Länge der Promotorsequenzen lag bei ca. 1000 Basenpaaren (bp). Die Reporterkonstrukte wurden entweder mit einem Leervektor oder einer WT1-Isoformvariante kotransfiziert und die Luciferase-Aktivitäten bestimmt. Mit Hilfe der Reporterassays (Abb. 10) konnte nachgewiesen werden, dass die Promotoren der Gene *Wnt10b*, *Adora1*, *Daam2* und *Npr3* statistisch signifikant durch WT1 stimuliert werden. Dabei zeigte sich für die Gene *Wnt10b* und *Npr3* ein vor allem über die WT1(-KTS)-Variante vermittelter Effekt, wohingegen die WT1(+KTS) Variante die Promotoren von *Adora1* und *Daam2* signifikant stimulierte (Abb. 10). In Übereinstimmung mit den mRNA-Expressionsdaten scheint WT1 die Transkription aller untersuchten Gene zu aktivieren.



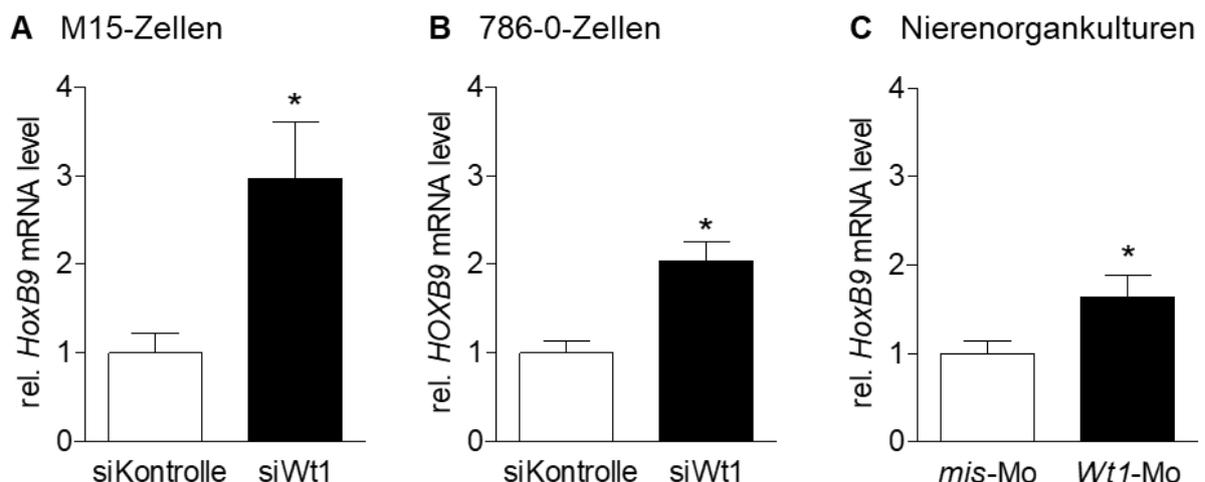
**Abb. 10: Reporterassays der Top-WT1-Kandidatenzielgene in U2OS-Zellen**

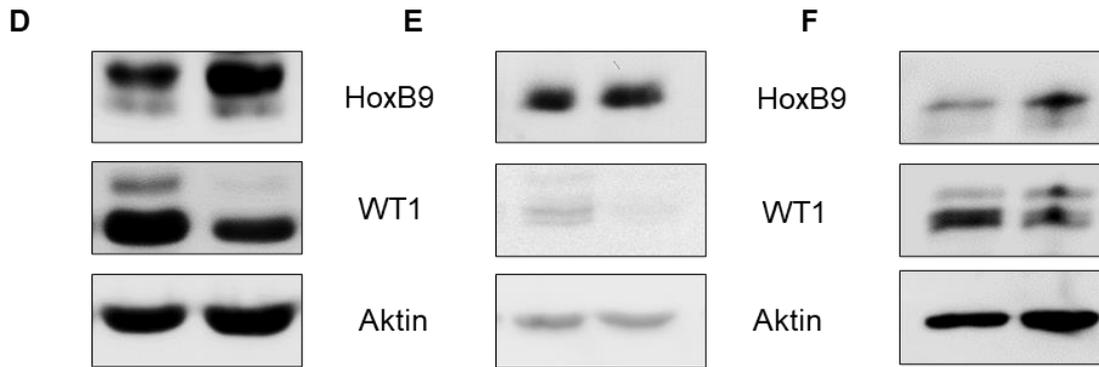
Promotorkonstrukte der jeweiligen Zielgene *Wnt10b*, *Adora1*, *Daam2* und *Npr3* wurden sowohl mit *Wt1*-Expressionsplasmiden als auch dem Kontrollvektor in U2OS-Zellen kotransfiziert und die resultierende Luciferase-Aktivität gemessen. Eine signifikante Zunahme der Luciferase-Aktivität durch Kotransfektion von WT1(-KTS) bzw. WT1(+KTS) konnte bei allen Genen detektiert werden. Werte sind Mittelwerte $\pm$ SEM, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,0001$ ), ANOVA mit Tukey-Post-hoc-Test.

### 3.3 WT1-abhängige Transkription von *HoxB9* in verschiedenen Zelllinien

In Ergänzung zu den in Kapitel 3.2 untersuchten potenziellen Zielgenen, die durch WT1 stimuliert werden, wurde ein weiteres, durch WT1 in der embryonalen Niere reprimiertes Gen anhand der bereits in Kapitel 3.2 beschriebenen Kriterien zur tiefergehenden Charakterisierung als neues WT1-Zielgen ausgewählt. Das Homöobox-Protein HoxB9 ist als solches bisher nicht bekannt. Es wird ähnlich wie WT1 in der embryonalen Niere exprimiert (151) und genomweite Analysen zeigen u.a. mittels ChIP-Sequenzierungen, dass WT1 in der Promotorregion des *HoxB9*-Gens bindet (51, 129, 149, 150). Zudem erwies sich *HoxB9* bei einem *Wt1*-Knockdown in M15-Zellen als differenziell exprimiertes Gen (2).

Basierend auf diesen Ergebnissen erfolgte zu Beginn eine umfassende WT1-abhängige Genexpressionsanalyse von *HoxB9* in verschiedenen Zelllinien. Die Sequenzierungsergebnisse der Nierenorgankulturen wurden mittels qRT-PCR validiert. Darüber hinaus wurde in den murinen M15-Zellen und in den humanen, vom klarzelligen Nierenkarzinom abstammenden 786-0-Zellen einen *WT1*-Knockdown durch siRNA-Transfektion durchgeführt. Der Knockdown von *WT1* wurde mittels Western Blot nachgewiesen (Abb. 11) und resultierte in einer Zunahme der *HoxB9* mRNA in beiden Zelllinien. Neben der mRNA wurden HOXB9 und WT1 auch auf Proteinebene mittels Western Blot bestimmt. Vor allem in den M15-Zellen verursachte der *Wt1*-Knockdown eine Zunahme des HoxB9-Proteins. (Abb. 11).

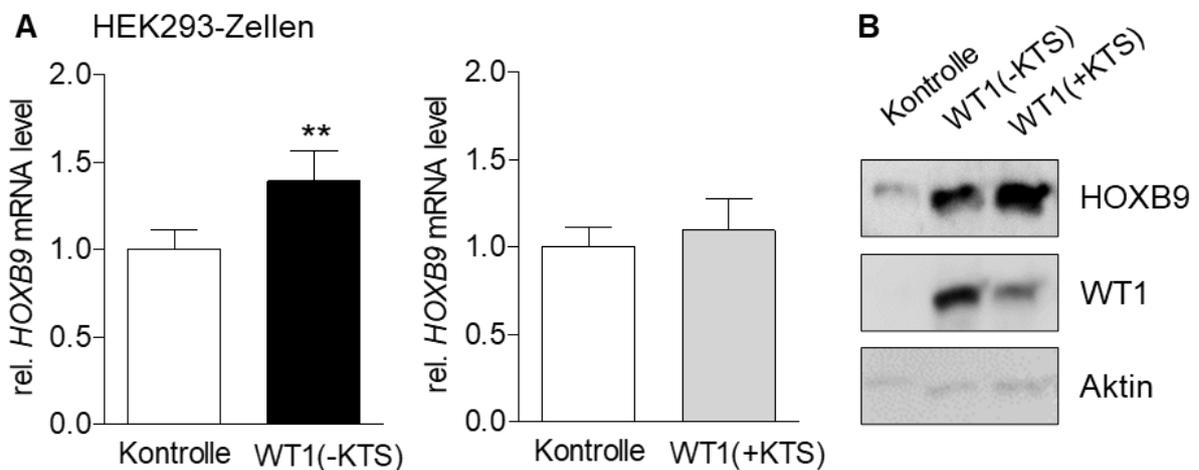




**Abb. 11: WT1-abhängige HoxB9-Expression in M15-, 786-0-Zellen und Nierenorgankulturen**

mRNA-Expressionsanalyse der WT1-abhängigen *HoxB9*-Expression in M15- (A), 786-0-Zellen (B) und *ex vivo* kultivierten Nierenorgankulturen (C). Die zugehörigen HOXB9-, WT1- und Aktin-Proteine wurden im Western Blot nachgewiesen (D-F). Ein Knockdown von WT1 in den M15- und 786-0-Zellen (*siWt1*) sowie in den Nierenorgankulturen (*Wt1-Mo*) führt zu einer signifikanten Zunahme der *HoxB9*-mRNA. Eine Zunahme von HOXB9-Protein zeigt sich vor allem in den M15-Zellen (D). Werte sind Mittelwerte $\pm$ SEM, n=5 (A), n=6 (B), n=5 (C) \* $p$ <0.05, gepaarter t-Test.

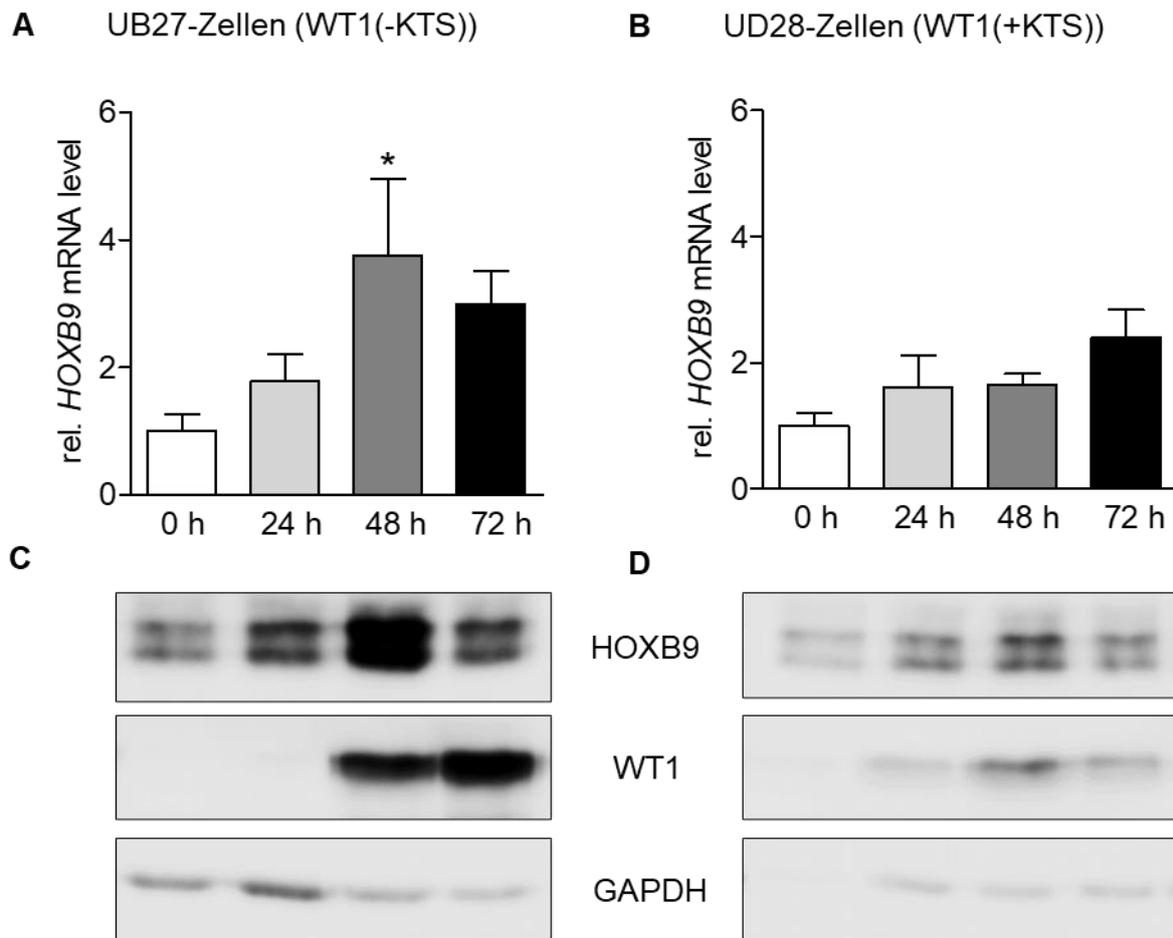
Zusätzlich zu diesen WT1-Knockdown-Experimenten erfolgte eine Überexpression der WT1(-KTS)- und WT1(+KTS)-Isoformen in humanen embryonalen Nierenzellen (HEK293). Eine Überexpression von WT1(-KTS), die im Western Blot nachgewiesen wurde, verursachte eine signifikante Zunahme von *HoxB9* mRNA und Protein (Abb. 12).



**Abb. 12: WT1-abhängige HoxB9-Expression in HEK293-Zellen**

WT1-abhängige *HoxB9* mRNA-Expression in HEK293-Zellen (A). Die Überexpression der WT1(-KTS)-Isoform führt zu einer signifikanten Zunahme der *HoxB9* mRNA. Analog dazu kann eine Zunahme von HOXB9-Protein mittels Western Blot nachgewiesen werden (B). Werte sind Mittelwerte $\pm$ SEM, n=8, \*\* $p$ <0.01, gepaarter t-Test.

Thematisch daran anknüpfend wurde der Effekt von WT1 auf die *HoxB9*-Expression in den humanen, vom Osteosarkom abgeleiteten UB27-/UD28-Zellen untersucht (35). Sowohl die Induktion der WT1(-KTS)- als auch der WT1(+KTS)-Variante verursachte einen Anstieg der *HoxB9*-mRNA, der mit der WT1(-KTS)-Variante nach 48 Stunden statistisch signifikant war (Abb. 13). Auch auf Proteinebene konnte der Anstieg von HOXB9-Protein nach WT1-Induktion nachgewiesen werden (Abb. 13).



**Abb. 13: WT1-abhängige *HoxB9*-Expression in UB27/UD28-Zellen**

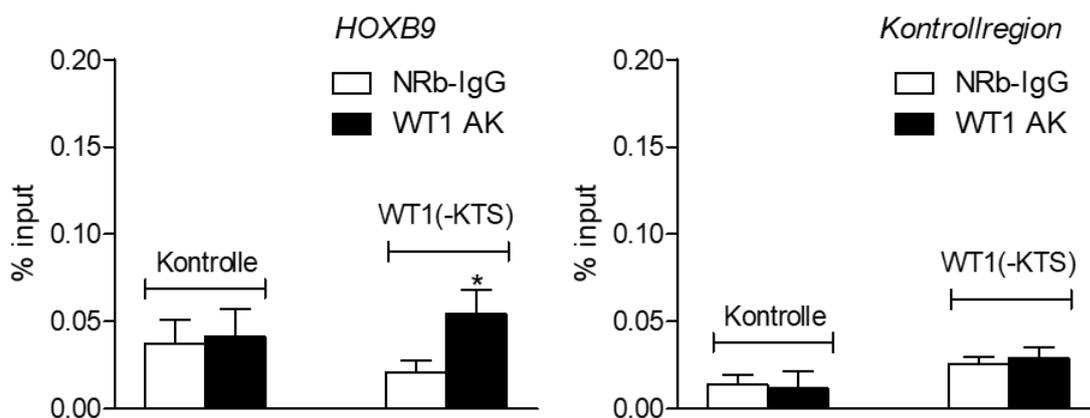
Die UB27- (A) und UD28-Zellen (B) exprimieren bei Inkubation mit tetrazylinfreiem Medium die WT1(-KTS)- bzw. WT1(+KTS)-Isoform. Die *HoxB9* mRNA-Expression wurde in den Zelllinien zu den angegebenen Zeitpunkten (0, 24, 48 und 72 Stunden nach Tetrazyklinentzug) mittels qRT-PCR bestimmt (A, B). Die zugehörigen HOXB9-, WT1- und GAPDH-Proteine wurden im Western Blot nachgewiesen (C, D). Nach 48 Stunden ohne Tetrazyklin zeigt sich in beiden Zelllinien eine deutliche Zunahme des WT1-Proteins und damit einhergehend eine Zunahme der *HoxB9*-mRNA und des HOXB9-Proteins. Der Effekt ist in den UB27-Zellen stärker ausgeprägt. Werte sind Mittelwerte $\pm$ SEM, n=5 (A) und n=3 (B), \*p<0.05, ANOVA mit Tukey-Post-hoc-Test.

### 3.4 WT1 bindet an den *HoxB9*-Promotor

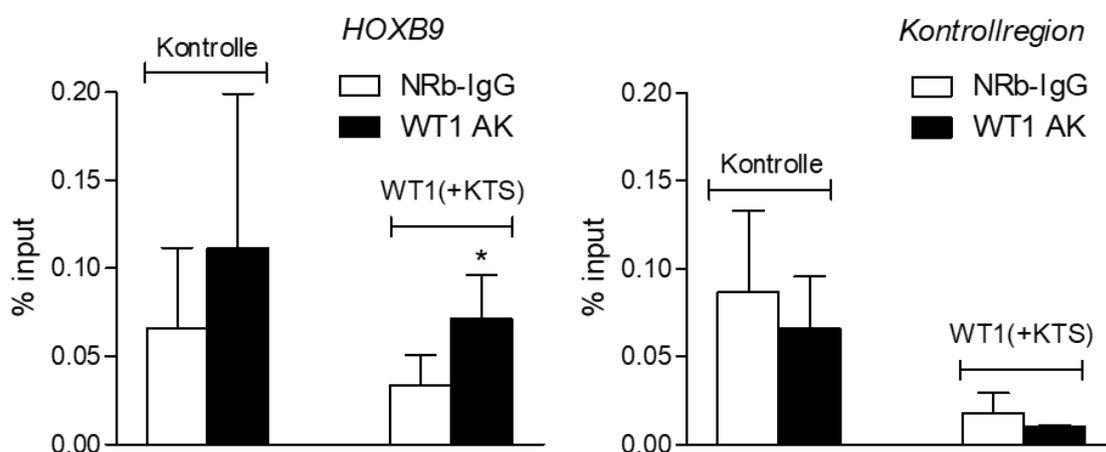
Um zu testen, ob WT1 an den *HoxB9*-Promotor in den Osteosarkom- sowie den

mesonephrischen M15-Zellen bindet, wurden ChIP-Assays durchgeführt. Dafür wurde Chromatin der nativen M15-Zellen sowie der UB27- und UD28-Zellen, die sowohl mit (nicht WT1 induziert) als auch ohne Tetrazyklin (WT1 induziert) behandelt wurden, gewonnen. Nach Aufbereitung, Scherung und Inkubation der Proben mit einem polyklonalen Kaninchenantikörper gegen WT1 wurde die immunpräzipitierte *HoxB9*-Promotor-DNA mittels qPCR quantifiziert und in Prozent der eingesetzten *HoxB9*-DNA-Menge dargestellt. Als Kontrolle wurde das Chromatin mit normalem Kaninchen IgG anstelle des WT1-Antikörpers inkubiert. Die Immunpräzipitation mit dem WT1-Antikörper reicherte die *HoxB9*-Promotor-DNA in den WT1(-KTS) bzw. WT1(+KTS) exprimierenden Zellen signifikant an (Abb. 14). In den nicht induzierten Zellen konnte kein signifikanter Anstieg gegenüber Kaninchen IgG beobachtet werden (Abb. 14). In den M15-Zellen, die WT1 endogen exprimieren, konnte ebenfalls eine statistisch signifikante Anreicherung der *HoxB9*-Promotor-DNA mit dem WT1-Antikörper detektiert werden (Abb. 14).

