

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

DISSERTATION

Sauerstoffabhängige Regulation des Wilms-Tumor Gens WT1  
in Neuroblastomzellen

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Lorenzo Riccardo Tancredi Luigi Giuseppe Catanese

aus Pisa

Datum der Promotion: 04.03.2022

## **Vorwort**

Teile der Ergebnisse dieser Arbeit sind bereits in der Publikation:

Krueger, K., Catanese, L., Sciesielski, L.K., Kirschner, K.M., Scholz, H.:

Deletion of an intronic HIF-2 $\alpha$  binding site suppresses hypoxia-induced WT1 expression.

BBA-Gene Regul Mech. 2019;1862(1):71-83.

Pubmed: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30468780?dopt=Citation>

DOI: 10.1016/j.bbagrm.2018.11.003

in Zusammenarbeit mit oben genannten Autoren veröffentlicht worden.

## **Inhaltsverzeichnis**

Abbildungsverzeichnis .....	7
Tabellenverzeichnis .....	8
Abkürzungsverzeichnis .....	9
Zusammenfassung .....	12
Abstract .....	14
1 Einleitung.....	15
1.1 Das Neuroblastom.....	15
1.2 Hypoxie .....	16
1.2.1 Hypoxische Genregulation durch Hypoxie-induzierbare Faktoren .....	16
1.2.2 Hypoxie in Tumoren .....	19
1.2.3 Hypoxie und HIF in Neuroblastomen.....	20
1.3 WT1.....	21
1.3.1 Der Wilms-Tumor-Transkriptionsfaktor.....	21
1.3.2 WT1 in der Embryo- und Organogenese.....	22
1.3.3 WT1 im adulten Organismus.....	23
1.3.4 Der Transkriptionsfaktor WT1 und seine Zielgene .....	24
1.3.5 Die Rolle von WT1 in verschiedenen Tumoren .....	24
2 Fragestellung.....	26
3 Materialien und Methoden .....	28
3.1.1 Bezugsquellen.....	28
3.1.2 Geräteliste.....	30
3.1.3 Chemikalien .....	31
3.1.4 Lösungen und Puffer .....	33
3.2 Primer und Oligonukleotide .....	34
3.3 Methoden der Zellkultur.....	36
3.3.1 Kultivierung und Konservierung von Zelllinien.....	36

3.3.2	Versuche unter Hypoxie und unter Verwendung von Hypoxiemimetika ..	37
3.3.3	Transiente Transfektionen.....	38
3.3.4	Knockdown mittels RNA-Interferenz (siRNA) .....	38
3.3.5	Transwell-Migrationsassays .....	39
3.4	Molekularbiologische Methoden .....	41
3.4.1	CRISPR/Cas9 Knockout von HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$ und WT1 in Kelly-Neuroblastomzellen .....	41
3.4.2	RNA-Extraktion .....	47
3.4.3	Bestimmung der optischen Dichte: Konzentrationsbestimmung von DNA, RNA und Protein .....	47
3.4.4	Reverse Transkription .....	48
3.4.5	SDS-Page und Western Blot.....	48
3.4.6	Antikörper.....	49
3.4.7	Quantitative RT-PCR.....	49
3.4.8	Chromatinimmunopräzipitation (ChIP) .....	50
3.4.9	Gewinnung von Kernextrakten für EMSA.....	52
3.4.10	Elektromobilitätsshiftassay (EMSA).....	53
3.4.11	Reporter-Assays .....	54
3.5	Analyse bioinformatischer Datensätze .....	55
3.5.1	R2-Datenbankanalysen.....	55
3.5.2	Kaplan-Meier-Scan.....	55
3.6	Statistik.....	58
4	Ergebnisse.....	59
4.1	Hypoxische WT1 Expression in Neuroblastomzelllinien .....	59
4.1.1	WT1 Genexpression in verschiedenen Neuroblastomzelllinien.....	59
4.1.2	Hypoxieinduzierbarkeit der WT1 Expression in Kelly-Zellen .....	60
4.2	Regulation der WT1 Expression durch Hypoxie-induzierbare Faktoren .....	61