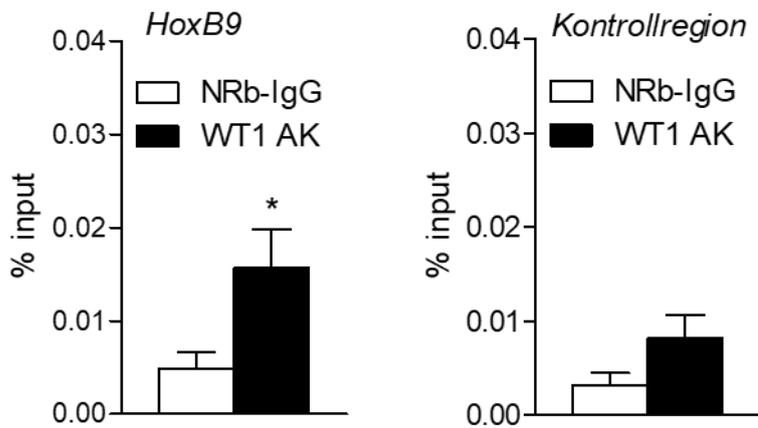
#### A UB27-Zellen



#### B UD28-Zellen



### C M15-Zellen



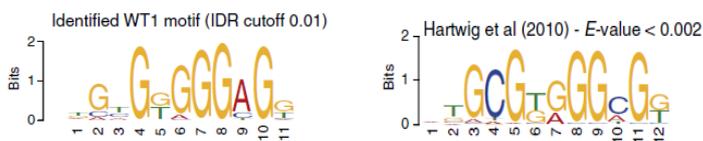
#### Abb. 14: WT1 bindet an den *HoxB9*-Promotor im Chromatin der UB27-/UD28- und M15-Zellen

ChIP-Assays des *HoxB9*-Promotors mit einem WT1-Antikörper (AK) in UB27- (A), UD28- (B) und M15-Zellen (C). Die mittels qPCR gemessenen DNA-Proben zeigen in allen drei Zelllinien eine statistisch signifikante Anreicherung des *HoxB9*-Promotors durch Immunpräzipitation mit WT1-Antikörper im Vergleich zu normalem Kaninchen IgG. Als Kontrolle wurde jeweils eine *Gene desert region* amplifiziert, die keine Anreicherung mit dem WT1-Antikörper erkennen lässt. Werte sind Mittelwerte $\pm$ SEM, UB27-Zellen Kontrolle n=5, UB27-Zellen WT1(-KTS) n=6, UD28-Zellen n=5, M15-Zellen n=7; \*p<0.05, gepaarter t-Test.

Für eine Region im menschlichen Genom, die keine kodierenden Gene enthält (Kontrollregion), ließ sich mit dem WT1-Antikörper keine Anreicherung nachweisen. Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass WT1 im Chromatin der untersuchten Zelllinien an den *HoxB9*-Promotor bindet.

### 3.5 Lokalisation von WT1-Bindungsstellen im *HoxB9*-Promotor

Frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass WT1 an eine GC-reiche Basenfolge bindet (Abb. 15).



#### Abb. 15: WT1-Bindungssequenzen

Abbildung aus Motamedi et al., 2014 mit Darstellung der identifizierten WT1-Bindungssequenzen (51, 129).

Basierend auf dieser Basenabfolge lassen sich mehrere potenzielle WT1-Bindungsstellen im *HoxB9*-Promotor lokalisieren (Abb. 16). Um zu überprüfen, ob es sich dabei tatsächlich um WT1-Bindungselemente handelt, wurden Elektromobilitäts-Shift-Assays (EMSAs) durchgeführt. Dafür wurden ca. 30 bp lange Oligonukleotide von den zu überprüfenden Sequenzen im *HoxB9*-Promotor als Auftragsleistung durch die Firma

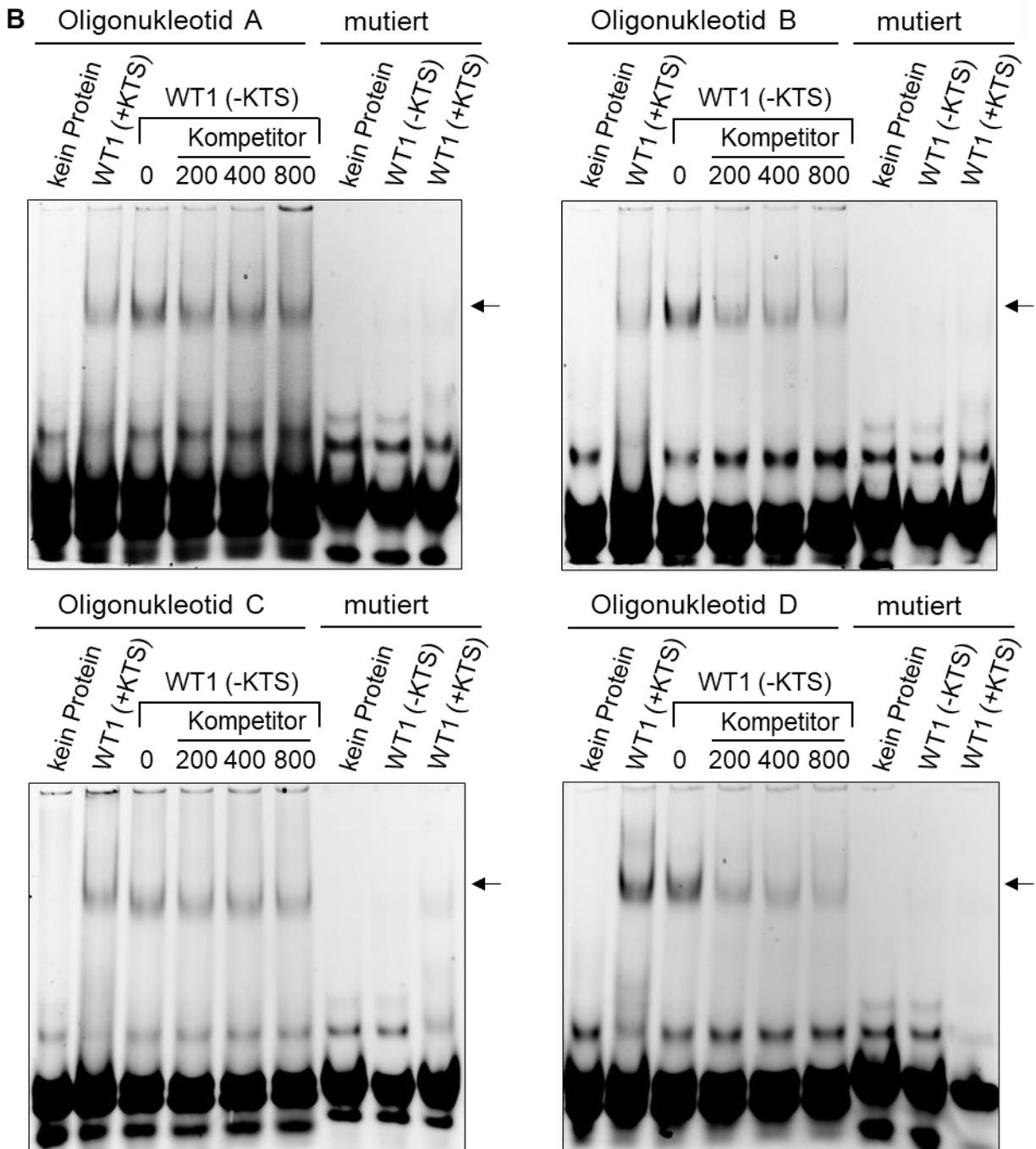
MWG Eurofins synthetisiert und am 5'-Ende mit dem Fluorophor Cy5 markiert. Die doppelsträngigen DNA-Oligonukleotide wurden mit den rekombinanten WT1(-KTS)- und WT1(+KTS)-Proteinisoformen inkubiert und anschließend auf ein nicht-denaturierendes Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Der im Falle einer Protein-DNA-Wechselwirkung entstehende hochmolekulare Komplex zeigt gegenüber ungebundenem Oligonukleotid eine geringere Laufgeschwindigkeit im Polyacrylamid-Gel, die sich in Form einer Retardationsbande (Shift) nachweisen lässt. Die DNA-Interaktion der WT1(-KTS)-Variante wurde mit einem unmarkierten Oligonukleotid einer zuvor identifizierten WT1-Bindungssequenz im Promotor des murinen *Ntrk2*-Gens kompetiert (44). Weiterhin wurden Oligonukleotide mit Punktmutationen in einzelnen Guaninbasen synthetisiert, um die Spezifität der WT1-Bindung zu überprüfen. In Abbildung 16 sind die EMSAs von vier Oligonukleotiden dargestellt, die eine Interaktion von WT1 mit dem proximalen *HoxB9*-Promotor nahe der Transkriptionsstartstelle erkennen lassen. Die Bindung der WT1(-KTS)-Variante an die jeweilige Sequenz kann durch die Kompetitor-DNA abgeschwächt, aber nicht vollständig aufgehoben werden, was auf eine starke Protein-DNA-Wechselwirkung hindeutet. Erst mit den eingefügten Mutationen wird die Bindung der WT1(-KTS)-Variante an die *HoxB9*-Promotorsequenz verhindert. Die nach Mutation von Oligonukleotid C verbleibende Restbindungsaktivität der WT1(+KTS)-Variante lässt sich mit der geringeren Bindungsspezifität dieser WT1-Isoform erklären (152). Zusammenfassend deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass mehrere WT1-Bindungsstellen innerhalb des proximalen *HoxB9*-Promotors existieren. Die geringe Abschwächung trotz Zugabe eines Kompetitors spricht für eine starke Bindung der WT1(-KTS)-Variante an die *HoxB9*-Promotor-DNA.

**A**

```

tggaggtgtggggggggggcgacaagactacctcctctttaattaccctgtcgggcctctcccgcagctctgaggctggggc
gctctccctccctgAatgctgtgtcctcccccccccaatctgcctggggagagggctcctcagcctgcgtccctctgagg
cagcccgtgcttgctccgcctcctccgccccatcgccccatgttgagaacccccctcctgtaaaagcgggagggg
cccgggcggccggcagctcaggctgaggttacgtggccgcccggagccctgacgtgatagcacattgcatcagcataaa
acaatccatcctggatggaatgcggtgaggacggatgacagcgcgBagcgcagccccctcggccgattgattatgtcg
gagctgacgctttatcaggcagtcgcgaaaactttgaccaatcattttgcaaggagctccgagccgggctgctccactgtact
ttgtggctgagaagttCgagcaggggggtgggggtgggaggggtgggggtctggggggggtcgcgtccgaaagDccctctgc
+1accgGGTCCGTGTGCCACCTTTTC

```



**Abb. 16: EMSAs verschiedener *HoxB9*-Promotorsequenzen mit rekombinantem WT1-Protein**

(A) In der Basensequenz des *HoxB9*-Promotors sind die verwendeten Oligonukleotide markiert. (B) Die doppelsträngigen DNA-Oligonukleotide wurden mit den beiden rekombinanten WT1-Proteinisoformen (+/-KTS) inkubiert. Die bei Bindung von WT1 an die *HoxB9*-Promotor-DNA entstehende Bande ist durch Pfeile markiert. Die Zugabe der bekannten WT1-Bindungssequenz von *Ntrk2* in einer aufsteigenden molaren Überschussreihe bewirkte eine Abschwächung der WT1(-KTS)-Bindung. Zudem wurden einzelne Basen in den verwendeten Oligonukleotiden mutiert, um die Spezifität der WT1-Bindung zu überprüfen. Als Vorlage diente die in Abb. 15 gezeigte WT1-Bindungssequenz.

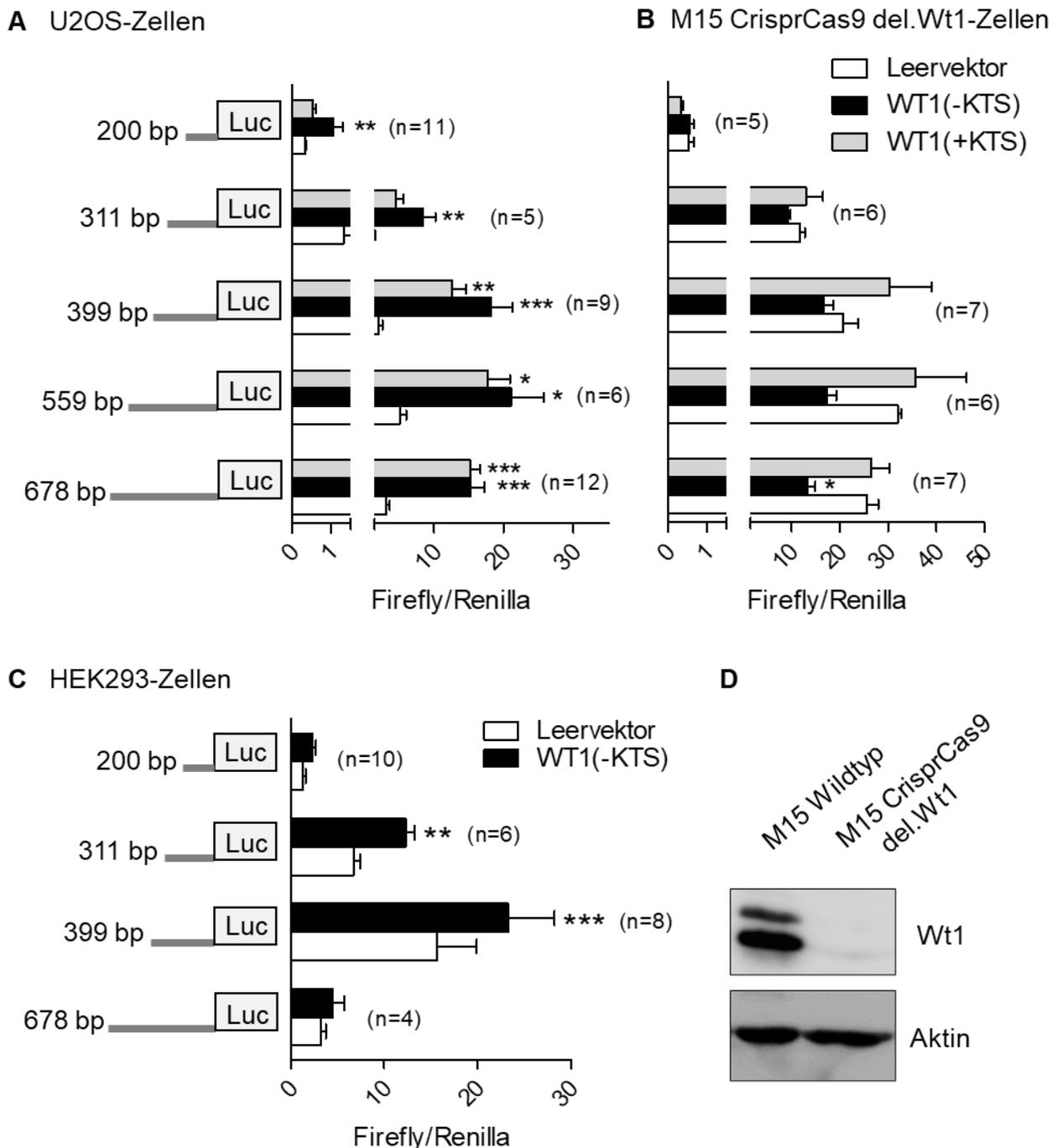
### 3.6 WT1 reguliert den *HoxB9*-Promotor zelltypspezifisch

Nachdem die WT1-abhängige mRNA- und Proteinexpression von *HoxB9* in verschiedenen Zelllinien analysiert und mit unterschiedlichen Methoden (ChIP, EMSA) die Bindung von WT1 an den *HoxB9*-Promotor nachgewiesen wurde, galt es nun mit Hilfe von Reporterassays zu untersuchen, ob WT1 den murinen *HoxB9*-Promotor reguliert. Dafür wurden Reporterkonstrukte des *HoxB9*-Promotors von unterschiedlicher Länge (200- 678 bp) hergestellt und mit *Wt1*-Expressionsplasmiden (+/-KTS-Isoform) sowie einem Renilla-Luciferase-Plasmid zur Normalisierung der Transfektionseffizienz in verschiedene Zelllinien (U2OS, HEK293, M15del.*Wt1*) transfiziert. Die endogene *Wt1*-Expression der M15-Zellen wurde zuvor mittels CrisprCas9-Technologie eliminiert (139) (Abb. 17D). Die basale *HoxB9*-Promotoraktivität war in den *Wt1*-defizienten M15-Zellen um ein Vielfaches höher als in den U2OS- und HEK293-Zellen (Abb. 17).

In Übereinstimmung mit den WT1-abhängigen *HoxB9*-mRNA-/ Proteindaten (Abb. 11A+D) führte die Transfektion der WT1(-KTS)-Variante in den M15del.*Wt1*-Zellen zu einer signifikanten Reduktion der Luciferase-Aktivität eines 678 bp langen Promotorfragments (Abb. 17B). Eine Repression konnte ebenfalls, wenn auch nicht signifikant, bei dem 559 bp langen Promotorkonstrukt beobachtet werden. Die *Wt1*(+KTS)-Variante sowie alle kürzeren *HoxB9*-Promotorfragmente zeigten keine signifikante Veränderung der Luciferase-Aktivität im Vergleich zum Kontrollvektor.

In den U2OS-und HEK293-Zellen konnte die basierend auf den *HoxB9* mRNA- und Proteindaten zu erwartende Stimulation des *HoxB9*-Promotors durch WT1 bestätigt werden (Abb. 17A+C). Die Kotransfektion jeweils beider WT1-Isoformen in U2OS-Zellen resultierte bei allen *HoxB9*-Promotorfragmenten in einer statistisch signifikanten Zunahme der Luciferase-Aktivität. Ausgehend von den mRNA-Daten der HEK293-Zellen, die eine Zunahme der *HoxB9*-mRNA lediglich nach Überexpression der WT1(-KTS)-Variante aufwiesen (Abb. 12A), wurden die Reporterassays in dieser Zelllinie nur mit dieser WT1-Isoform durchgeführt. Sowohl das *HoxB9*-Promotorkonstrukt mit einer Länge von 399 bp als auch das 311 bp lange Konstrukt wiesen eine statistisch signifikante Zunahme der Luciferase- Aktivität nach Kotransfektion von WT1(-KTS) auf.

In allen Zelllinien nahm die Grundaktivität des 200 bp langen Promotorkonstrukts im Vergleich zu den anderen Konstrukten deutlich ab. Diese Beobachtung deckt sich mit veröffentlichten Daten, wonach der *HoxB9*-Promotor eine Mindestlänge von 274 bp ab Transkriptionsstart aufweist (153, 154).



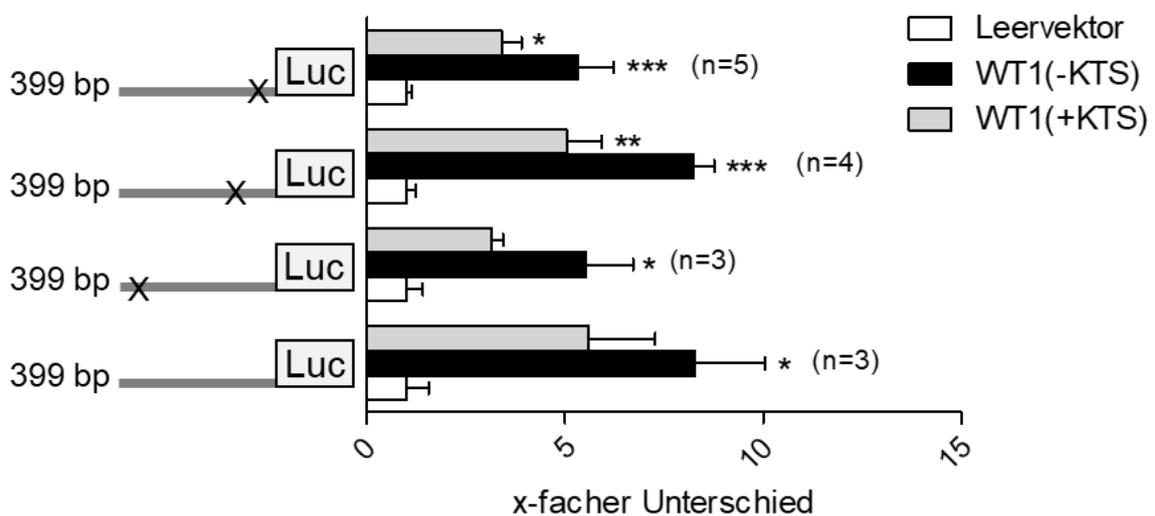
**Abb. 17: Reporterassays mit *HoxB9*-Konstrukten in U2OS-, M15del.Wt1- und HEK293-Zellen**  
*HoxB9*-Promotorkonstrukte unterschiedlicher Länge wurden entweder mit Leervektor oder einem *Wt1*-Expressionsplasmid (+/-KTS) in U2OS- (A), M15del.Wt1- (B) oder HEK293-Zellen (C) kotransfiziert und nach 48 Stunden die Luciferase-Aktivitäten gemessen. Eine signifikante Zunahme der Luciferase-Aktivitäten zeigte sich bei allen *HoxB9*-Konstrukten in den U2OS-Zellen (A) und mit den 311 bp und 399 bp Fragmenten in den HEK293-Zellen (C). Die M15del.Wt1-Zellen weisen einen mittels Western Blot nachweisbaren kompletten Verlust des WT1-Proteins auf (D). In diesen Zellen führte die Transfektion der WT1(-KTS)-Variante zu einer Repression des 678 bp *HoxB9*-Promotorfragments. In allen Zelllinien zeigte das 200 Basenpaar lange *HoxB9*-Fragment im Vergleich zu den anderen Fragmenten eine deutlich geringere Grundaktivität (153, 154). Werte sind Mittelwerte±SEM. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,0001$ , A+B ANOVA mit Tukey-Post-hoc-Test, C gepaarter t-Test.

Anschließend wurden *HoxB9*-Promotorfragmente konstruiert, die im Vergleich zur Wildtyp-Sequenz (WT) Basenpaarmutationen in potenziellen WT1-Bindungsstellen enthielten. Die mittels EMSA identifizierten Sequenzen (Kapitel 3.5) dienten dabei als Orientierung. Die U2OS-Zellen wurden mit dem Wildtyp sowie mutierten 399 bp-Fragmenten transfiziert, da bei diesem Konstrukt in den vorherigen Experimenten der stärkste WT1-Effekt auf den *HoxB9*-Promotor nachweisbar war. Aus gleichem Grund wurde zur Transfektion der M15del.*Wt1*-Zellen das *HoxB9*-Promotorkonstrukt mit einer Länge von 678 bp verwendet.

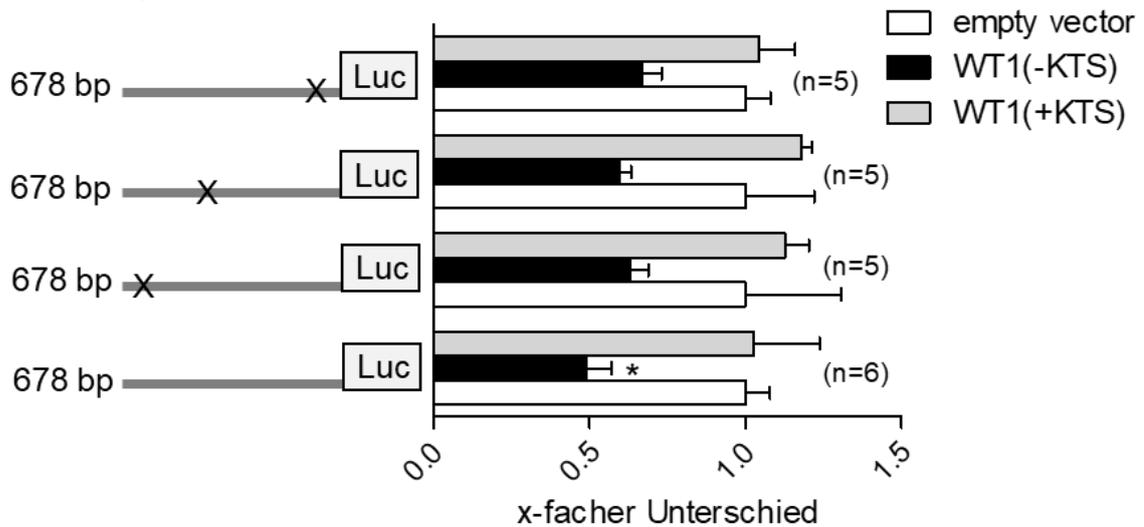
Durch die Einführung von Basenpaarmutationen in einzelne WT1-Bindungsstellen wurde die *HoxB9*-Promotorregulation durch WT1 nicht aufgehoben (Abb. 18). In den U2OS-Zellen konnte die Aktivierung des *HoxB9*-Promotors durch beide WT1-Isoformen mit zwei von drei Mutationen geringfügig reduziert werden, allerdings blieb die Induktion im Vergleich zum Leervektor nach wie vor statistisch signifikant (Abb. 18A). Die Repression des *HoxB9*-Promotors durch WT1 in den M15del.*Wt1*-Zellen konnte ebenfalls reduziert werden - der Effekt blieb trotzdem erkennbar, wenn auch nicht mehr statistisch signifikant (Abb. 18B).

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass WT1 die Transkription des *HoxB9*-Promotors sowohl stimulieren als auch hemmen kann und dieser Effekt zelltypabhängig ist. Die Wirkung von WT1 auf die *HoxB9*-Promotoraktivität wird offensichtlich nicht über eine einzige WT1-Bindungsstelle vermittelt, sondern die verschiedenen WT1-Bindungselemente sind funktionell redundant.

#### A U2OS-Zellen



## B M15 CrisprCas9 del.Wt1-Zellen



### Abb. 18: Reporterassays von *HoxB9*-Promotorkonstrukten mit Basenpaarmutationen in vermuteten WT1-Bindungsstellen

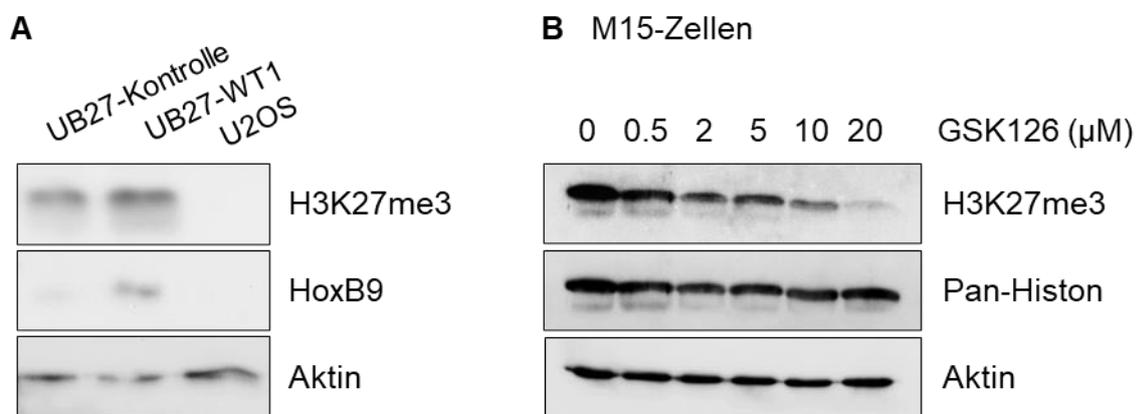
Neben dem Wildtyp *HoxB9*-Promotorkonstrukt mit einer Länge von 399 Basenpaaren wurden drei weitere Konstrukte mit jeweils einer Mutation (X) in einer WT1-Konsensussequenz in die U2OS-Zellen (A) transfiziert und anschließend die Luciferase-Aktivität gemessen. Sowohl die Wildtyp-Variante als auch alle anderen mutierten Promotorfragmente weisen eine signifikante, wenn auch mitunter im Vergleich zum Wildtyp reduzierte Zunahme der Luciferase-Aktivität auf (A). Das Wildtyp *HoxB9*-Promotorkonstrukt mit einer Länge von 678 Basenpaaren wurde in den M15del.Wt1-Zellen (B) durch Kotransfektion von WT1 signifikant reprimiert. *HoxB9*-Promotorfragmente mit Mutationen in potenziellen WT1-Bindungsstellen zeigen ebenfalls eine Repression, allerdings war diese nicht mehr statistisch signifikant (B). Werte sind Mittelwerte $\pm$ SEM. Statistische Signifikanzen werden durch Sternchen (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,0001$ , ANOVA mit Tukey-Post-hoc-Test) angezeigt.

### 3.7 Die WT1-abhängige Hemmung der *HoxB9*-Expression erfordert kein EZH2 bzw. die Histonmethylierung H3K27me3

Nachdem die transkriptionelle Regulation von *HoxB9* durch WT1 mit Hilfe verschiedener Methoden nachgewiesen wurde, erfolgte die Untersuchung, weshalb WT1 zelltypspezifisch die *HoxB9*-Expression sowohl aktiviert als auch hemmt. Wie bereits in Kapitel 1.2.2 beschrieben, ist *HoxB9* eine Zielstruktur des PRC1- und PRC2-Komplexes (92-94), der eine essenzielle Rolle in der Regulation der gesamten *Hox*-Genfamilie einnimmt. Über Histonmethylierungen wie z.B. H3K4me3 können Gene an- bzw. über H3K27me3 abgeschaltet werden. Eine Beteiligung der Histonmethylierung im Rahmen der WT1-abhängigen *HoxB9*-Regulation erschien möglich – vor allem in Bezug auf die Frage, ob die katalytische Untereinheit EZH2 bzw. die reprimierende Histonmarkierung H3K27me3 für die WT1-abhängige *HoxB9*-Repression erforderlich ist.

Da die Expressionsgrade der Histonmethylierungen zwischen den Zelllinien divergieren, wurde zu Beginn mittels Western Blot die Histonmethylierung H3K27me3 in den

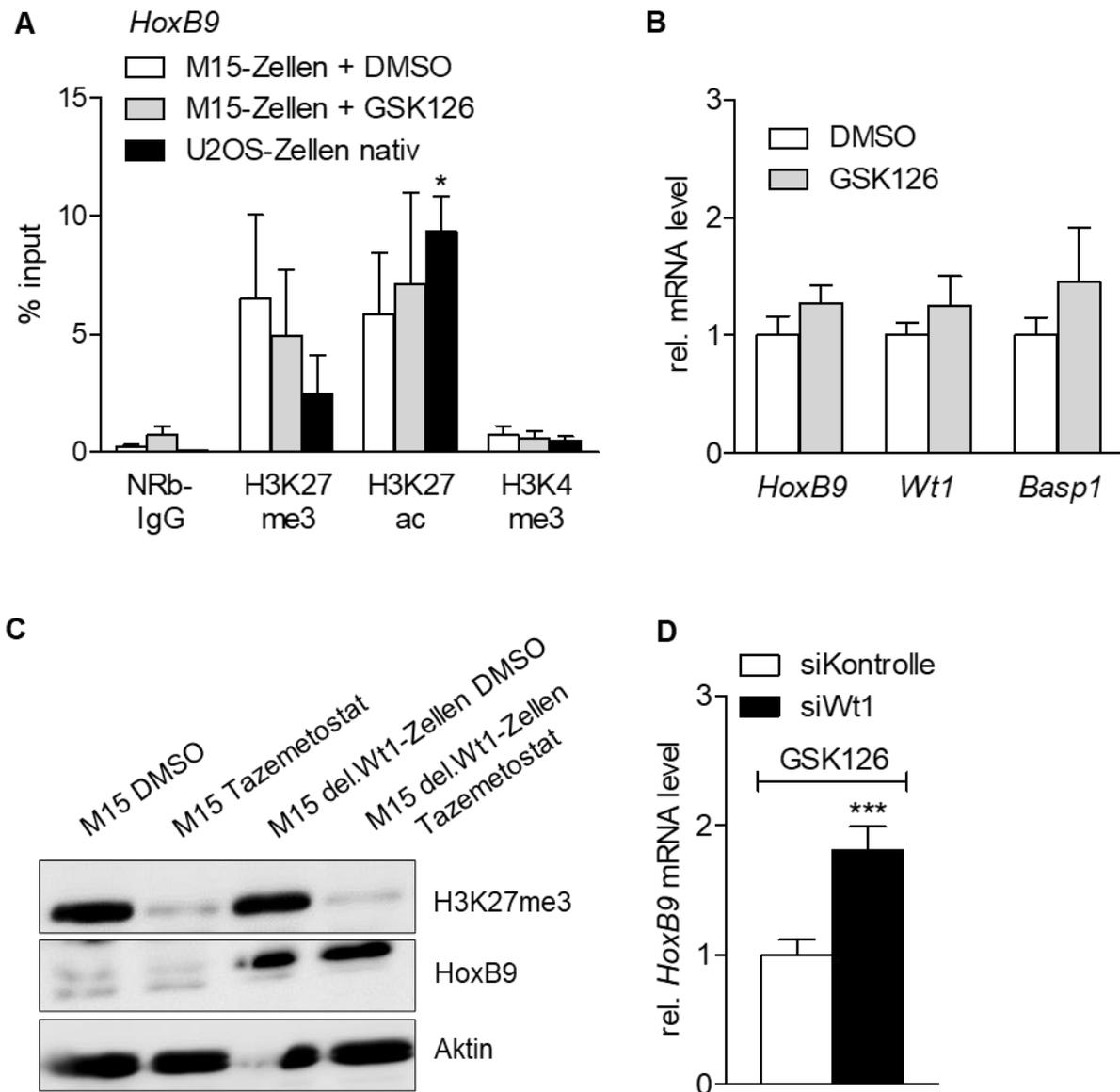
einzelnen Zelllinien untersucht (Abb. 19). Übereinstimmend mit bereits veröffentlichten Daten (155) konnte kein H3K27me3-Signal in den U2OS-Zellen detektiert werden (Abb. 19A). Im Gegensatz dazu wiesen UB27-Zellen deutlich erkennbare Mengen von H3K27me3 auf. Das stärkste H3K27me3-Signal war mittels Western Blot in M15-Zellen nachweisbar (Abb. 19B). Daher wurden die spezifischen EZH2-Hemmer GSK126 und Tazemetostat verwendet, um zu testen, ob die Hemmung von *HoxB9* durch WT1 in den M15-Zellen abhängig von der Histonmethylierung ist (156, 157). Die dosisabhängige Abnahme von H3K27me3 durch GSK126 wurde auf Proteinebene mittels Western Blot überprüft (Abb. 19B).



**Abb. 19: Western Blots zum Nachweis von H3K27me3 in verschiedenen Zelllinien**  
 U2OS- weisen im Vergleich zu den UB27-Zellen keine Expression von H3K27me3 auf (A). Die H3K27me3-Expression in den M15-Zellen kann durch Zugabe von GSK126 gehemmt werden (B).

Die Behandlung der M15-Zellen mit GSK126 (20 µM) hatte jedoch keine signifikante Wirkung auf die *HoxB9*-, *Wt1*- und *Basp1*-Expression – weder auf mRNA noch auf Proteinebene (Abb. 20B+C). Mittels ChIP-Assay wurde eine Assoziation von H3K27me3 mit dem *HoxB9*-Promotor überprüft. In den M15-Zellen zeigte sich eine deutliche, jedoch nicht statistisch signifikante Anreicherung mit dem H3K27me3-Antikörper und eine etwas weniger stark ausgeprägte, ebenfalls nicht signifikante Anreicherung mit dem H3K27ac-Antikörper (Abb. 20A). Die Behandlung der M15-Zellen mit GSK126 führte zu keiner signifikanten Abnahme der H3K27m3-Expression. In den U2OS-Zellen zeigte sich eine starke und statistisch signifikante Anreicherung des *HoxB9*-Promotors mit dem H3K27ac-Antikörper. Abschließend wurde in den mit GSK126 (20 µM) behandelten M15-Zellen ein *Wt1*-Knockdown mittels siRNA durchgeführt. Der signifikante Anstieg der *HoxB9*-mRNA wurde durch GSK126 nicht blockiert (Abb. 20D).

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die Hemmung des *HoxB9*-Gens durch WT1 in den M15-Zellen keine Trimethylierung von H3K27 durch EZH2 erfordert.



**Abb. 20: Histonmethylierungsstatus des *HoxB9*-Promotors in M15- und U2OS-Zellen**

Histonmethylierungsstatus des *HoxB9*-Promotors in M15-Zellen mit DMSO/ GSK126 (20µM) sowie U2OS-Zellen (A). Behandlung der M15-Zellen mit GSK126 (20 µM) und Bestimmung der *HoxB9*, *Wt1* und *Basp1* mRNA (B). Western Blot von M15del. *Wt1*-Zellen behandelt mit Tazemetostat (20 µM) zur Hemmung von H3K27me3. Die Hemmung von EZH2 durch GSK126 oder Tazemetostat verändert die *HoxB9*-Expression weder auf mRNA- noch auf Proteinebene. Knockdown von *Wt1* mittels siRNA in M15-Zellen, die mit GSK126 (20 µM) behandelt wurden (D). Werte sind Mittelwerte±SEM. M15-Zellen n=4, U2OS-Zellen n=3 A, *HoxB9* n=17, *Wt1* und *Basp1* n=15 B, n=9 D; \*p<0,05, \*\*\*p<0,0001, ANOVA mit Tukey-Post-hoc-Test A, gepaarter t-Test B+D.

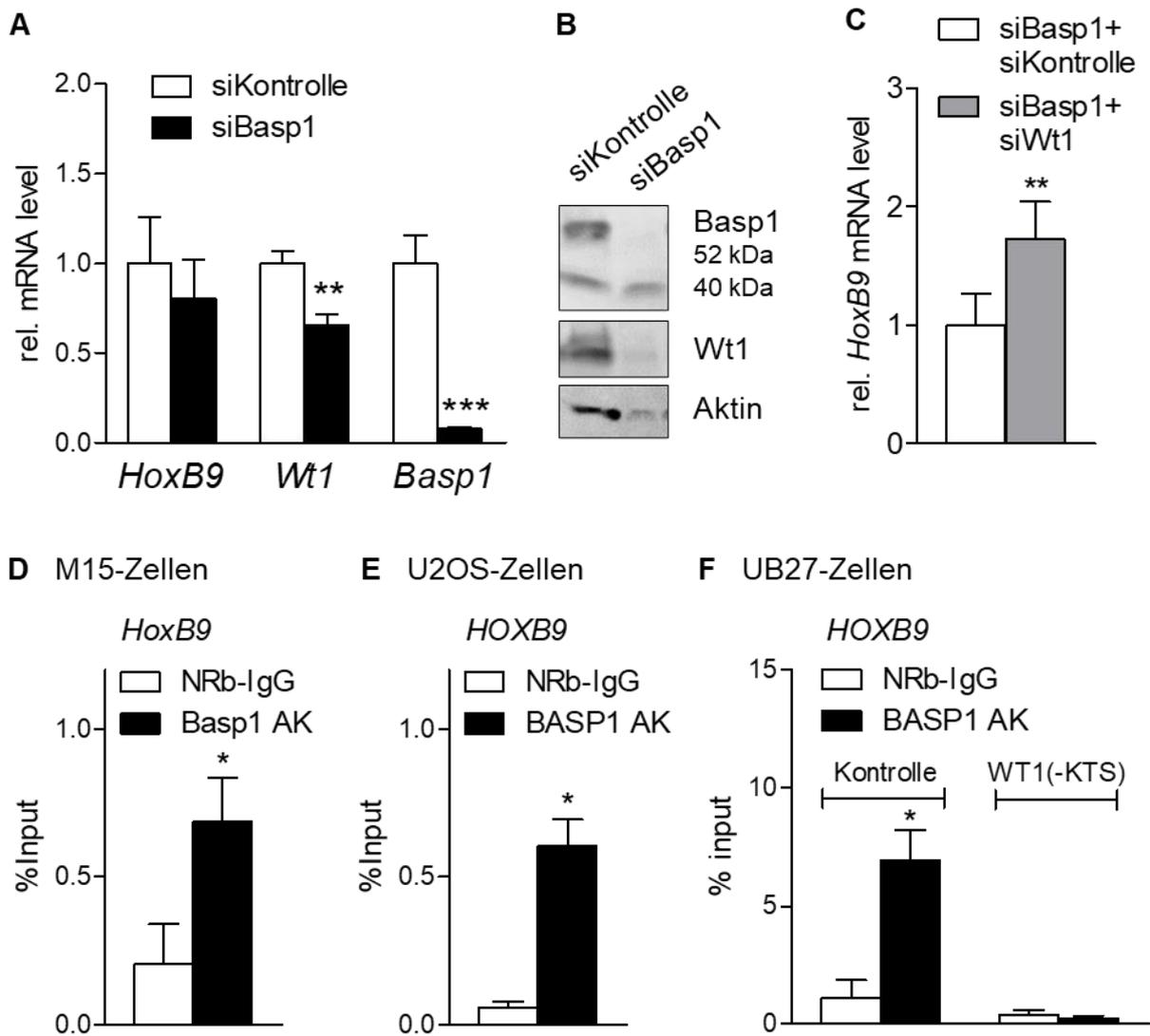
### **3.8 Der WT1-Korepressor BASP1 bindet an den *HoxB9*-Promotor und beeinflusst die WT1-abhängige *HoxB9*-Regulation**

Das WT1-Protein besitzt eine Repressionsdomäne, an die Interaktionspartner wie der transkriptionelle Korepressor BASP1 rekrutiert werden, was zur WT1-abhängigen Hemmung der Transkription von Zielgenen sowohl in der embryonalen Niere als auch in Tumorzellen führt (15, 16, 158). WT1 ist als Transkriptionsfaktor v.a. im Zellkern lokalisiert (159, 160), BASP1 kann aufgrund seiner Kernlokalisierungssequenz ebenfalls in den Nukleus, u.a. von Nierenzellen, importiert werden (17, 161). Darüber hinaus wurden WT1 und BASP1 bereits in den Kernextrakten der M15- und U2OS-Zellen nachgewiesen (16, 18). Zudem scheint BASP1 an der transkriptionellen Hemmung von mehr als 90% der WT1-Zielgene beteiligt zu sein (17). Vor diesem Hintergrund wurde untersucht, ob BASP1 eine Rolle bei der WT1-abhängigen bidirektionalen *HoxB9*-Regulation spielt.