4.2.1 HIF-2 $\alpha$ Silencing durch siRNA verringert die Hypoxieinduzierbarkeit von WT1 .....	61
4.2.2 CRISPR/Cas9 Knockout von HIF-2 $\alpha$ eliminiert die Hypoxieinduzierbarkeit von WT1 .....	63
4.3 Regulationsmechanismus der hypoxischen WT1 Expression .....	67
4.3.1 Identifikation von potentiellen HIF-Bindungsstellen mit Hilfe des UCSC Genome Browsers in Intron 3 des <i>WT1</i> -Genlocus .....	67
4.3.2 HIF-1 $\alpha$ und HIF-2 $\alpha$ interagieren mit potenzieller HBS in Intron 3 des WT1 Gens .....	69
4.3.3 Die HBS in Intron 3 bindet HIF-1 $\alpha$ und HIF-2 $\alpha$ und ist Bestandteil eines hypoxiesensitiven Enhancers .....	71
4.4 Auswirkungen hoher WT1 und HIF-2 $\alpha$ Expression auf Neuroblastome .....	74
4.4.1 Hohe WT1-Expression korreliert mit geringerem Gesamtüberleben und geringerem rezidivfreien Überleben von Neuroblastompatienten .....	74
4.4.2 Hohe <i>WT1</i> -Expression korreliert mit geringerem rezidivfreien Überleben von Neuroblastompatienten ohne <i>MYCN</i> -Amplifikation .....	75
4.4.3 Hohe <i>WT1</i> -Expression korreliert mit geringerem ereignisfreien Überleben in Neuroblastompatienten in nicht fortgeschrittenen Diagnosestadien .....	77
4.4.4 Hohe <i>HIF-2<math>\alpha</math></i> -Expression korreliert mit geringerem Gesamtüberleben bei Neuroblastompatienten .....	77
4.5 Funktionelle Aspekte der WT1 Expression in Neuroblastomen .....	78
4.5.1 Silencing von WT1 inhibiert die Migration von SK-N-AS-Neuroblastomzellen im Transwellassay .....	78
5 Diskussion .....	80
5.1 Hypoxische WT1-Expression in Neuroblastomzelllinien .....	80
5.2 HIF-2 $\alpha$ vermittelte hypoxische WT1 Expression in Kelly-Neuroblastomzellen .....	82
5.3 Funktionelle Aspekte von Hypoxie, HIF- und WT1-Expression in Neuroblastomen .....	84
5.4 Die Bedeutung von HIF und WT1 in der Therapie von primären Neuroblastomen .....	87

6 Ausblick .....	90
8 Literaturverzeichnis .....	91
Eidesstattliche Versicherung .....	107
Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen .....	107
Lebenslauf .....	109
Publikationsliste .....	113
Danksagung .....	114