Dazu wurde zunächst die Expression von *Basp1* in den M15-Zellen durch Transfektion von siRNA gehemmt. Die Kontrolle erfolgte mittels Western Blot und zeigte vor allem eine Herunterregulation der 52 kDa BASP1-Isoform, während die 40 kDa-Variante unverändert blieb (Abb. 21B). Der Knockdown von *Basp1* hatte keinen signifikanten Effekt auf die endogene *HoxB9*-mRNA in den M15-Zellen, verursachte aber eine signifikante Abnahme der *Wt1*-mRNA, die ebenfalls auf Proteinebene nachvollzogen werden konnte (Abb. 21A+B). Im Anschluss wurde ein Doppelknockdown in den M15-Zellen mit *Basp1*- und zusätzlich *WT1*-siRNA durchgeführt. Die *HoxB9*-mRNA nahm trotz *Basp1*-Depletion signifikant zu. Ein Knockdown von *Basp1* konnte also auch nicht die hemmende Wirkung von WT1 auf die *HoxB9*-Transkripte verhindern (Abb. 21C).

Um zu testen, ob BASP1 mit dem *HoxB9*-Promotor im Chromatin der M15- und U2OS-Zellen assoziiert ist, wurden ChIP-Assays durchgeführt. In beiden Zelllinien wurde die *HoxB9*-Promotor-DNA mehr als 3-fach, statistisch signifikant durch Immunpräzipitation mit dem BASP1-Antikörper angereichert. Dies deutet darauf hin, dass BASP1 mit dem *HoxB9*-Promotor in den M15- und U2OS-Zellen interagiert (Abb. 21D+E). Aus diesen Ergebnissen lässt sich ableiten, dass WT1 und BASP1 zusammen am *HoxB9*-Promotor in den M15-Zellen vorkommen. Da die U2OS-Zellen keine endogene *WT1*-Expression aufweisen, wurde abschließend ein ChIP-Assay in den UB27-Zellen durchgeführt, und zwar sowohl an nicht-induzierten Zellen als auch an Zellen mit Induktion von WT1(-KTS). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der U2OS-Zellen zeigte sich in der Kontrolle eine ca. 3-fach, statistisch signifikante Anreicherung der *HoxB9*-Promotor-DNA mit dem

BASP1-Antikörper verglichen mit normalem Kaninchen IgG (Abb. 21F). Dieser Effekt konnte nach WT1(-KTS)-Induktion nicht mehr nachgewiesen werden. Eine Anreicherung der *HoxB9*-Promotor-DNA mit dem BASP1-Antikörper blieb aus (Abb. 21F). Offenbar verhindert WT1 eine Interaktion von BASP1 mit dem *HoxB9*-Promotor, was die stimulierende Wirkung von WT1 auf die *HoxB9* Expression in diesen Zellen erklären könnte.

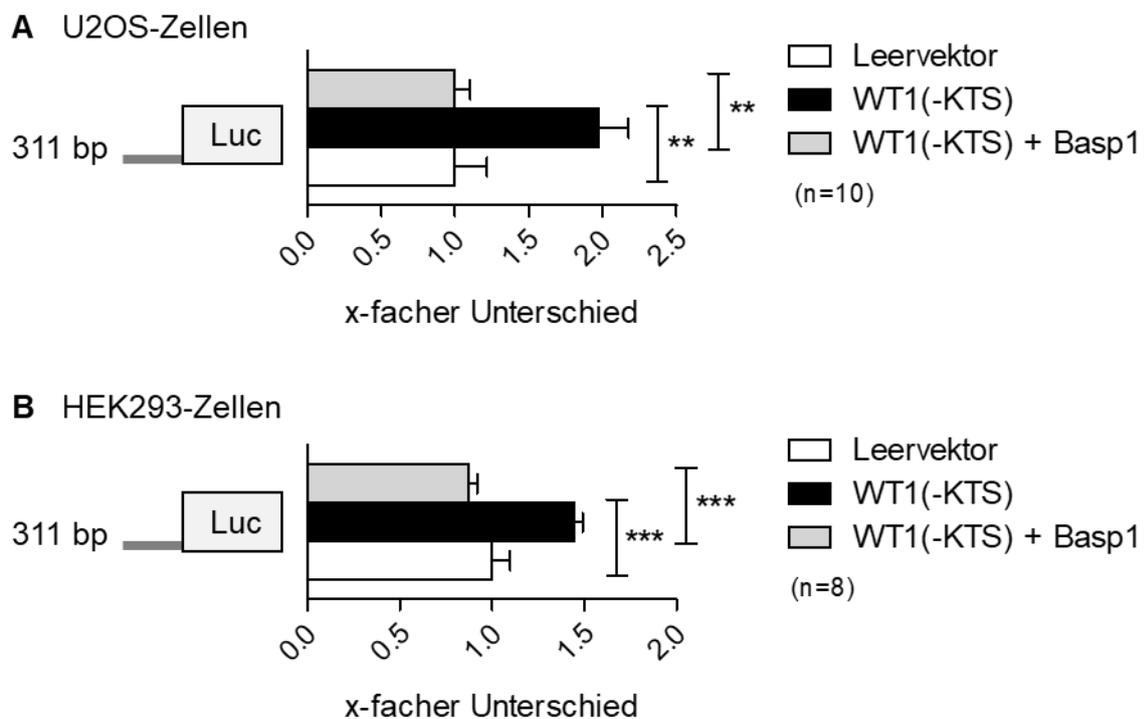


**Abb. 21: BASP1-Knockdown und ChIP in M15-, U2OS- und UB27-Zellen**

Knockdown von BASP1 in M15-Zellen mittels siRNA und anschließender mRNA Quantifizierung der Gene *HoxB9*, *Wt1* und *Basp1* durch qRT-PCR (A). Knockdown-Kontrolle mittels Western Blot (B). Eine statistisch signifikante Abnahme der mRNA und des Proteins war für *Wt1* und *Basp1* nachweisbar. Doppelknockdown von BASP1 und WT1 in M15-Zellen bewirkte eine statistisch signifikante Zunahme der *HoxB9* mRNA (C). ChIP-Assays in M15- (D), U2OS- (E) und UB27-Zellen (F) mit einem BASP1-Antikörper verglichen mit normalen Kaninchen IgG. Es zeigt sich eine statistisch signifikante Anreicherung der *HoxB9*-Promotor-DNA in den M15-, U2OS- und nicht-induzierten UB27-Zellen. Werte sind Mittelwerte $\pm$ SEM. Statistische Signifikanzen werden durch Sternchen (n=13 A, n= 5 C, n= 4 D, n=3 E, n= 3 F; \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,0001, gepaarter t-Test) angezeigt.

Abschließend wurde untersucht, ob *BASP1* die Stimulation des *HoxB9*-Promotors durch *WT1* hemmt. Dafür wurden Reporterassays in U2OS- und HEK293-Zellen mit dem 311 bp langen *HoxB9*-Promotorkonstrukt durchgeführt (Abb. 22). In Übereinstimmung mit den vorherigen Experimenten (Abb. 17A+C) resultierte die Transfektion der *WT1*(-KTS)-Variante im Vergleich zum Leervektor in einer statistisch signifikanten Zunahme der Luciferase-Aktivität. Eine gleichzeitige Überexpression von *Basp1* hob den stimulierenden *WT1*-Effekt auf den *HoxB9*-Promotor sowohl in den U2OS- als auch in den HEK293-Zellen vollständig auf (Abb. 22).

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass *BASP1* eine Rolle in der *WT1*-abhängigen bidirektionalen Regulation von *HoxB9* spielt. Dies wird im Diskussionsteil der Arbeit ausführlich interpretiert.

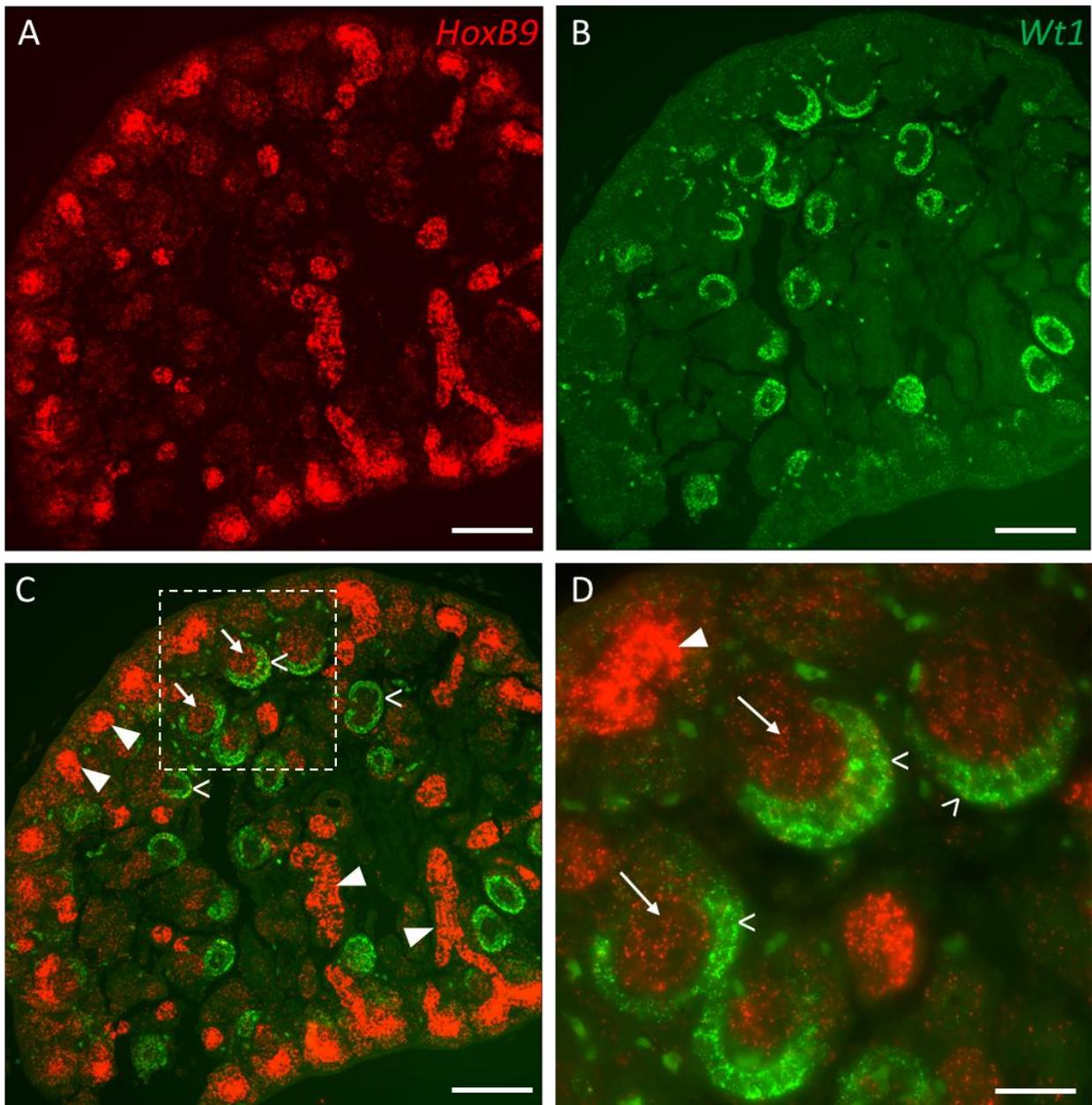


**Abb. 22: Reporterassay eines *HoxB9*-Konstruktes mit *Basp1*-Überexpression in U2OS- und HEK293-Zellen**

Um den Einfluss von *BASP1* auf die *WT1*-abhängige *HoxB9*-Regulation auf Promotorebene zu untersuchen, wurde ein *HoxB9*-Promotorkonstrukt mit einer Länge von 311 Basenpaaren entweder mit dem Leervektor, einem *WT1*(-KTS)-Expressionsplasmid oder letzteres in Kombination mit einem *Basp1*-Expressionsplasmid in U2OS- (A) und HEK293-Zellen (B) transfiziert. Wie zu erwarten, zeigte sich eine signifikante Zunahme der Luciferase-Aktivität bei der *WT1*(-KTS)-Variante. Bei Kotransfektion des *Basp1*-Expressionsplasmids wurde dieser Effekt in beiden Zelllinien vollständig aufgehoben. Werte sind Mittelwerte±SEM. Statistische Signifikanzen werden durch Sternchen (\*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,0001$ , ANOVA mit Tukey-Post-hoc-Test) angezeigt.

### 3.9 Lokalisation der *Wt1*- und *HoxB9*-mRNA in der embryonalen Niere

Aus der Beobachtung, dass WT1 die *HoxB9*-Expression sowohl in den Nierenorgankulturen als auch in den murinen, mesonephrischen M15-Zellen hemmt, lässt sich spekulieren, dass die beiden Gene in verschiedenen Zelltypen in der embryonalen Niere exprimiert werden. Um diese Hypothese zu verifizieren, wurde eine RNA *in-situ*-Hybridisierung (RNA-ISH) mittels RNAscope® Technologie durchgeführt. In Ermangelung eines zuverlässigen Anti-*HoxB9*-Antikörpers konnte keine Immunhistochemie (IHC) durchgeführt werden. Für die RNA-ISH wurden die Nierenanlagen von Mausembryonen (E14.5) verwendet. Durch Doppelhybridisierung mit spezifischen Sonden konnten die mRNAs von *HoxB9* und *Wt1* auf demselben Gewebeschnitt lokalisiert werden. In Übereinstimmung mit früheren Beobachtungen (159, 162) wurde ein deutliches *Wt1*-Hybridisierungssignal im viszeralem Epithel der sich entwickelnden Glomeruli sichtbar (Abb. 23). Die *Wt1*-Transkripte zeigten einen geringen Überlappungsgrad mit der *HoxB9*-RNA, die wie in einer früheren Arbeit beschrieben, vorwiegend in der Ureterknospe und in Blutgefäßvorläufern nachgewiesen wurde (151). Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass *HoxB9* und *Wt1* vorwiegend in verschiedenen Zelltypen in der embryonalen Mausniere exprimiert werden. Eine kleine, bislang nicht näher charakterisierte Zellpopulation exprimiert beide Gene.



**Abb. 23: RNA *in-situ*-Hybridisierung (RNA-ISH) mittels RNAscope® Technologie von *Wt1* und *HoxB9* in der embryonalen Niere**

Es wurden die Nierenanlagen von Mausembryonen zum Entwicklungszeitpunkt E14.5 verwendet und die RNA von *HoxB9* (■) und *Wt1* (■) lokalisiert. *HoxB9*-mRNA ist vor allem in Blutgefäßvorläufern (Pfeile) und der Uretererknospe (Dreiecke) sichtbar, das *Wt1*-Hybridisierungssignal kann im viszeralem Epithel der sich entwickelnden Glomeruli (Pfeilköpfe in C und D) nachgewiesen werden. Abbildung D ist eine Vergrößerung des in C dargestellten Ausschnitts. Die Skalierungsbalken zeigen 100 µm (A, B, C) bzw. 30 µm (D) an.

## 4 Diskussion

### 4.1 Diskussion der Hauptergebnisse mit Schlussfolgerung

#### 4.1.1 Identifizierung neuer potenzieller WT1-Zielgene in der Nierenentwicklung

WT1 ist für die normale Embryogenese unverzichtbar. Dies wird durch die Beobachtung dokumentiert, dass *Wt1*-Knockout-Mäuse mit einer Agenesie der Nieren, Gonaden und einigen anderen Defekten embryonal letal sind (42). Die Nieren entwickeln sich durch wechselseitige Signale zwischen dem metanephrischen Mesenchym und dem einsprossenden Ureter (47). Dabei wird WT1 zunächst in einer Population mesenchymaler Zellen in der Umgebung der Ureterknospe exprimiert. WT1 ermöglicht diesen Zellen die mesenchymal-epitheliale Transition (MET), d.h. die Erlangung eines epithelialen Differenzierungszustandes als Voraussetzung für die Nephronentwicklung (47). Im weiteren Verlauf der Nephrogenese erfolgt die *WT1*-Expression in den Vorläuferzellen der glomerulären Podozyten. Wie WT1 die Nierenbildung steuert, ist allerdings bisher nicht vollständig verstanden.

In der Vergangenheit existierten bereits mehrere Ansätze, um WT1-abhängige Signalwege im Rahmen der Nierenentwicklung zu identifizieren. Um die Bindung von WT1 an die Promotoren seiner Zielgene in murinen embryonalen Nierenextrakten nachzuweisen, wurden beispielsweise Chromatin-Immunpräzipitationen (ChIP) durchgeführt (129). Mittels *In-vivo*-ChIP-Seq konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass WT1 für die Aufrechterhaltung des metanephrischen Mesenchyms essenziell ist und FGFs induziert, während BMP/SMAD-Signalwege gehemmt werden (51). Ein systematischer genomweiter Ansatz zur Identifizierung WT1-abhängig exprimierter Gene während der Nierenentwicklung wurde bislang nicht verfolgt. Zu diesem Zweck wurden im Rahmen dieser Arbeit Organkulturen mit der Absicht einer genomweiten Identifikation neuer WT1-Zielgene in der Nierenentwicklung etabliert. Die WT1-abhängig exprimierten Transkripte wurden mittels Next Generation Sequencing analysiert und mit Hilfe von qRT-PCR validiert (Abb. 7+8). Nach Abgleich mit den bereits existierenden ChIP-Datensätzen konnten potenzielle direkte WT1-Zielgene mit Promotorbindung von WT1 in der embryonalen Niere identifiziert werden. Im Sinne eines „proof of principle“ wurde die WT1-abhängige Expression einzelner Gene, insbesondere von Wnt family member 10B (*Wnt10b*), adenosine A1 receptor (*Adora1*), disheveled-associated activator of morphogenesis 2 (*Daam2*) und natriuretic peptide receptor 3 (*Npr3*) in Zelllinien

untersucht und eine transkriptionelle Stimulation der jeweiligen Promotoren durch WT1 mittels Reporterassays nachgewiesen (Abb. 9+10).

*Npr3* ist ein atrialer natriuretischer Peptidrezeptor, dessen Expression durch WT1 stimuliert wird, und der in Blutgefäßen, im Herzen und in der Niere exprimiert wird (163). Im sich entwickelnden Herzen wird WT1 vor allem im Epikard gebildet. Ein *Wt1*-Knockout führt bei Mäusen u.a. zu einer Myokardhypoplasie und Störung der myokardialen Vaskularisation (42). *Wnt10B* spielt eine Rolle in der Adipozytendifferenzierung von Zellen epikardialen Ursprungs (164). Weiterführende Untersuchungen könnten der Frage nachgehen, in welcher Weise *Wt1*, *Npr3* und *Wnt10B* bei der Herz- und Nierenentwicklung funktionell zusammenwirken. Dies gilt in gleicher Weise für die anderen untersuchten Gene, die u.a. in der Niere exprimiert werden: Mutationen im *Daam2*-Gen können zu einem nephrotischen Syndrom führen (165) und der *Adora1*-Knockout in Mäusen verursacht den Phänotyp einer diabetischen Nephropathie (166). Neben dieser Auswahl an Transkripten konnte mit Hilfe des genomweiten Ansatzes eine große Anzahl an Genen identifiziert werden, die entweder direkt oder indirekt durch WT1 reguliert werden. Zusammenfassend lässt sich konstatieren, dass die Kombination aus *Vivo*-Morpholino induziertem *Wt1*-Knockdown in embryonalen Nierenorgankulturen mit Next Generation Sequencing als Methode zur Identifikation neuer potenzieller Zielgene und zur Analyse transkriptioneller Netzwerke in der Nierenentwicklung geeignet ist. Über die Charakterisierung einzelner potenzieller Zielgene lassen sich in Zukunft möglicherweise weitere neue embryonale Signalmechanismen während der Nephrogenese aufdecken.

#### **4.1.2 Bedeutung von *HoxB9* als neues WT1-Zielgen**

Im Rahmen dieser Arbeit konnte *HoxB9* als neues WT1-Zielgen charakterisiert werden. Die bekannte Expression in der sich entwickelnden Niere sowie das Vorkommen in bereits publizierten, genomweiten Sequenzierdatensätzen (129, 149, 150), die eine Bindung von WT1 an den *HoxB9*-Promotor in der embryonalen Niere nahelegten, waren Gründe für die Wahl von *HoxB9*. Weiterhin wurden in vorherigen Untersuchungen einzelne *Hox*-Gene wie *HoxD4* (129) und *HoxA10* (167) als Zielmoleküle von WT1 beschrieben. Die transkriptionelle Repression von *HoxA10* durch WT1 wird sogar klinisch zur Bestimmung des histologischen Subtyps von Ovarialkarzinoms und anderen gynäkologischen Krebsarten genutzt (167). Unter Berücksichtigung der sich

überlappenden Gewebeexpression und der Rolle der beiden Transkriptionsfaktoren im Rahmen der Entwicklung und Tumorentstehung wurde *HoxB9* zur Evaluation als direktes Zielgen von WT1 ausgewählt.

Während die Wirkung von WT1 auf seine Zielgene meist entweder stimulierend oder hemmend ist, zeigen die Daten dieser Arbeit, dass WT1 die Transkription eines einzelnen Gens bidirektional regulieren kann. WT1 reprimiert die *HoxB9* mRNA-Expression in murinen embryonalen Nierenorgankulturen, mesonephrischen M15-Zellen und humanen Nierenkarzinomzellen (786-0) (Abb. 11A-C). Hingegen wird in den von der menschlichen embryonalen Niere abgeleiteten HEK293-Zellen sowie in den vom Osteosarkom abgeleiteten U2OS- und UB27-/UD28-Zellen die *HoxB9*-Expression durch WT1 aktiviert (Abb. 12A und 13A+B). Mit Hilfe weiterer Methoden wie Reporterassays ließ sich der jeweilige WT1-abhängige Effekt auf den *HoxB9*-Promotor in den unterschiedlichen Zelllinien bestätigen (Abb. 17A-C). Auch auf Proteinebene konnten mittels Western Blot die mRNA-Veränderungen verifiziert werden (Abb. 11D-F, 12B, 13C,D).

Dabei wurde der Effekt beider WT1-Proteinisoformen – WT1(-KTS) und WT1(+KTS) – sowohl auf mRNA-Ebene als auch mittels Reporterassays evaluiert. Es fiel auf, dass beide WT1-Varianten den *HoxB9*-Promotor aktivieren, wobei die WT1(-KTS)-Isoform einen stärkeren transkriptionellen Effekt zeigte (Abb. 17A-C). Dies stimmt mit den vorherigen Beobachtungen überein, dass die WT1(-KTS)-Variante vorwiegend transkriptionell aktiv ist, während die WT1(+KTS)-Variante eher in posttranskriptionelle Prozesse involviert ist (7-9). Ob *HoxB9* zusätzlich auch auf posttranskriptioneller Ebene durch WT1 reguliert wird, z.B. durch eine über die 3'UTR vermittelte mRNA-Stabilisierung wie bereits für andere Gene beschrieben (2), sollte weiter untersucht werden. Interessanterweise wurde eine Repression des *HoxB9*-Promotors in den M15del.*Wt1*-Zellen ausschließlich durch die WT1(-KTS)-Variante, nicht jedoch durch die WT1(+KTS) Isoform verursacht (Abb. 17B). In der Literatur wurde beschrieben, dass beide Varianten zu einer Repression führen können (168). Möglicherweise erfolgt die reprimierende Wirkung der WT1(+KTS)-Isoform zelltypabhängig und erfordert das Vorhandensein weiterer Faktoren.

Eine Bindung von WT1 an den *HoxB9*-Promotor konnte in der Vergangenheit in verschiedenen genomweiten Untersuchungen nachgewiesen werden (51). Dies trifft sowohl für die embryonale Niere (129) als auch für die glomerulären Podozyten zu (150). In Ergänzung zu diesen Beobachtungen zeigte sich in den CHIP-Experimenten dieser

Arbeit eine deutliche Anreicherung mit dem WT1-Antikörper am *HoxB9*-Promotor im Chromatin der M15-, U2OS-, UB27- und UD28-Zellen (Abb. 14).

Aus früheren ChIP-Experimenten (51) geht hervor, dass WT1 an mehrere Stellen des *HoxB9*-Promotor bindet. Mit Hilfe von Reporterassays und EMSAs konnte dies in der vorliegenden Arbeit experimentell nachgewiesen werden. Mittels EMSA ließen sich mindestens vier WT1-bindende Sequenzen im *HoxB9*-Promotor ermitteln (Abb. 16). Durch Mutationen, die in die WT1-Bindungsstellen eingefügt wurden, ließ sich die WT1-Bindung abschwächen bzw. verhindern. Allerdings mussten die Wildtyp-Bindungssequenzen im EMSA deutlich abgewandelt werden, was auf eine starke WT1-Affinität zu den konservierten Sequenzen hindeutet. Gestützt wird diese Ansicht durch die Beobachtung, dass die im Rahmen der Reporterassays durchgeführten Mutationen die WT1-Aktivität nur in geringem Maße abschwächten (Abb. 18). Dies deutet auf eine funktionelle Redundanz der *cis*-wirkenden Elemente hin. Die Kombination von mehreren Bindungsstellen gepaart mit einer hohen Affinität zu den einzelnen Sequenzen lässt vermuten, dass es sich bei *HoxB9* um ein wichtiges Zielgen von WT1 handelt.

Wie am Beispiel von *HoxA10* nachgewiesen, können in einem Promotor mehrere regulatorische Elemente vorhanden sein, die sowohl aktivierende als auch reprimierende Eigenschaften vermitteln (167). Wie viele regulatorische Elemente im *HoxB9*-Promotor tatsächlich existieren und wo genau sie lokalisiert sind, bleibt in dieser Arbeit offen. Allerdings geht aus den Ergebnissen hervor, dass für die Repression des *HoxB9*-Promotors in den M15del.*Wt1*-Zellen eine Promotorlänge von mindestens 559 bp nötig ist. Ob innerhalb dieses *HoxB9*-Promotorabschnitts ein einziges Element lokalisiert ist, welches die Repression vermittelt, könnte in zukünftigen Untersuchungen ermittelt werden. Das Vorhandensein einer Bindungsstelle nahe des Transkriptionsstarts erscheint allerdings plausibel, da in den U2OS- und HEK293-Zellen das *HoxB9*-Promotorkonstrukt mit einer Länge von 311 bp durch WT1 weiterhin induziert wird (Abb. 17A-C).

Dass WT1 einzelne Zielgene aktivieren und andere reprimieren kann, wurde bereits beschrieben (3). Die molekularen Mechanismen für die bidirektionale Transkriptionsregulation durch WT1 sind allerdings weitgehend unbekannt, aber die Verwendung mehrerer WT1-Isoformen, die zell- und kontextabhängige Interaktion mit variablen Kofaktoren sowie posttranslationale Modifikationen des WT1-Proteins können als Erklärungsansätze dienen (3). Einzelne Gene, die wie *HoxB9* im Rahmen eines

veränderten zellulären Kontextes gegensätzlich reguliert werden, wurden bisher selten beschrieben. Ein Beispiel hierfür ist das *Wnt4*-Gen, über dessen transkriptionelle Aktivierung WT1 die mesenchymal-epitheliale Transition während der Nierenentwicklung einleitet (47). Im Kontext der Epikardentwicklung reguliert WT1 den umgekehrten Prozess (EMT), der mit einer Hemmung der *Wnt4*-Expression verbunden ist (169). In Nierenzellen rekrutiert WT1 CBP/p300 als Koaktivatoren zum *Wnt4*-Promotor, während in Epikardzellen BASP1 als Korepressor von WT1 wirksam ist (169). Interessanterweise führt ein WT1-Verlust zu einer veränderten Chromatinarchitektur des gesamten CTCF-gebundenen *Wnt4*-Lokus (169). Neuere Ergebnisse zeigen, dass dieses Phänomen, das als „Chromatin-Flip-Flop“ bezeichnet wird, mit dem Vorhandensein oder Fehlen spezifischer Histonmodifikationen korreliert: In Nierenzellen, in denen das *Wnt4*-Gen aktiv ist, konnte eine Trimethylierung des Lysinrests 4 des Histons H3 (H3K4me3) am *Wnt4*-Lokus detektiert werden sowie eine Acetylierung von H3K9 und H3K14 (H3K9ac und H3K14ac) (170). Epikardzellen, in denen *Wnt4* herunterreguliert ist, weisen stattdessen eine Trimethylierung des H3K27 (H3K27me3) auf (170). Diese aktivierenden oder reprimierenden Chromatinveränderungen des *Wnt4*-Promotors sind WT1-abhängig und CTCF ist dabei entscheidend für den Aufbau und/oder den Erhalt der Chromatinstruktur (170). Erste Erkenntnisse in Bezug auf die Frage, ob Histonmethylierungen und verschiedene Kofaktoren wie BASP1 in der WT1-abhängigen *HoxB9*-Regulation eine Rolle spielen, konnten im Rahmen dieser Arbeit gewonnen werden. Eine mögliche Beteiligung von CTCF oder anderer Kofaktoren bedarf einer tiefergehenden Untersuchung der komplexen Mechanismen.

#### **4.1.3 Bedeutung von BASP1 als Kofaktor in der WT1-abhängigen *HoxB9*-Regulation**

WT1 besitzt eine Repressionsdomäne, an die Interaktionspartner wie der transkriptionelle Korepressor BASP1 binden, was zur Hemmung der Transkription von Zielgenen führt (15, 16, 158). Beide Proteine sind im Zellkern lokalisiert (16, 160) und werden in der sich entwickelnden Niere und anderen Geweben koexprimiert (16). Darüber hinaus wurden WT1 und BASP1 in den Kernextrakten der M15- und U2OS-Zellen nachgewiesen (16, 18). Es wurden bereits mehrere Gene beschrieben, die eine Rolle bei der zellulären Differenzierung spielen und an deren Promotor der BASP1/WT1-Komplex bindet wie z.B. *c-MYC*, *PODXL*, *BAK* und *SRPK1* (158, 171).

Mittels ChIP-Assay konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass *BASP1* an den *HoxB9*-Promotor im Chromatin der mesonephrischen M15-Zellen, der vom Osteosarkom abgeleiteten U2OS- und der nicht-induzierten UB27-Zellen bindet (Abb. 21D-F). Bemerkenswerterweise konnte nach Induktion der WT1(-KTS)-Variante *BASP1* am *HOXB9*-Promotor im Chromatin der UB27-Zellen nicht mehr nachgewiesen werden (Abb. 21F). WT1 könnte *BASP1* vom *HOXB9*-Promotor in den induzierten UB27-Zellen „verdrängen“ und so in einer Aktivierung resultieren, wie auf mRNA-Ebene beschrieben. Die Ursache für dieses Phänomen ließ sich nicht abschließend klären und könnte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

Darüber hinaus wurde mittels Reporterassays gezeigt, dass die Überexpression von *BASP1* in U2OS- und HEK293-Zellen die stimulierende Wirkung von WT1 auf den *HOXB9*-Promotor aufhebt (Abb. 22). Ob die U2OS- und HEK29-Zellen einen relativen *BASP1*-Mangel aufweisen, so dass die Repression erst nach Überexpression erfolgt, ist zu diskutieren. In den M15-Zellen scheint die hemmende Wirkung von *BASP1* nicht allein für die WT1-abhängige Repression verantwortlich zu sein, denn ein siRNA-Knockdown von *Basp1* erhöhte die *HoxB9*-mRNA nicht signifikant (Abb. 21A). Die Kontrolle mittels Western Blot zeigte vor allem eine Herunterregulation der 52-kDa-*BASP1*-Isoform, während die 40-kDa-Variante unverändert blieb (Abb. 21B). Es lässt sich spekulieren, ob bei *BASP1*-Knockdown die verbleibende Restaktivität für eine anhaltende *HoxB9*-Repression ausreichte. Allerdings führte ein *Wt1*-Knockdown in *BASP1*-depletierten M15-Zellen weiterhin zu einer signifikanten Zunahme der *HoxB9*-mRNA (Abb. 21C). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die WT1-abhängige Repression von *HoxB9* in M15-Zellen nicht ausschließlich auf dem Effekt von *BASP1* beruht. Für eine endgültige Klärung des Mechanismus würde sich am ehesten eine Zelllinie mit vollständigem *Basp1*-Knockout eignen.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass *BASP1* als Korepressor von WT1 an der bidirektionalen Regulation von *HoxB9* beteiligt ist. *BASP1* und WT1 scheinen abhängig vom Zelltyp einen reprimierenden bzw. aktivierenden Effekt auf das *HoxB9*-Gen zu haben. Daneben verursachte der Knockdown von *BASP1* eine signifikante Abnahme von *Wt1*-mRNA und -Protein (Abb. 21A+B). Dies deutet darauf hin, dass WT1 möglicherweise die Expression von *Basp1* reguliert.

#### 4.1.4 Histonmethylierung/-acetylierung als regulatorische Mechanismen

Die Expression von *Hox*-Genen wird u.a. durch PcG (polycomb group proteins) reguliert (74). Dies trifft auch für *HoxB9* zu, das als Zielgen des PRC1- und PRC2-Komplexes beschrieben wurde (92-94). PRC2 ist ein Methyltransferase-Komplex, der durch die Histonmethylierung H3K27me3 Gene reprimiert (95, 96). Bereits in früheren Untersuchungen wurde H3K27me3 am *HoxB9*-Promotor mittels genetischer und pharmakologischer Unterdrückung von EZH2 in Neuroblastomzellen reduziert (94). Aufgrund der großen Bedeutung der Histonmethylierungen für die Repression der *Hox*-Gene wurde im Rahmen dieser Arbeit der Frage nachgegangen, ob die katalytische Untereinheit EZH2 bzw. die reprimierende Histonmarkierung (H3K27me3) bei der WT1-abhängigen *HoxB9*-Repression eine Rolle spielt.

Diese Vermutung wird durch die Beobachtung gestützt, dass U2OS-Zellen trotz erhaltener Expression von EZH2 einen Verlust von dessen enzymatischer Aktivität aufweisen (155). Dies konnte durch den fehlenden Nachweis von H3K27me3 in U2OS-Zellen mittels Western Blot im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden (Abb. 19A). Damit einhergehend zeigte sich bei einer Chromatin-Immunpräzipitations-Sequenzierung (ChIP-Seq) von U2OS-Zellen lediglich eine H3K4me3-Histonmethylierung des *HoxB9*-Promotors (172). Dies ist vor dem Hintergrund erwähnenswert, dass *HoxB9* i.d.R. eine H3K27me3-Histonmethylierung oder als *bivalent gene* beide Histonmethylierungsstatus (H4K3me3 und H3K27me3) aufweist (173). Eine alleinige, mit einer Transkriptionsaktivierung in Zusammenhang stehende H3K4me3-Histonmethylierung ist eine Besonderheit und könnte eventuell den aktivierenden WT1-Effekt auf den *HoxB9*-Promotor erklären, ähnlich wie es für *Wnt4* gezeigt wurde (170). Die ChIP-Seq-Daten stützen diese Annahme, da *HoxB9* in anderen untersuchten Zelllinien wie den embryonalen Stammzellen (ESC) oder Osteoblasten entweder nur eine H3K27me3- oder beide genannten Histonmethylierungsvarianten aufweist (172).

Die Ergebnisse dieser Arbeit stimmen mit früheren Beobachtungen überein: Mittels ChIP-Assay konnte im Chromatin der U2OS-Zellen eine signifikante Anreicherung mit dem H3K27ac-Antikörper am *HoxB9*-Promotor nachgewiesen werden (Abb. 20A). Im Gegensatz dazu zeigte sich in den M15-Zellen eine stärkere, wenn auch nicht signifikante Anreicherung mit dem H3K27me3-Antikörper. Beide Zelllinien wiesen lediglich eine schwache Anreicherung von H3K4me3 auf. Eine Behandlung der M15-Zellen mit den selektiven EZH2-Inhibitoren Tazemetostat und GSK126 (156) führte zwar zu einer

Reduktion von H3K27me<sub>3</sub>, die sowohl mittels Western Blot (Abb. 19B) als auch mittels ChIP (nicht signifikant) (Abb. 20A) detektiert wurde, allerdings zu keiner Veränderung der *HoxB9*-mRNA oder Protein-Expression (Abb. 20B+C). Abschließend wurde in den M15-Zellen ein *Wt1*-Knockdown mittels siRNA durchgeführt, wobei der signifikante Anstieg der *HoxB9*-mRNA durch GSK126 nicht blockiert wurde (Abb. 20D).

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die Hemmung des *HoxB9*-Gens durch WT1 in den M15-Zellen keine Trimethylierung von H3K27 (H3K27me<sub>3</sub>) durch EZH2 erfordert. Inwiefern WT1 wiederum das Vorhandensein bzw. den Verlust von Histonmodifikationen am *HoxB9*-Promotor reguliert, gilt es in zukünftigen Untersuchungen herauszufinden.

Ergänzend zu den Erkenntnissen der Regulation des *Wnt4*-Lokus, konnte beobachtet werden, dass WT1 auch mit epigenetischen Faktoren wie Menin und DNMT1 interagiert (174). In embryonalen Fibroblasten der Maus verstärkt der Tumorsuppressor Menin die Expression von WT1, das wiederum den Polycomb-Komplex (PcG) zum Promotor des *Pax2*-Gens rekrutiert und dessen Expression durch Trimethylierung von H3K27 und CpG-Hypermethylierung unterdrückt (H3K27me<sub>3</sub>) (174). Ob die *HoxB9*-Aktivierung durch das fehlende Zustandekommen einer H3K27me<sub>3</sub>-Histonmethylierung in den U2OS-Zellen unterstützt wird, gilt es in Zukunft zu ermitteln.