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schema des Mechanismus zur Regulation von HIF- 1 $\alpha$ .	17
Abbildung 2: Schematischer Aufbau der verschiedenen HIF-Isoformen.	18
Abbildung 3: Generierung eines binären Bildes aus der Aufnahme eines mikroskopischen Bildes der fixierten Filter aus einem der Transwellmigrationsassays.	40
Abbildung 4: Schematische Darstellung der sequenzspezifischen DNA-Interaktion der Cas9 mittels sgRNA	41
Abbildung 5: Schematische Darstellung des CRISPR/Cas9 GFP-gekoppelten Klonierungsplasmids pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458) von AddGene.	43
Abbildung 6: Western Blot der Gesamtzelllysate verschiedener Neuroblastomzelllinien mit oder ohne MYCN-Amplifikation.	60
Abbildung 7: Sauerstoffabhängige Expression von WT1 in Kelly-Zellen.	61
Abbildung 8: Silencing von HIF-1 $\alpha$ und HIF-2 $\alpha$ reduziert die mRNA Expression von CA9 bzw. EPO in hypoxischen Kelly-Zellen.	62
Abbildung 9: Knockdown von HIF-2 $\alpha$ reduziert die WT1 Expression in hypoxischen Kelly-Zellen.	63
Abbildung 10: Ergebnisse der Sequenzierung des CRISPR/Cas9 vermittelten Knockouts von HIF-1 $\alpha$ (A) bzw. HIF-2 $\alpha$ (B).	64
Abbildung 11: CRISPR/Cas9 Knockout von HIF-1 $\alpha$ und HIF-2 $\alpha$ in Kelly-Neuroblastomzellen.	66
Abbildung 12: Screenshot aus dem UCSC Genome Browser für den WT1 Genlocus.	68
Abbildung 13: Zoom des Screenshots aus dem UCSC Genome Browser.	69
Abbildung 14: Chromatinimmunopräzipitation.	70
Abbildung 15: Elektromobilitätsshiftassay mit Kernextrakten von Kelly-Zellen.	72
Abbildung 16: Luciferase-Reporterassays.	74
Abbildung 17: Überleben von Neuroblastompatienten nach WT1-Expression.	75
Abbildung 18: Überleben nach WT1-Expression ohne MYCN-Amplifikation (1).	76
Abbildung 19: Überleben nach WT1-Expression ohne MYCN-Amplifikation (2).	77
Abbildung 20: Überlebensunterschiede nach Expression von HIF-2 $\alpha$ in Tumoren mit (A) und ohne MYCN-Amplifikation (B).	78
Abbildung 21: Knockdown von WT1 hemmt die Migration von SK-N-AS-Neuroblastomzellen.	79

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Kommerzielle Bezugsquellen mit Firmensitz. ....	28
Tabelle 2: Geräteliste mit Beschreibung, Bezeichnung und Hersteller. ....	30
Tabelle 3: Verwendete Chemikalien mit Bezeichnung und Hersteller. ....	31
Tabelle 4: Lösungen und Puffer mit Bezeichnung und Zusammensetzung. ....	33
Tabelle 5: RT-qPCR-Primer und CHIP-Primer. Leserichtung von 5'- zu 3'-Ende. ....	34
Tabelle 6: Oligonukleotide für EMSA. ....	35
Tabelle 7: CRISPR/Cas9-Primer für sgRNAs. ....	35
Tabelle 8: Charakteristika der verwendeten Zelllinien. ....	37
Tabelle 9: Schema für Annealing und Phosphorylierung der Oligonukleotide. ....	44
Tabelle 10: Ligationsschema. ....	45
Tabelle 11: PCR Schema gDNA. ....	47
Tabelle 12: Liste der verwendeten Antikörper. ....	49
Tabelle 13: Übersicht über die verwendeten R2-Datensätze. ....	57

## Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
(v/v)	Volumenprozent
(w/v)	Massenkonzentration
ACTN	Alpha-Actinin
AG	Arbeitsgruppe
AKT	Proteinkinase B
ALK	Anaplastische Lymphomkinase
ANOVA	analysis of variance
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxidsulfat
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
Bmp	bone morphogenetic protein
bp	Basenpaar
CA9	Carboanhydrase 9
Cas	CRISPR-associated
CCRCC	Klarzelliges Nierenzellkarzinom
cDNA	coding-DNA
ChIP	Chromatin-Immunopräzipitation
ChIP-seq	ChIP-sequencing
cMyb	Avian myeloblastosis virus
CREB	cAMP response element-binding protein
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
crRNA	CRISPR-RNA
Ct	Cycle threshold
Cy5	Cyanine 5
DAPI	4',6-Diamidin-2'-Phenylindol
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DDS	Denys-Drash-Syndrom
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco Modified Eagle Medium
DMOG	Dimethyloxaloylglycin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Nukleosidtriphosphate
DRFZ	Deutsches Rheumaforschungszentrum
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EB	Elution Buffer
ECL	Chemilumineszenzreaktion
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMSA	Elektromobilitätsshiftassay
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
ENCODE	Encyclopedia of DNA-Elements