#### **4.1.5 Bedeutung der WT1-abhängigen *HoxB9*-Regulation für die Nieren- und Tumorentwicklung**

WT1 ist das besondere Beispiel für ein Protein, welches an der Schnittstelle zwischen Entwicklung und Tumorbildung wirkt. Die Funktion von WT1 ist wahrscheinlich am besten im Kontext der Niere untersucht, wo WT1 als klassischer Tumorsuppressor wirksam ist (47). Als Resultat einer gestörten Nierenentwicklung können bei einem *WT1*-Gendefekt Wilms-Tumore aus postnatal persistierenden Clustern von proliferierenden embryonalen Zellen, den sog. *nephrogenic rests*, entstehen (175).

In der murinen embryonalen Niere wird *HoxB9* durch WT1 gehemmt. Mit Hilfe von *in-situ*-Hybridisierungen konnte gezeigt werden, dass sich die WT1-abhängige Hemmung der *HoxB9*-Expression in einer unterschiedlichen Lokalisation der entsprechenden mRNAs in der embryonalen Niere widerspiegelt. Während *Wt1* in Übereinstimmung mit vorherigen Beobachtungen im Mesenchym exprimiert wird (159, 162), findet sich die

*HoxB9*-mRNA vor allem in der Ureterknospe und den *capillary loop stage* Nephronen (Abb. 23). Nur wenige Zellen weisen eine Kolo-kalisation beider Transkripte auf.

Frühere Studien zeigen für *HoxB9* ein dynamisches Expressionsmuster während der Nierenentwicklung: Zum Zeitpunkt E12.0 war *HoxB9* im Mesenchym, zum Zeitpunkt E17.5 überwiegend in der Ureterknospe detektierbar (151). Spätestens ab E13.0 wird WT1 stark im Mesenchym exprimiert, wo es für die mesenchymal-epitheliale Transition notwendig ist (47). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit suggerieren, dass WT1 die *HoxB9*-Expression im metanephrischen Mesenchym hemmt. Über diesen Effekt ließe sich die deutliche Expression von *HoxB9* im WT1-negativen Ureterepithel der embryonalen Niere erklären. Basierend auf vorherigen Beobachtungen scheint *HoxB9* eine Rolle für den Erhalt des epithelialen/ mesenchymalen Gleichgewichts zu spielen, dabei aber eher den Prozess eines EMT zu induzieren (108). Welche Vorgänge *HoxB9* im Kontext der Nierenentwicklung fördert und welche Funktionen *HoxB9* in den verschiedenen Kompartimenten der embryonalen Niere erfüllt, bleibt in zukünftigen Untersuchungen zu ermitteln. Weiterhin ist die Frage zu klären, ob *HoxB9* das Ureterwachstum stimuliert und generell für die Nierenentwicklung notwendig ist. Indirekte Hinweise hierauf ergeben sich aus Zielgenen, die gemeinsam durch WT1 und HOXB9 reguliert werden. Als solche wurden Amphiregulin (AREG) und Epiregulin (EREG) beschrieben, die beide das verzweigende Ureterwachstum während der Nierenentwicklung fördern (31, 113).

In den humanen embryonalen Nierenzellen (HEK293) wird die Expression von *HoxB9* durch WT1 stimuliert. Ob dies zu einem veränderten Expressionsmuster in der sich entwickelnden humanen Niere führt und inwieweit die Ergebnisse aus der embryonalen murinen Niere auf den Menschen übertragbar sind, könnte Bestandteil weiterer Forschung sein.

Zahlreiche Daten deuten darauf hin, dass WT1 nicht nur als Tumorsuppressor fungiert, sondern auch onkogene Eigenschaften hat (56). Diese Auffassung basiert hauptsächlich auf dem Nachweis von WT1 in Tumoren, deren intakte Ursprungsgewebe wenig oder kein WT1 exprimieren, sowie der Feststellung, dass WT1 die Zellproliferation *in vitro* und *in vivo* stimulieren kann (57, 60, 62, 176). Vor dem Hintergrund, dass eine *HoxB9*-Überexpression in verschiedenen Tumoren häufig mit einer schlechten Prognose einhergeht und den Progress fördert (108-110), erscheint eine weitergehende Untersuchung der WT1-abhängigen *HoxB9*-Regulation in den jeweiligen Tumorarten

sinnvoll. So sind die *Wt1*- und *HoxB9*-Expressionsniveaus bei vielen malignen Erkrankungen wie der myeloischen Leukämie, dem Ovarialkarzinom und Osteosarkom erhöht (57, 177-180).

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchte *HoxB9*-Regulation zeigt eine Aktivierung durch WT1 in den vom Osteosarkom abgeleiteten U2OS- und UB27-/UD28-Zellen (Abb. 13). In früheren Veröffentlichungen konnte bereits nachgewiesen werden, dass FAT10 über die Stimulation der *HoxB9*-Expression die Invasion, Metastasierung und den Prozess der EMT in U2OS-Zellen fördert (181). Weiterhin ließ sich durch Transfektion mit MicroRNA miR-557 die *HoxB9*-Expression in U2OS-Zellen hemmen und dadurch die EMT sowie die zelluläre Malignität reduzieren (182). Unter Berücksichtigung dieser Daten lässt sich spekulieren, dass die WT1-vermittelte Stimulation von *HoxB9* in den U2OS-Zellen einen invasiven zellulären Phänotyp begünstigt. Es bleibt abzuklären, ob *HoxB9* und WT1 in der Entwicklung und/ oder in Tumoren beim Prozess des EMT/MET kooperieren oder gegensätzlich wirken.

In den vom klarzelligen Nierenzellkarzinom abstammenden 786-0-Zellen wurde *HoxB9* durch WT1 gehemmt (Abb. 11B). In diesen Zellen scheint *HoxB9* hypermethyliert und in der Konsequenz herunterreguliert zu sein (183). Darüber hinaus wurde festgestellt, dass die Inhibition von *HoxB9* und *EGR1* durch miR-192 die Angiogenese in Ovarial- und Nierenkarzinommodellen hemmt (184). Andererseits fördert WT1, das zur EGR-Transkriptionsfaktorfamilie gehört und häufig in kleinen Tumorblutgefäßen exprimiert wird, möglicherweise die Tumorangio-genese (185). Es erscheint deshalb plausibel, dass die WT1-induzierte Expression von *HoxB9* in manchen Krebsarten pro-angiogene Mechanismen aktiviert. Dieser auch therapeutisch interessante Zusammenhang sollte in zukünftigen Arbeiten näher untersucht werden. Beispielsweise verursachte ein *WT1*-Knockout in endothelialen und hämatopoetisch abgeleiteten Zellen eine Regression der Tumovaskularisation und eine verbesserte Immunantwort, was zu einer verminderten Metastasierung, einer Regression etablierter Tumore und einem verbesserten Überleben führte (185).

Beide Proteine scheinen wichtige Regulatoren der embryonalen Entwicklung und der Tumorentstehung sowie -erhaltung zu sein. Eine tiefergehende Analyse der Interaktion in den genannten Prozessen sollte Bestandteil der zukünftigen Forschung sein.

## 4.2 Limitationen und Ausblick dieser Arbeit

Eine grundsätzliche Limitation dieser Arbeit stellt der Unterschied zwischen Organ-/Zellkulturen und der Situation *in vivo* dar. Mit den embryonalen Nierenkulturen wurde der Versuch unternommen, möglichst organtypische Bedingungen zu etablieren. Dass dies zumindest ansatzweise gelungen ist, lässt sich an der Ausbildung einer zunehmenden Anzahl von Nephronen während der Dauer der Kultivierung erkennen. Die Nierenentwicklung wird durch wechselseitige induktive Signale aus dem Mesenchym und dem einsprossenden Ureterepithel stimuliert (47). Das verwendete Organkulturmodell ermöglicht zwar, den summierten Effekt eines *Wt1*-Knockdowns auf die Genexpression in der Gesamtheit der embryonalen Niere zu ermitteln, allerdings ist die Analyse einzelner zellulärer Kompartimente nicht möglich. Einen aussichtsreichen experimentellen Ansatz, um das Zusammenwirken verschiedener Zelltypen während der Nephrogenese zu erforschen und die Rolle von WT1 besser zu definieren, bietet die Transkriptomanalyse mittels Einzelzellsequenzierungen.

In dieser Arbeit wurde *HoxB9* als ein neues WT1-Zielgen näher charakterisiert. Die durchgeführten Experimente basieren überwiegend auf *In-vitro*-Techniken. Eine Klärung der Frage, ob WT1 die *HoxB9*-Expression auch *in vivo* reguliert, bedarf zusätzlicher Untersuchungen. Hierfür könnte an Mäusen, bei denen *Wt1* zu definierten Zeitpunkten und in spezifischen Zelltypen der embryonalen Niere ausgeknockt wird, die Expression von *HoxB9* analysiert werden. Im nächsten Schritt ließe sich ggf. überprüfen, ob durch konditionellen Doppelknockout von *HoxB9* und *Wt1* die Auswirkungen eines *Wt1*-Verlustes auf die Nierenentwicklung der Maus abgeschwächt werden. Eine zumindest partielle Wiederherstellung der normalen Nierenentwicklung würde die Bedeutung von *HoxB9* als WT1-Zielgen und seine Rolle in der normalen Nierenentwicklung unterstreichen. Über die Rolle von *HoxB9* im Rahmen der Nierenentwicklung ist ebenfalls noch nicht viel bekannt. Ein Ansatz wäre die Charakterisierung weiterer Zielgene des Transkriptionsfaktors *HoxB9* mit Hilfe von Knockdown-Versuchen in der embryonalen Niere.

Ein weiterer limitierender Faktor dieser Arbeit ist die Verwendung der *in-situ*-RNA-Hybridisierung zur Detektion der *HoxB9*-Expression in der embryonalen Niere. In Ermangelung eines zuverlässigen Anti-*HoxB9*-Antikörpers konnte keine Immunhistochemie (IHC) durchgeführt werden, sodass sich nur eine sehr eingeschränkte Aussage über die *HoxB9*-Proteinexpression treffen lässt. Eine zukünftige Etablierung von

im murinen Organismus zuverlässig funktionierenden Antikörpern, könnte diesen limitierenden Faktor beheben.

Ob die Ergebnisse der WT1-abhängigen Repression von *HoxB9* in den Organkulturen und den mesonephrischen M15-Zellen auf den humanen Organismus übertragbar sind, bleibt zu klären. Die humanen, vom klarzelligen Adenokarzinom abstammenden 786-O-Zellen wiesen ebenfalls eine Repression von *HoxB9* auf, während die humanen, von einer embryonalen Niere abstammenden HEK293-Zellen eine *HoxB9*-Aktivierung durch WT1 aufzeigten. Weitere Untersuchungen in humanen Zelllinien könnten Aufschluss bezüglich der Übertragbarkeit der gewonnenen Daten auf den Menschen geben.

Weiterhin bleiben im Rahmen dieser Arbeit Fragen zum Mechanismus der bidirektionalen Regulation von *HoxB9* durch WT1 offen. Sind neben BASP1 weitere Kofaktoren für die WT1-abhängige *HoxB9*-Repression notwendig, die eventuell noch gar nicht identifiziert wurden? Ein Hinweis für diese Vermutung könnte sein, dass WT1 in allen untersuchten, endogen exprimierenden Zelllinien hemmend auf *HoxB9* wirkt, während eine WT1-Überexpression in WT1-defizienten Zellen *HoxB9* stimuliert. Weiterhin stellt sich die Frage nach der Beteiligung bekannter Korepressoren von WT1 wie z.B. Par-4, Cited2 oder p53, an der *HoxB9*-Regulation (20, 21, 23).

In dieser Arbeit wurde mittels Reporterassays gezeigt, dass BASP1 die WT1-abhängige *HoxB9*-Aktivierung verhindern kann. Ob BASP1 die reprimierende Wirkung von WT1 vermittelt, konnte nicht abschließend geklärt werden. Um diese Frage zu beantworten, müssten *BASP1*-Knockout-Zelllinien etabliert und an diesen die Auswirkungen auf die *HoxB9*-Expression analysiert werden.

Darüber hinaus wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit Histonmethylierungen als Ursache für die bidirektionale Regulation von *HoxB9* durch WT1 untersucht. Ob die *HoxB9*-Aktivierung durch das Fehlen der H3K27me<sub>3</sub>-Histonmethylierung in U2OS-Zellen unterstützt wird, bleibt abzuklären. Umfassendere Untersuchungen, die auch andere Histonmarkierungen wie z.B. die Acetylierung von H3K9 und H3K14 (H3K9ac und H3K14ac) einschließen, können neue Erkenntnisse liefern. Auch die Suche nach einer möglichen Beteiligung von CTCF an der *HoxB9*-Regulation erscheint vielversprechend. Bislang liegen nur Einzelberichte vor, wonach WT1 seine Zielgene über Veränderungen der Histonmethylierungen reguliert (174). Eine kritische Überprüfung dieser Beobachtungen kann ebenfalls ein Baustein zum besseren Verständnis der komplexen Mechanismen der Zielgen-Regulation durch WT1 sein.

Ein weiterer experimenteller Ansatz zur Klärung der bidirektionalen Regulation von *HoxB9* durch WT1 besteht in der Analyse des *HoxB9*-Promotor-DNA-Methylierungsstatus, die mittels Bisulfit-Sequenzierungen möglich ist. Auch eine zellkontextabhängige Phosphorylierung von WT1 kommt als Ursache für den komplexen Einfluss von WT1 auf die Expression von *HoxB9* in Frage. Tatsächlich kann WT1 durch die Proteinkinase A (PKA) und C (PKC) an Serinresten im zweiten und dritten Zinkfinger phosphoryliert werden, was eine Hemmung der DNA-abhängigen, transkriptionell reprimierenden Wirkung von WT1 bei unveränderter RNA-Bindungsaffinität bewirkt (26). Es lässt sich darüber spekulieren, ob WT1 in U2OS- und HEK293-Zellen phosphoryliert wird und dadurch seine reprimierende Wirkung auf den *HoxB9*-Promotor verliert.

In früheren Arbeiten wurde beschrieben, dass der *HoxB9*-Promotor eine Sekundärstruktur ausbildet (153). Ob diese Struktur die Affinität von WT1 zum *HoxB9*-Promotor erhöht, könnte ebenfalls eine Fragestellung für weitergehende Untersuchungen sein.

Abschließend sei nochmals auf die klinisch bedeutsame Rolle von WT1 und *HoxB9* in der Tumorentstehung und -progression hingewiesen. An Tumoren und Tumorzellen ist zu untersuchen, ob WT1 über die Regulation von *HoxB9* den Prozess des EMT verändert und die zelluläre Malignität beeinflusst. Die Erforschung der WT1-abhängigen *HoxB9*-Regulation kann ebenfalls zur Klärung der Frage beitragen, ob WT1 in unterschiedlichen Tumoren als Tumorsuppressor oder Onkogen anzusehen ist. Langfristig können die gewonnenen Erkenntnisse dazu beitragen, neue Therapieansätze für die Behandlung maligner Erkrankungen zu entwickeln.

## Literaturverzeichnis

1. Madden SL, Cook DM, Rauscher FJ, 3rd. A structure-function analysis of transcriptional repression mediated by the WT1, Wilms' tumor suppressor protein. *Oncogene*. 1993;8(7):1713-20.
2. Bharathavikru R, Dudnakova T, Aitken S, Slight J, Artibani M, Hohenstein P, Tollervey D, Hastie N. Transcription factor Wilms' tumor 1 regulates developmental RNAs through 3' UTR interaction. *Genes Dev*. 2017;31(4):347-52.
3. Toska E, Roberts SG. Mechanisms of transcriptional regulation by WT1 (Wilms' tumour 1). *Biochem J*. 2014;461(1):15-32.
4. 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 U S A*. 1991;88(21):9618-22.
5. Knudson AG, Jr., Strong LC. Mutation and cancer: a model for Wilms' tumor of the kidney. *J Natl Cancer Inst*. 1972;48(2):313-24.
6. Gessler M, König A, Bruns GA. The genomic organization and expression of the WT1 gene. *Genomics*. 1992;12(4):807-13.
7. Roberts SG. Transcriptional regulation by WT1 in development. *Curr Opin Genet Dev*. 2005;15(5):542-7.
8. Larsson SH, Charlieu JP, Miyagawa K, Engelkamp D, Rassoulzadegan M, Ross A, Cuzin F, van Heyningen V, Hastie ND. Subnuclear localization of WT1 in splicing or transcription factor domains is regulated by alternative splicing. *Cell*. 1995;81(3):391-401.
9. Morrison AA, Viney RL, Ladomery MR. The post-transcriptional roles of WT1, a multifunctional zinc-finger protein. *Biochim Biophys Acta*. 2008;1785(1):55-62.
10. Hammes A, Guo JK, Lutsch G, Leheste JR, Landrock D, Ziegler U, Gubler MC, Schedl A. Two splice variants of the Wilms' tumor 1 gene have distinct functions during sex determination and nephron formation. *Cell*. 2001;106(3):319-29.
11. Miller-Hodges E, Hohenstein P. WT1 in disease: shifting the epithelial-mesenchymal balance. *J Pathol*. 2012;226(2):229-40.
12. Scharnhorst V, van der Eb AJ, Jochemsen AG. WT1 proteins: functions in growth and differentiation. *Gene*. 2001;273(2):141-61.
13. Reddy JC, Morris JC, Wang J, English MA, Haber DA, Shi Y, Licht JD. WT1-mediated transcriptional activation is inhibited by dominant negative mutant proteins. *J Biol Chem*. 1995;270(18):10878-84.
14. Wang ZY, Qiu QQ, Enger KT, Deuel TF. A second transcriptionally active DNA-binding site for the Wilms tumor gene product, WT1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(19):8896-900.
15. McKay LM, Carpenter B, Roberts SG. Regulation of the Wilms' tumour suppressor protein transcriptional activation domain. *Oncogene*. 1999;18(47):6546-54.
16. Carpenter B, Hill KJ, Charalambous M, Wagner KJ, Lahiri D, James DI, Andersen JS, Schumacher V, Royer-Pokora B, Mann M, Ward A, Roberts SG. BASP1 is a transcriptional cosuppressor for the Wilms' tumor suppressor protein WT1. *Mol Cell Biol*. 2004;24(2):537-49.
17. Goodfellow SJ, Rebello MR, Toska E, Zeef LA, Rudd SG, Medler KF, Roberts SG. WT1 and its transcriptional cofactor BASP1 redirect the differentiation pathway of an established blood cell line. *Biochem J*. 2011;435(1):113-25.
18. Toska E, Campbell HA, Shandilya J, Goodfellow SJ, Shore P, Medler KF, Roberts SG. Repression of transcription by WT1-BASP1 requires the myristoylation of BASP1 and the PIP2-dependent recruitment of histone deacetylase. *Cell Rep*. 2012;2(3):462-9.