Epo	Erythropoietin
FACS	fluorescence activated cell sorting
FD	fast digest
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GATA	Transkriptionsfaktor mit Bindungsstelle GATA
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
HBS	HIF-Bindungsstelle
HDR	homology directed repair
HIF	Hypoxie-induzierbarer Faktor
HRE	Hypoxie-responsives Element
HRP	Meerrettichperoxidase
Hx	Hypoxie
IGF	insuline-like growth factor
INSS	International Neuroblastoma Staging System
IP	Immunopräzipitation
kb	Kilobase
KO	Knockout
LB	lysogeny broth
LIN28B	LIN-28 Homolog B
LSP	Lymphocyte Specific Protein
MAK	Monoklonaler Antikörper
MET	Mesenchymal-epitheliale Transition
min	Minute
mRNA	messenger-RNA
mTOR	mechanistic Target of Rapamycin
MYCN	Myelocytomatose Gen N
MYO1B	Myosin 1B
NHEJ	non-homologous end joining
Ntrk	Neurotrophic receptor tyrosine kinase
Nx	Normoxie
OD	Optische Dichte
P/S	Penicillin/Streptomycin
PAG	Phosphoprotein Membrane Anchor with Glycosphingolipid Microdomains
PAK	Polyklonaler Antikörper
PAM	protospacer adjacent motif
PAS	Per-Arnt-Sim
Pax	Paired-Box-Protein
PBS	phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PHD	Prolylhydroxylase
PHOX2B	Paired-like homeobox 2B
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
Pol	Polymerase
Pro	Prolin
pVHL	Von-Hippel-Lindau-Tumorsuppressor
qPCR	quantitative PCR
RNA	Ribonukleinsäure

RPMI	Roswell Park Memorial Institute (Medium)
RT	Reverse Transkriptase
Sall	Spalt Like Transcription Factor
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
sgRNA	small-guiding-RNA
siRNA	small-interfering-RNA
SNAI	Snail Family Transcriptional Repressor
SOB	Super Optimal Broth
SOC	Super Optimal Broth + Glukose
SRY	Sex determining region of Y
SV40	Simian-Virus 40
tacrRNA	transactivating-RNA
TALEN	Transcription activator-like effector nuclease
TBS	Tris-buffered saline
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TrkB	Tropomyosin receptor kinase B
TSS	transcription start-side
UCSC	University of California, Santa Cruz
UV	Ultraviolett
VEGF	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
WAGR	Wilms-Tumour-Aniridia-Syndrom
WB	Western Blot
Wnt	Wingless + Int1
WT1	Wilms-Tumor-Protein 1

## Zusammenfassung

Sauerstoffmangel (Hypoxie) fördert ein aggressives Wachstum von Tumoren. Dies gilt insbesondere für das Neuroblastom, den häufigsten extrakraniellen soliden Tumor des Kindesalters. Neuroblastome sind Malignome des peripheren sympathischen Nervensystems, deren Tumorzellen von der embryonalen Neuralleiste abstammen. In Neuroblastomen korreliert die Akkumulation von Hypoxie-induzierbarem-Faktor-2 $\alpha$  (HIF-2 $\alpha$ ) mit einem hochmalignen Tumorphänotyp und einem ungünstigen klinischen Verlauf. Hypoxie-induzierbare-Faktoren (HIF) bilden eine Familie von heterodimeren Transkriptionsfaktoren, die bei der zellulären Adaptation an ein niedriges Sauerstoffniveau in normalem Gewebe und in Tumoren eine zentrale Rolle spielen. Neben der Anreicherung von HIF-2 $\alpha$  ist auch eine hohe Expression von Wilms-Tumor-Gen 1 (*WT1*) mit einer schlechten Prognose von Neuroblastomen assoziiert. *WT1* kodiert einen Transkriptionsfaktor, der ursprünglich als Suppressor für das Wachstum von Nierentumoren bei Kindern (Wilms-Tumor, Nephroblastom) charakterisiert wurde. Neuere Untersuchungen haben ergeben, dass *WT1* in vielen malignen Tumoren verstärkt exprimiert wird und dort möglicherweise onkogene Eigenschaften besitzt.