19. Toska E, Shandilya J, Goodfellow SJ, Medler KF, Roberts SG. Prohibitin is required for transcriptional repression by the WT1-BASP1 complex. *Oncogene*. 2014;33(43):5100-8.
20. Johnstone RW, See RH, Sells SF, Wang J, Muthukkumar S, Englert C, Haber DA, Licht JD, Sugrue SP, Roberts T, Rangnekar VM, Shi Y. A novel repressor, par-4, modulates transcription and growth suppression functions of the Wilms' tumor suppressor WT1. *Mol Cell Biol*. 1996;16(12):6945-56.
21. Val P, Martinez-Barbera JP, Swain A. Adrenal development is initiated by Cited2 and Wt1 through modulation of Sf-1 dosage. *Development*. 2007;134(12):2349-58.
22. Wang W, Lee SB, Palmer R, Ellisen LW, Haber DA. A functional interaction with CBP contributes to transcriptional activation by the Wilms tumor suppressor WT1. *J Biol Chem*. 2001;276(20):16810-6.
23. 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.
24. Maheswaran S, Park S, Bernard A, Morris JF, Rauscher FJ, 3rd, Hill DE, Haber DA. Physical and functional interaction between WT1 and p53 proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(11):5100-4.
25. Caricasole A, Duarte A, Larsson SH, Hastie ND, Little M, Holmes G, Todorov I, Ward A. RNA binding by the Wilms tumor suppressor zinc finger proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(15):7562-6.
26. Ye Y, Raychaudhuri B, Gurney A, Campbell CE, Williams BR. Regulation of WT1 by phosphorylation: inhibition of DNA binding, alteration of transcriptional activity and cellular translocation. *Embo j*. 1996;15(20):5606-15.
27. Davies JA, Lodomery M, Hohenstein P, Michael L, Shafe A, Spraggon L, Hastie N. Development of an siRNA-based method for repressing specific genes in renal organ culture and its use to show that the Wt1 tumour suppressor is required for nephron differentiation. *Hum Mol Genet*. 2004;13(2):235-46.
28. Sim EU, Smith A, Szilagi E, Rae F, Ioannou P, Lindsay MH, Little MH. Wnt-4 regulation by the Wilms' tumour suppressor gene, WT1. *Oncogene*. 2002;21(19):2948-60.
29. Ryan G, Steele-Perkins V, Morris JF, Rauscher FJ, 3rd, Dressler GR. Repression of Pax-2 by WT1 during normal kidney development. *Development*. 1995;121(3):867-75.
30. Lee SB, Huang K, Palmer R, Truong VB, Herzlinger D, Kolquist KA, Wong J, Paulding C, Yoon SK, Gerald W, Oliner JD, Haber DA. The Wilms tumor suppressor WT1 encodes a transcriptional activator of amphiregulin. *Cell*. 1999;98(5):663-73.
31. Kim HS, Kim MS, Hancock AL, Harper JC, Park JY, Poy G, Perantoni AO, Cam M, Malik K, Lee SB. Identification of novel Wilms' tumor suppressor gene target genes implicated in kidney development. *J Biol Chem*. 2007;282(22):16278-87.
32. Steege A, Föhling M, Paliege A, Bondke A, Kirschner KM, Martinka P, Kaps C, Patzak A, Persson PB, Thiele BJ, Scholz H, Mrowka R. Wilms' tumor protein (-KTS) modulates renin gene transcription. *Kidney Int*. 2008;74(4):458-66.
33. Dame C, Kirschner KM, Bartz KV, Wallach T, Hussels CS, Scholz H. Wilms tumor suppressor, Wt1, is a transcriptional activator of the erythropoietin gene. *Blood*. 2006;107(11):4282-90.
34. Dey BR, Sukhatme VP, Roberts AB, Sporn MB, Rauscher FJ, 3rd, Kim SJ. Repression of the transforming growth factor-beta 1 gene by the Wilms' tumor suppressor WT1 gene product. *Mol Endocrinol*. 1994;8(5):595-602.
35. Englert C, Hou X, Maheswaran S, Bennett P, Ngwu C, Re GG, Garvin AJ, Rosner MR, Haber DA. WT1 suppresses synthesis of the epidermal growth factor receptor and induces apoptosis. *The EMBO journal*. 1995;14(19):4662-75.

36. Werner H, Shen-Orr Z, Rauscher FJ, 3rd, Morris JF, Roberts CT, Jr., LeRoith D. Inhibition of cellular proliferation by the Wilms' tumor suppressor WT1 is associated with suppression of insulin-like growth factor I receptor gene expression. *Mol Cell Biol.* 1995;15(7):3516-22.
37. Szemes M, Dallosso AR, Melegh Z, Curry T, Li Y, Rivers C, Uney J, Mägdefrau AS, Schwiderski K, Park JH, Brown KW, Shandilya J, Roberts SG, Malik K. Control of epigenetic states by WT1 via regulation of de novo DNA methyltransferase 3A. *Hum Mol Genet.* 2013;22(1):74-83.
38. Hohenstein P, Hastie ND. The many facets of the Wilms' tumour gene, WT1. *Hum Mol Genet.* 2006;15 Spec No 2:R196-201.
39. Scholz H, Kirschner KM. A role for the Wilms' tumor protein WT1 in organ development. *Physiology (Bethesda).* 2005;20:54-9.
40. Alberta JA, Springett GM, Rayburn H, Natoli TA, Loring J, Kreidberg JA, Housman D. Role of the WT1 tumor suppressor in murine hematopoiesis. *Blood.* 2003;101(7):2570-4.
41. 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. *The EMBO journal.* 2002;21(6):1398-405.
42. 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.
43. 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.
44. Wagner N, Wagner KD, Theres H, Englert C, Schedl A, Scholz H. Coronary vessel development requires activation of the TrkB neurotrophin receptor by the Wilms' tumor transcription factor *Wt1*. *Genes Dev.* 2005;19(21):2631-42.
45. Herzer U, Crocoll A, Barton D, Howells N, Englert C. The Wilms tumor suppressor gene *wt1* is required for development of the spleen. *Curr Biol.* 1999;9(15):837-40.
46. Moore AW, McInnes L, Kreidberg J, Hastie ND, Schedl A. YAC complementation shows a requirement for *Wt1* in the development of epicardium, adrenal gland and throughout nephrogenesis. *Development.* 1999;126(9):1845-57.
47. Hastie ND. Wilms' tumour 1 (WT1) in development, homeostasis and disease. *Development.* 2017;144(16):2862-72.
48. Stark K, Vainio S, Vassileva G, McMahon AP. Epithelial transformation of metanephric mesenchyme in the developing kidney regulated by *Wnt-4*. *Nature.* 1994;372(6507):679-83.
49. Torban E, Braun F, Wanner N, Takano T, Goodyer PR, Lennon R, Ronco P, Cybulsky AV, Huber TB. From podocyte biology to novel cures for glomerular disease. *Kidney Int.* 2019;96(4):850-61.
50. Guo JK, Menke AL, Gubler MC, Clarke AR, Harrison D, Hammes A, Hastie ND, Schedl A. WT1 is a key regulator of podocyte function: reduced expression levels cause crescentic glomerulonephritis and mesangial sclerosis. *Hum Mol Genet.* 2002;11(6):651-9.
51. 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;5:4444.
52. Gao X, Chen X, Taglienti M, Rumballe B, Little MH, Kreidberg JA. Angioblast-mesenchyme induction of early kidney development is mediated by *Wt1* and *Vegfa*. *Development.* 2005;132(24):5437-49.

53. Martínez-Estrada OM, Lettice LA, Essafi A, Guadix JA, Slight J, Velecela V, Hall E, Reichmann J, Devenney PS, Hohenstein P, Hosen N, Hill RE, Muñoz-Chapuli R, Hastie ND. Wt1 is required for cardiovascular progenitor cell formation through transcriptional control of Snail and E-cadherin. *Nat Genet.* 2010;42(1):89-93.
54. Dongre A, Weinberg RA. New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer. *Nature reviews Molecular cell biology.* 2019;20(2):69-84.
55. Pleniceanu O, Harari-Steinberg O, Dekel B. Concise review: Kidney stem/progenitor cells: differentiate, sort out, or reprogram? *Stem Cells.* 2010;28(9):1649-60.
56. Menke AL, van der Eb AJ, Jochemsen AG. The Wilms' tumor 1 gene: oncogene or tumor suppressor gene? *Int Rev Cytol.* 1998;181:151-212.
57. Sugiyama H. Wilms' tumor gene WT1: its oncogenic function and clinical application. *Int J Hematol.* 2001;73(2):177-87.
58. Fraizer GC, Eisermann K, Pandey S, Brett-Morris A, Bazarov A, Nock S, Ghimirey N, Kuerbitz SJ. Functional Role of WT1 in Prostate Cancer. In: van den Heuvel-Eibrink MM, editor. *Wilms Tumor.* Brisbane (AU): Codon Publications Copyright: The Authors.; 2016.
59. Hylander B, Repasky E, Shrikant P, Intengan M, Beck A, Driscoll D, Singhal P, Lele S, Odunsi K. Expression of Wilms tumor gene (WT1) in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 2006;101(1):12-7.
60. Oji Y, Nakamori S, Fujikawa M, Nakatsuka S, Yokota A, Tatsumi N, Abeno S, Ikeba A, Takashima S, Tsujie M, Yamamoto H, Sakon M, Nezu R, Kawano K, Nishida S, Ikegame K, Kawakami M, Tsuboi A, Oka Y, Yoshikawa K, Aozasa K, Monden M, Sugiyama H. Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Sci.* 2004;95(7):583-7.
61. Koesters R, Linnebacher M, Coy JF, Germann A, Schwitalle Y, Findeisen P, von Knebel Doeberitz M. WT1 is a tumor-associated antigen in colon cancer that can be recognized by in vitro stimulated cytotoxic T cells. *Int J Cancer.* 2004;109(3):385-92.
62. Zhang Y, Yan WT, Yang ZY, Li YL, Tan XN, Jiang J, Zhang Y, Qi XW. The role of WT1 in breast cancer: clinical implications, biological effects and molecular mechanism. *Int J Biol Sci.* 2020;16(8):1474-80.
63. Loeb DM, Sukumar S. The role of WT1 in oncogenesis: tumor suppressor or oncogene? *Int J Hematol.* 2002;76(2):117-26.
64. Nishida S, Sugiyama H. Immunotherapy Targeting WT1: Designing a Protocol for WT1 Peptide-Based Cancer Vaccine. *Methods Mol Biol.* 2016;1467:221-32.
65. Rein LA, Chao NJ. WT1 vaccination in acute myeloid leukemia: new methods of implementing adoptive immunotherapy. *Expert Opin Investig Drugs.* 2014;23(3):417-26.
66. Gehring WJ, Hiromi Y. Homeotic genes and the homeobox. *Annu Rev Genet.* 1986;20:147-73.
67. Holland PW, Booth HA, Bruford EA. Classification and nomenclature of all human homeobox genes. *BMC biology.* 2007;5:47.
68. Apiou F, Flagiello D, Cillo C, Malfoy B, Poupon MF, Dutrillaux B. Fine mapping of human HOX gene clusters. *Cytogenet Cell Genet.* 1996;73(1-2):114-5.
69. Scott MP. Vertebrate homeobox gene nomenclature. *Cell.* 1992;71(4):551-3.
70. McGinnis W, Krumlauf R. Homeobox genes and axial patterning. *Cell.* 1992;68(2):283-302.
71. Acampora D, D'Esposito M, Faiella A, Pannese M, Migliaccio E, Morelli F, Stornaiuolo A, Nigro V, Simeone A, Boncinelli E. The human HOX gene family. *Nucleic Acids Res.* 1989;17(24):10385-402.

72. Irving C, Mason I. Signalling by FGF8 from the isthmus patterns anterior hindbrain and establishes the anterior limit of Hox gene expression. *Development*. 2000;127(1):177-86.
73. Boersma CJ, Bloemen M, Hendriks JM, van Berkel EA, Olijve W, van Zoelen EJ. Homeobox proteins as signal transduction intermediates in regulation of NCAM expression by recombinant human bone morphogenetic protein-2 in osteoblast-like cells. *Mol Cell Biol Res Commun*. 1999;1(2):117-24.
74. Hanson RD, Hess JL, Yu BD, Ernst P, van Lohuizen M, Berns A, van der Lugt NM, Shashikant CS, Ruddle FH, Seto M, Korsmeyer SJ. Mammalian Trithorax and polycomb-group homologues are antagonistic regulators of homeotic development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(25):14372-7.
75. Saleh M, Rambaldi I, Yang XJ, Featherstone MS. Cell signaling switches HOX-PBX complexes from repressors to activators of transcription mediated by histone deacetylases and histone acetyltransferases. *Mol Cell Biol*. 2000;20(22):8623-33.
76. Krumlauf R. Hox genes in vertebrate development. *Cell*. 1994;78(2):191-201.
77. Magli MC, Barba P, Celetti A, De Vita G, Cillo C, Boncinelli E. Coordinate regulation of HOX genes in human hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88(14):6348-52.
78. Galis F. Why do almost all mammals have seven cervical vertebrae? Developmental constraints, Hox genes, and cancer. *J Exp Zool*. 1999;285(1):19-26.
79. Srebrow A, Friedmann Y, Ravanpay A, Daniel CW, Bissell MJ. Expression of Hoxa-1 and Hoxb-7 is regulated by extracellular matrix-dependent signals in mammary epithelial cells. *J Cell Biochem*. 1998;69(4):377-91.
80. Graham A, Papalopulu N, Krumlauf R. The murine and Drosophila homeobox gene complexes have common features of organization and expression. *Cell*. 1989;57(3):367-78.
81. Lewis EB. A gene complex controlling segmentation in Drosophila. *Nature*. 1978;276(5688):565-70.
82. Cillo C, Barba P, Freschi G, Bucciarelli G, Magli MC, Boncinelli E. HOX gene expression in normal and neoplastic human kidney. *Int J Cancer*. 1992;51(6):892-7.
83. Greer JM, Puetz J, Thomas KR, Capecchi MR. Maintenance of functional equivalence during paralogous Hox gene evolution. *Nature*. 2000;403(6770):661-5.
84. Pan L, Xie Y, Black TA, Jones CA, Pruitt SC, Gross KW. An Abd-B class HOX.PBX recognition sequence is required for expression from the mouse Ren-1c gene. *J Biol Chem*. 2001;276(35):32489-94.
85. Shrestha B, Ansari KI, Bhan A, Kasiri S, Hussain I, Mandal SS. Homeodomain-containing protein HOXB9 regulates expression of growth and angiogenic factors, facilitates tumor growth in vitro and is overexpressed in breast cancer tissue. *Febs j*. 2012;279(19):3715-26.
86. Gentile C, Kmita M. Polycomb Repressive Complexes in Hox Gene Regulation: Silencing and Beyond: The Functional Dynamics of Polycomb Repressive Complexes in Hox Gene Regulation. *Bioessays*. 2020;42(10):e1900249.
87. Paro R. Propagating memory of transcriptional states. *Trends Genet*. 1995;11(8):295-7.
88. Satijn DP, Gunster MJ, van der Vlag J, Hamer KM, Schul W, Alkema MJ, Saurin AJ, Freemont PS, van Driel R, Otte AP. RING1 is associated with the polycomb group protein complex and acts as a transcriptional repressor. *Mol Cell Biol*. 1997;17(7):4105-13.

89. Cao R, Wang L, Wang H, Xia L, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Jones RS, Zhang Y. Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing. *Science*. 2002;298(5595):1039-43.
90. Shen X, Liu Y, Hsu YJ, Fujiwara Y, Kim J, Mao X, Yuan GC, Orkin SH. EZH1 mediates methylation on histone H3 lysine 27 and complements EZH2 in maintaining stem cell identity and executing pluripotency. *Mol Cell*. 2008;32(4):491-502.
91. Højfeldt JW, Hedehus L, Laugesen A, Tatar T, Wiehle L, Helin K. Non-core Subunits of the PRC2 Complex Are Collectively Required for Its Target-Site Specificity. *Mol Cell*. 2019;76(3):423-36.e3.
92. Suzuki M, Mizutani-Koseki Y, Fujimura Y, Miyagishima H, Kaneko T, Takada Y, Akasaka T, Tanzawa H, Takihara Y, Nakano M, Masumoto H, Vidal M, Isono K, Koseki H. Involvement of the Polycomb-group gene Ring1B in the specification of the anterior-posterior axis in mice. *Development*. 2002;129(18):4171-83.
93. Zaaroor-Regev D, de Bie P, Scheffner M, Noy T, Shemer R, Heled M, Stein I, Pikarsky E, Ciechanover A. Regulation of the polycomb protein Ring1B by self-ubiquitination or by E6-AP may have implications to the pathogenesis of Angelman syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(15):6788-93.
94. Chen L, Alexe G, Dharia NV, Ross L, Iniguez AB, Conway AS, Wang EJ, Veschi V, Lam N, Qi J, Gustafson WC, Nasholm N, Vazquez F, Weir BA, Cowley GS, Ali LD, Pantel S, Jiang G, Harrington WF, Lee Y, Goodale A, Lubonja R, Krill-Burger JM, Meyers RM, Tsherniak A, Root DE, Bradner JE, Golub TR, Roberts CW, Hahn WC, Weiss WA, Thiele CJ, Stegmaier K. CRISPR-Cas9 screen reveals a MYCN-amplified neuroblastoma dependency on EZH2. *J Clin Invest*. 2018;128(1):446-62.
95. Margueron R, Reinberg D. The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. *Nature*. 2011;469(7330):343-9.
96. Di Croce L, Helin K. Transcriptional regulation by Polycomb group proteins. *Nat Struct Mol Biol*. 2013;20(10):1147-55.
97. Mosammamaparast N, Shi Y. Reversal of histone methylation: biochemical and molecular mechanisms of histone demethylases. *Annu Rev Biochem*. 2010;79:155-79.
98. Chi P, Allis CD, Wang GG. Covalent histone modifications--miswritten, misinterpreted and mis-erased in human cancers. *Nat Rev Cancer*. 2010;10(7):457-69.
99. Wade PA, Pruss D, Wolffe AP. Histone acetylation: chromatin in action. *Trends Biochem Sci*. 1997;22(4):128-32.
100. Xu B, Konze KD, Jin J, Wang GG. Targeting EZH2 and PRC2 dependence as novel anticancer therapy. *Exp Hematol*. 2015;43(8):698-712.
101. Wellik DM. Hox genes and vertebrate axial pattern. *Curr Top Dev Biol*. 2009;88:257-78.
102. Patterson LT, Potter SS. Profiling gene expression in kidney development. *Nephron Exp Nephrol*. 2004;98(4):e109-13.
103. Chambeyron S, Da Silva NR, Lawson KA, Bickmore WA. Nuclear re-organisation of the Hoxb complex during mouse embryonic development. *Development (Cambridge, England)*. 2005;132(9):2215-23.
104. Chen F, Capecchi MR. Paralogous mouse Hox genes, Hoxa9, Hoxb9, and Hoxd9, function together to control development of the mammary gland in response to pregnancy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999;96(2):541-6.
105. Sakiyama J, Yokouchi Y, Kuroiwa A. Coordinated expression of Hoxb genes and signaling molecules during development of the chick respiratory tract. *Developmental biology*. 2000;227(1):12-27.

106. Magli MC, Largman C, Lawrence HJ. Effects of HOX homeobox genes in blood cell differentiation. *J Cell Physiol.* 1997;173(2):168-77.
107. Contarelli S, Fedele V, Melisi D. HOX Genes Family and Cancer: A Novel Role for Homeobox B9 in the Resistance to Anti-Angiogenic Therapies. *Cancers (Basel).* 2020;12(11).
108. Chiba N, Comaills V, Shiotani B, Takahashi F, Shimada T, Tajima K, Winokur D, Hayashida T, Willers H, Brachtel E, Vivanco MD, Haber DA, Zou L, Maheswaran S. Homeobox B9 induces epithelial-to-mesenchymal transition-associated radioresistance by accelerating DNA damage responses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(8):2760-5.
109. Huang K, Yuan R, Wang K, Hu J, Huang Z, Yan C, Shen W, Shao J. Overexpression of HOXB9 promotes metastasis and indicates poor prognosis in colon cancer. *Chin J Cancer Res.* 2014;26(1):72-80.
110. Carbone C, Piro G, Simionato F, Ligorio F, Cremolini C, Loupakis F, Ali G, Rossini D, Merz V, Santoro R, Zecchetto C, Zanotto M, Di Nicolantonio F, Bardelli A, Fontanini G, Tortora G, Melisi D. Homeobox B9 Mediates Resistance to Anti-VEGF Therapy in Colorectal Cancer Patients. *Clin Cancer Res.* 2017;23(15):4312-22.
111. Wan J, Liu H, Feng Q, Liu J, Ming L. HOXB9 promotes endometrial cancer progression by targeting E2F3. *Cell Death Dis.* 2018;9(5):509.
112. Zhussupova A, Hayashida T, Takahashi M, Miyao K, Okazaki H, Jinno H, Kitagawa Y. An E2F1-HOXB9 transcriptional circuit is associated with breast cancer progression. *PLoS One.* 2014;9(8):e105285.
113. Hayashida T, Takahashi F, Chiba N, Brachtel E, Takahashi M, Godin-Heymann N, Gross KW, Vivanco M, Wijendran V, Shioda T, Sgroi D, Donahoe PK, Maheswaran S. HOXB9, a gene overexpressed in breast cancer, promotes tumorigenicity and lung metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(3):1100-5.
114. Nguyen DX, Chiang AC, Zhang XH, Kim JY, Kris MG, Ladanyi M, Gerald WL, Massagué J. WNT/TCF signaling through LEF1 and HOXB9 mediates lung adenocarcinoma metastasis. *Cell.* 2009;138(1):51-62.
115. Sha L, Dong L, Lv L, Bai L, Ji X. HOXB9 promotes epithelial-to-mesenchymal transition via transforming growth factor- $\beta$ 1 pathway in hepatocellular carcinoma cells. *Clin Exp Med.* 2015;15(1):55-64.
116. Xue M, Zhu FY, Chen L, Wang K. HoxB9 promotes the migration and invasion via TGF- $\beta$ 1/Smad2/Slug signaling pathway in oral squamous cell carcinoma. *Am J Transl Res.* 2017;9(3):1151-61.
117. Sun X, Song J, Zhang J, Zhan J, Fang W, Zhang H. Acetylated HOXB9 at lysine 27 is of differential diagnostic value in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma. *Front Med.* 2020;14(1):91-100.
118. Xu H, Wu S, Shen X, Wu D, Qin Z, Wang H, Chen X, Sun X. Silencing of HOXB9 suppresses cellular proliferation, angiogenesis, migration and invasion of prostate cancer cells. *J Biosci.* 2020;45.
119. Chang Q, Zhang L, He C, Zhang B, Zhang J, Liu B, Zeng N, Zhu Z. HOXB9 induction of mesenchymal-to-epithelial transition in gastric carcinoma is negatively regulated by its hexapeptide motif. *Oncotarget.* 2015;6(40):42838-53.
120. Wan J, Xu W, Zhan J, Ma J, Li X, Xie Y, Wang J, Zhu WG, Luo J, Zhang H. PCAF-mediated acetylation of transcriptional factor HOXB9 suppresses lung adenocarcinoma progression by targeting oncogenic protein JMJD6. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(22):10662-75.