Vor diesem Hintergrund sollte in der vorliegenden Arbeit überprüft werden, ob die Expression von *WT1* in Neuroblastomzellen sauerstoffabhängig reguliert wird. Weiterhin sollte gegebenenfalls der molekulare Mechanismus analysiert werden, über den ein Sauerstoffmangel die *WT1*-Expression stimuliert.

Im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Expression von *WT1* in Kelly-Neuroblastomzellen tatsächlich durch Hypoxie stimuliert wird. Der Knockdown von HIF-2 $\alpha$  mittels RNA-Interferenz bzw. Deletion von HIF-2 $\alpha$  mittels CRISPR/Cas9 bewirkte eine signifikante Abnahme der *WT1* Expression in hypoxischen Kelly-Zellen. Die Inaktivierung von HIF-1 $\alpha$  hatte hingegen keinen signifikanten Einfluss auf das *WT1* Niveau. Weiterhin wurde *in silico* ein HIF-Bindungsmotiv innerhalb eines DNase-sensitiven Bereichs in Intron 3 des *WT1* Gens identifiziert.

Mittels Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) und Elektromobilitätsshiftassays konnte eine Bindung von HIF-2 an diese Sequenz experimentell nachgewiesen werden. In Reporterassays, die an transient transfizierten Kelly-Zellen durchgeführt wurden, übertrug ein 256 bp langes DNA-Fragment unter Einschluss des HIF-Bindungsmotivs aus Intron 3 des *WT1*-Gens eine Hypoxieempfindlichkeit auf die ansonsten hypoxieresistenten *SV40*- und *WT1*-Promotoren. Funktionell konnte nachgewiesen

werden, dass WT1 die Migration von SK-NA-S-Neuroblastomzellen stimuliert. R2-Datenanalysen von großen Kohorten von Neuroblastompatienten zeigten, dass sowohl HIF-2 $\alpha$  als auch WT1 in Subgruppen von Neuroblastompatienten mit einer erhöhten Mortalität assoziiert sind.

Mit diesen Ergebnissen wird erstmalig ein sauerstoffempfindlicher Enhancer in Intron 3 des *WT1* Gens identifiziert. Unter hypoxischen Bedingungen bewirkt die Bindung von HIF-2 an das Enhancerelement eine *WT1*-Expression in Kelly-Neuroblastomzellen. Dieser neu entdeckte molekulare Mechanismus spielt möglicherweise in der Pathophysiologie von Neuroblastomen eine Rolle.

## Abstract

Oxygen shortage (hypoxia) favors aggressive tumor growth. This is particularly relevant to neuroblastoma, the most common extracranial solid tumor in childhood. Neuroblastoma arises from neural crest-derived cells in the peripheral sympathetic nervous system. High levels of hypoxia-inducible factor (HIF) 2 $\alpha$  in neuroblastoma correlate with an undifferentiated tumor phenotype and poor clinical outcome. Hypoxia-inducible factors constitute a family of heterodimeric transcription factors that play a pivotal role in the adaptation of normal and tumor tissues to low oxygen conditions. Recent studies have shown that high expression levels of the Wilms tumor gene 1 (*WT1*) in neuroblastoma are associated with an aggressive tumor growth and poor prognosis. *WT1* was initially identified as a tumor suppressor gene preventing the formation of childhood tumors of the kidney (Wilms tumor, nephroblastoma). However, *WT1* is highly expressed in various types of cancer suggesting that it may have oncogenic properties in certain tissues.