121. Song J, Wang T, Xu W, Wang P, Wan J, Wang Y, Zhan J, Zhang H. HOXB9 acetylation at K27 is responsible for its suppression of colon cancer progression. *Cancer Lett.* 2018;426:63-72.
122. Berry RL, Ozdemir DD, Aronow B, Lindström NO, Dudnakova T, Thornburn A, Perry P, Baldock R, Armit C, Joshi A, Jeanpierre C, Shan J, Vainio S, Baily J, Brownstein D, Davies J, Hastie ND, Hohenstein P. Deducing the stage of origin of Wilms' tumours from a developmental series of Wt1-mutant mice. *Dis Model Mech.* 2015;8(8):903-17.
123. Jacobi CL, Rudigier LJ, Scholz H, Kirschner KM. Transcriptional regulation by the Wilms tumor protein, Wt1, suggests a role of the metalloproteinase Adamts16 in murine genitourinary development. *J Biol Chem.* 2013;288(26):18811-24.
124. Kirschner KM, Braun JF, Jacobi CL, Rudigier LJ, Persson AB, Scholz H. Amine oxidase copper-containing 1 (AOC1) is a downstream target gene of the Wilms tumor protein, WT1, during kidney development. *J Biol Chem.* 2014;289(35):24452-62.
125. Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol.* 1977;36(1):59-74.
126. Williams RD, Elliott AY, Stein N, Fraley EE. In vitro cultivation of human renal cell cancer. I. Establishment of cells in culture. *In Vitro.* 1976;12(9):623-7.
127. Sciesielski LK, Kirschner KM, Scholz H, Persson AB. Wilms' tumor protein Wt1 regulates the Interleukin-10 (IL-10) gene. *FEBS Lett.* 2010;584(22):4665-71.
128. 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;619:21-9.
129. Hartwig S, Ho J, Pandey P, Macisaac 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(7):1189-203.
130. Agrawal N, Dasaradhi PV, Mohammed A, Malhotra P, Bhatnagar RK, Mukherjee SK. RNA interference: biology, mechanism, and applications. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2003;67(4):657-85.
131. Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature.* 2001;411(6836):494-8.
132. Martens LK, Kirschner KM, Warnecke C, Scholz H. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) is a transcriptional activator of the TrkB neurotrophin receptor gene. *J Biol Chem.* 2007;282(19):14379-88.
133. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-Delta Delta C(T)</sup> Method. *Methods.* 2001;25(4):402-8.
134. Warburg O, Christian W. Isolation and crystallization of enolase. *Biochem.* 1942;Z.310:384-421.
135. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227(5259):680-5.
136. Krueger K, Catanese L, Sciesielski LK, Kirschner KM, Scholz H. Deletion of an intronic HIF-2 $\alpha$  binding site suppresses hypoxia-induced WT1 expression. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech.* 2019;1862(1):71-83.
137. Kirschner KM, Sciesielski LK, Krueger K, Scholz H. Wilms tumor protein-dependent transcription of VEGF receptor 2 and hypoxia regulate expression of the testis-promoting gene Sox9 in murine embryonic gonads. *J Biol Chem.* 2017;292(49):20281-91.

138. Wang F, Flanagan J, Su N, Wang LC, Bui S, Nielson A, Wu X, Vo HT, Ma XJ, Luo Y. RNAscope: a novel in situ RNA analysis platform for formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *J Mol Diagn.* 2012;14(1):22-9.
139. Münch J, Kirschner KM, Schlee H, Kraus C, Schönauer R, Jin W, Le Duc D, Scholz H, Halbritter J. Autosomal dominant polycystic kidney disease in absence of renal cyst formation illustrates genetic interaction between WT1 and PKD1. *J Med Genet.* 2020.
140. Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, Norville JE, Church GM. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science.* 2013;339(6121):823-6.
141. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science.* 2012;337(6096):816-21.
142. Horvath P, Barrangou R. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science.* 2010;327(5962):167-70.
143. Bhaya D, Davison M, Barrangou R. CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: versatile small RNAs for adaptive defense and regulation. *Annu Rev Genet.* 2011;45:273-97.
144. Makarova KS, Haft DH, Barrangou R, Brouns SJ, Charpentier E, Horvath P, Moineau S, Mojica FJ, Wolf YI, Yakunin AF, van der Oost J, Koonin EV. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol.* 2011;9(6):467-77.
145. Naito Y, Hino K, Bono H, Ui-Tei K. CRISPRdirect: software for designing CRISPR/Cas guide RNA with reduced off-target sites. *Bioinformatics.* 2015;31(7):1120-3.
146. Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature protocols.* 2013;8(11):2281-308.
147. Gao F, Maiti S, Alam N, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, Lécureuil C, Guillou F, Huff V. The Wilms tumor gene, *Wt1*, is required for *Sox9* expression and maintenance of tubular architecture in the developing testis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(32):11987-92.
148. Kim MK, McGarry TJ, P OB, Flatow JM, Golden AA, Licht JD. An integrated genome screen identifies the Wnt signaling pathway as a major target of WT1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(27):11154-9.
149. Brunskill EW, Georgas K, Rumballe B, Little MH, Potter SS. Defining the molecular character of the developing and adult kidney podocyte. *PLoS One.* 2011;6(9):e24640.
150. Lefebvre J, Clarkson M, Massa F, Bradford ST, Charlet A, Buske F, Lacas-Gervais S, Schulz H, Gimpel C, Hata Y, Schaefer F, Schedl A. Alternatively spliced isoforms of WT1 control podocyte-specific gene expression. *Kidney Int.* 2015;88(2):321-31.
151. Patterson LT, Potter SS. Atlas of Hox gene expression in the developing kidney. *Dev Dyn.* 2004;229(4):771-9.
152. Ullmark T, Montano G, Gullberg U. DNA and RNA binding by the Wilms' tumour gene 1 (WT1) protein +KTS and -KTS isoforms-From initial observations to recent global genomic analyses. *Eur J Haematol.* 2018;100(3):229-40.
153. Yamagishi T, Hirose S, Kondo T. Secondary DNA structure formation for Hoxb9 promoter and identification of its specific binding protein. *Nucleic Acids Res.* 2008;36(6):1965-75.
154. Kondo T, Takahashi N, Muramatsu M. The regulation of the murine Hox-2.5 gene expression during cell differentiation. *Nucleic Acids Res.* 1992;20(21):5729-35.
155. Feng H, Tillman H, Wu G, Davidoff AM, Yang J. Frequent epigenetic alterations in polycomb repressive complex 2 in osteosarcoma cell lines. *Oncotarget.* 2018;9(43):27087-91.

156. McCabe MT, Ott HM, Ganji G, Korenchuk S, Thompson C, Van Aller GS, Liu Y, Graves AP, Della Pietra A, 3rd, Diaz E, LaFrance LV, Mellinger M, Duquenne C, Tian X, Kruger RG, McHugh CF, Brandt M, Miller WH, Dhanak D, Verma SK, Tummino PJ, Creasy CL. EZH2 inhibition as a therapeutic strategy for lymphoma with EZH2-activating mutations. *Nature*. 2012;492(7427):108-12.
157. Knutson SK, Kawano S, Minoshima Y, Warholic NM, Huang KC, Xiao Y, Kadowaki T, Uesugi M, Kuznetsov G, Kumar N, Wigle TJ, Klaus CR, Allain CJ, Raimondi A, Waters NJ, Smith JJ, Porter-Scott M, Chesworth R, Moyer MP, Copeland RA, Richon VM, Uenaka T, Pollock RM, Kuntz KW, Yokoi A, Keilhack H. Selective inhibition of EZH2 by EPZ-6438 leads to potent antitumor activity in EZH2-mutant non-Hodgkin lymphoma. *Mol Cancer Ther*. 2014;13(4):842-54.
158. Belali T, Wodi C, Clark B, Cheung MK, Craig TJ, Wheway G, Wagner N, Wagner KD, Roberts S, Porazinski S, Ladomery M. WT1 activates transcription of the splice factor kinase SRPK1 gene in PC3 and K562 cancer cells in the absence of corepressor BASP1. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech*. 2020;1863(12):194642.
159. Pelletier J, Schalling M, Buckler AJ, Rogers A, Haber DA, Housman D. Expression of the Wilms' tumor gene WT1 in the murine urogenital system. *Genes Dev*. 1991;5(8):1345-56.
160. Mundlos S, Pelletier J, Darveau A, Bachmann M, Winterpacht A, Zabel B. Nuclear localization of the protein encoded by the Wilms' tumor gene WT1 in embryonic and adult tissues. *Development*. 1993;119(4):1329-41.
161. Wagner KJ, Roberts SG. Transcriptional regulation by the Wilms' tumour suppressor protein WT1. *Biochem Soc Trans*. 2004;32(Pt 6):932-5.
162. Pritchard-Jones K, Fleming S, Davidson D, Bickmore W, Porteous D, Gosden C, Bard J, Buckler A, Pelletier J, Housman D, et al. The candidate Wilms' tumour gene is involved in genitourinary development. *Nature*. 1990;346(6280):194-7.
163. Zhang H, Pu W, Li G, Huang X, He L, Tian X, Liu Q, Zhang L, Wu SM, Sucov HM, Zhou B. Endocardium Minimally Contributes to Coronary Endothelium in the Embryonic Ventricular Free Walls. *Circ Res*. 2016;118(12):1880-93.
164. Suffee N, Moore-Morris T, Farahmand P, Rücker-Martin C, Dilanian G, Fradet M, Sawaki D, Derumeaux G, LePrince P, Clément K, Dugail I, Puceat M, Hatem SN. Atrial natriuretic peptide regulates adipose tissue accumulation in adult atria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(5):E771-e80.
165. Schneider R, Deutsch K, Hoepflich GJ, Marquez J, Hermle T, Braun DA, Seltzmann S, Kitzler TM, Mao Y, Buerger F, Majmundar AJ, Onuchic-Whitford AC, Kolvenbach CM, Schierbaum L, Schneider S, Halawi AA, Nakayama M, Mann N, Connaughton DM, Klämbt V, Wagner M, Riedhammer KM, Renders L, Katsura Y, Thumkeo D, Soliman NA, Mane S, Lifton RP, Shril S, Khokha MK, Hoefele J, Goode BL, Hildebrandt F. DAAM2 Variants Cause Nephrotic Syndrome via Actin Dysregulation. *Am J Hum Genet*. 2020;107(6):1113-28.
166. Faulhaber-Walter R, Jiang L, Mizel D, Zervas PM, Kopp JB, Schnermann JB, Chen L, Schiffer M. Podocyte Density and Albuminuria in Aging Diabetic Ins2± Mice with or Without Adenosine A1 Receptor Signaling. *Int J Nephrol Renovasc Dis*. 2020;13:19-26.
167. Andikyan V, Taylor HS. WT1 represses HOX gene expression in the regulation of gynaecologic tumour histologic type. *J Cell Mol Med*. 2009;13(11-12):4522-31.
168. Hewitt SM, Fraizer GC, Wu YJ, Rauscher FJ, 3rd, Saunders GF. Differential function of Wilms' tumor gene WT1 splice isoforms in transcriptional regulation. *J Biol Chem*. 1996;271(15):8588-92.
169. Gurudatta BV, Corces VG. Wt1 flip-flops chromatin in a CTCF domain. *Dev Cell*. 2011;21(3):389-90.

170. Essafi A, Webb A, Berry RL, Slight J, Burn SF, Spraggon L, Velecela V, Martinez-Estrada OM, Wiltshire JH, Roberts SG, Brownstein D, Davies JA, Hastie ND, Hohenstein P. A wt1-controlled chromatin switching mechanism underpins tissue-specific wnt4 activation and repression. *Dev Cell*. 2011;21(3):559-74.
171. Green LM, Wagner KJ, Campbell HA, Addison K, Roberts SG. Dynamic interaction between WT1 and BASP1 in transcriptional regulation during differentiation. *Nucleic acids research*. 2009;37(2):431-40.
172. Easwaran H, Johnstone SE, Van Neste L, Ohm J, Mosbrugger T, Wang Q, Aryee MJ, Joyce P, Ahuja N, Weisenberger D, Collisson E, Zhu J, Yegnasubramanian S, Matsui W, Baylin SB. A DNA hypermethylation module for the stem/progenitor cell signature of cancer. *Genome Res*. 2012;22(5):837-49.
173. Sachs M, Onodera C, Blaschke K, Ebata KT, Song JS, Ramalho-Santos M. Bivalent chromatin marks developmental regulatory genes in the mouse embryonic germline in vivo. *Cell Rep*. 2013;3(6):1777-84.
174. Xu B, Zeng DQ, Wu Y, Zheng R, Gu L, Lin X, Hua X, Jin GH. Tumor suppressor menin represses paired box gene 2 expression via Wilms tumor suppressor protein-polycomb group complex. *J Biol Chem*. 2011;286(16):13937-44.
175. Beckwith JB, Kiviat NB, Bonadio JF. Nephrogenic rests, nephroblastomatosis, and the pathogenesis of Wilms' tumor. *Pediatr Pathol*. 1990;10(1-2):1-36.
176. Artibani M, Sims AH, Slight J, Aitken S, Thornburn A, Muir M, Brunton VG, Del-Pozo J, Morrison LR, Katz E, Hastie ND, Hohenstein P. WT1 expression in breast cancer disrupts the epithelial/mesenchymal balance of tumour cells and correlates with the metabolic response to docetaxel. *Scientific reports*. 2017;7:45255.
177. Liu Z, Yamanouchi K, Ohtao T, Matsumura S, Seino M, Shridhar V, Takahashi T, Takahashi K, Kurachi H. High levels of Wilms' tumor 1 (WT1) expression were associated with aggressive clinical features in ovarian cancer. *Anticancer Res*. 2014;34(5):2331-40.
178. 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 science*. 2003;94(3):271-6.
179. Alharbi RA, Pandha HS, Simpson GR, Pettengell R, Poterlowicz K, Thompson A, Harrington K, El-Tanani M, Morgan R. Inhibition of HOX/PBX dimer formation leads to necroptosis in acute myeloid leukemia cells. *Oncotarget*. 2017;8(52):89566-79.
180. Kelly Z, Moller-Levet C, McGrath S, Butler-Manuel S, Kavitha Madhuri T, Kierzek AM, Pandha H, Morgan R, Michael A. The prognostic significance of specific HOX gene expression patterns in ovarian cancer. *International journal of cancer*. 2016;139(7):1608-17.
181. Ma C, Zhang Z, Cui Y, Yuan H, Wang F. Silencing FAT10 inhibits metastasis of osteosarcoma. *Int J Oncol*. 2016;49(2):666-74.
182. Wang Y, Hao W, Wang H. miR-557 suppressed the malignant behaviours of osteosarcoma cells by reducing HOXB9 and deactivating the EMT process. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*. 2021;49(1):230-9.
183. Wang Y, Guo X, Bray MJ, Ding Z, Zhao Z. An integrative genomics approach for identifying novel functional consequences of PBRM1 truncated mutations in clear cell renal cell carcinoma (ccRCC). *BMC Genomics*. 2016;17 Suppl 7(Suppl 7):515.
184. Wu SY, Rupaimoole R, Shen F, Pradeep S, Pecot CV, Ivan C, Nagaraja AS, Gharpure KM, Pham E, Hatakeyama H, McGuire MH, Haemmerle M, Vidal-Anaya V, Olsen C, Rodriguez-Aguayo C, Filant J, Ehsanipour EA, Herbrich SM, Maiti SN, Huang L, Kim JH, Zhang X, Han HD, Armaiz-Pena GN, Seviour EG, Tucker S, Zhang M, Yang D, Cooper LJ, Ali-Fehmi R, Bar-Eli M, Lee JS, Ram PT, Baggerly KA, Lopez-Berestein

G, Hung MC, Sood AK. A miR-192-EGR1-HOXB9 regulatory network controls the angiogenic switch in cancer. *Nat Commun.* 2016;7:11169.

185. Wagner KD, Cherfils-Vicini J, Hosen N, Hohenstein P, Gilson E, Hastie ND, Michiels JF, Wagner N. The Wilms' tumour suppressor Wt1 is a major regulator of tumour angiogenesis and progression. *Nat Commun.* 2014;5:5852.

## Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Valentin Schmidt, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Wilms-Tumor-Protein (WT1) abhängige Genexpression während der Nierenentwicklung“ / „Wilms' tumor protein (WT1) dependent gene expression in kidney development“ 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/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; [www.icmje.org](http://www.icmje.org)) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

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

bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

## **Curriculum Vitae**

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

## **Publikationsliste**

Schmidt V, Kirschner KM. Alternative pre-mRNA splicing. *Acta Physiol (Oxf)*. 2018 Apr;222(4):e13053. doi: 10.1111/apha.13053. Epub 2018 Mar 5. PMID: 29443453.

## **Danksagung**

Zunächst möchte ich mich herzlich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Scholz für die angenehme und freundliche Atmosphäre sowie die konstruktiven Ratschläge hinsichtlich meiner Arbeit bedanken.

Für die Einarbeitung, die Unterstützung beim Erlernen unterschiedlicher molekularbiologischer Techniken sowie die große Hilfsbereitschaft bei allen möglichen Problemen im Labor danke ich Ulrike Neumann. Bei Frau Dr. Karin Kirschner möchte ich mich für die zahlreichen Denkanstöße und Ideen sowie die Unterstützung bei den Tierexperimenten bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Holger Scholz für die stete Förderung und hervorragende Betreuung meiner Doktorarbeit – sowohl fachlich als auch persönlich. Die Bereitstellung dieses interessanten Forschungsthemas, die unzähligen aufschlussreichen wissenschaftlichen Diskussionen und Anregungen sowie die kritische und hilfreiche Durchsicht meiner Dissertation weiß ich sehr zu schätzen.

Ebenfalls möchte ich mich beim Berlin Institute of Health (BIH) für die Förderung meiner Promotion bedanken.

Abschließend ist es mir ein großes Anliegen, mich von Herzen bei meiner Familie für die einzigartige Unterstützung zu bedanken: Ein riesiges Dankeschön an meine Freundin Denise Engler und meine Eltern für die häufigen Aufmunterungen, wenn ein Experiment mal wieder nicht funktioniert hat, die kritische Korrektur meiner Arbeit, euer Verständnis und eure Hilfe, ohne die das alles nicht möglich gewesen wäre.