It was the purpose of this study to test whether *WT1* expression in neuroblastoma cells is regulated by oxygen and, if so, to analyze the underlying molecular mechanism. Exposure of Kelly neuroblastoma cells to low ambient oxygen did indeed stimulate expression of the *WT1* gene. Silencing of HIF-2 $\alpha$  by RNA interference and knockout of HIF-2 $\alpha$  using CRISPR/Cas9 genome editing significantly reduced *WT1* levels in hypoxic Kelly cells. In contrast, inactivation of HIF-1 $\alpha$  had no significant effect on *WT1* expression in hypoxic Kelly cells. In silico analyses revealed a HIF binding motif within a cluster of DNase hypersensitivity in intron 3 of the *WT1* gene. Binding of HIF-2 to this sequence was experimentally proven by chromatin immunoprecipitation (ChIP) and electromobility shift assay. A 256 bp DNA sequence encompassing the identified HIF binding site conferred oxygen sensitivity to otherwise hypoxia resistant *WT1* and *SV40* promoter constructs in transiently transfected Kelly cells. In functional assays, *WT1* was found to enhance the migratory capacity of SK-NA-S neuroblastoma cells. R2 data analysis of cohorts of neuroblastoma patients showed that HIF-2 $\alpha$  and *WT1* are independently associated with increased mortality.

In summary, these results identify an oxygen sensitive enhancer in intron 3 of the *WT1* gene. Binding of HIF-2 to this newly discovered enhancer element stimulates *WT1* expression in hypoxic Kelly neuroblastoma cells. It is suggested that this novel regulatory mechanism might play a role in the pathophysiology of neuroblastoma.

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Neuroblastom

Das Neuroblastom ist ein frühkindlicher Tumor, der sich von Zellen der Neuralleiste, bzw. von Vorläuferzellen des sympathischen Grenzstrangs ableitet (K. K. Matthay et al., 2016). Auch wenn es sich um eine in der Gesamtbevölkerung sehr seltene Erkrankung handelt, nimmt das Neuroblastom den ersten Platz unter den malignen Erkrankungen des ersten Lebensjahres ein (Maris, Hogarty, Bagatell & Cohn, 2007). Die Inzidenz der Erkrankung nimmt mit steigendem Alter ab, und nur ein sehr geringer Anteil der Diagnosen wird im Jugend- und Erwachsenenalter gestellt ((GPOH), 2019). Das Outcome dieser Tumorerkrankung erstreckt sich von einer hohen Spontanheilungsrate vor allem bei Kindern unter 18 Lebensmonaten bis zu Mortalitätsraten von >80 % bei älteren Kindern im Stadium 4 (K. K. Matthay et al., 2016). Über 50 % der Neuroblastome sind zum Diagnosezeitpunkt bereits metastasiert. Es wurde eine Vielzahl an genetischen Veränderungen mit dem Tumor in Zusammenhang gebracht. Dazu zählen Mutationen, Genamplifikationen, Polymorphismen und chromosomale Alterationen. In genomweiten Assoziationsstudien konnten über 50 Gene identifiziert werden, deren Veränderungen mit einem erhöhten Aufkommen von Neuroblastomen in Zusammenhang stehen (Bosse & Maris, 2016). Hierbei scheint die Zahl der Kopien eines bestimmten Gens für die Tumorentstehung wesentlich und Genmutationen eher nachrangig zu sein. Die am besten untersuchten Gene haben bereits Einzug in die Diagnose- und Klassifizierungskriterien gefunden. Etwa 20% der Neuroblastome weisen die sogenannte *MYCN*-Amplifikation auf, deren Auftreten mit einem besonders malignen Phänotyp und schlechtem Outcome assoziiert ist (Thompson et al., 2016). Bei *MYCN* handelt es sich um einen Schlüsselregulator der Transkription einer Vielzahl von Genen, die Wachstum induzieren und Differenzierung verhindern. Weitere wichtige und prognosebestimmende Gene sind *ALK*, *PHOX2B* oder *LIN28B* (T. J. Pugh et al., 2013). Erst vor kurzem konnten die Tumorstammzellen von Neuroblastomen identifiziert werden. Der Tumor scheint sich von Vorläuferzellen der Nebennierenmarkszellen oder chromaffinen (katecholaminproduzierenden) Zellen abzuleiten (Garner & Beierle, 2015). Zur Diagnostik des Neuroblastoms gehören neben molekulargenetischen Untersuchungen die Labordiagnostik, v.a. von Katecholaminabbauprodukten im Urin, die radiologische Diagnostik und die

pathologische Beurteilung des Primarius (zu den Stagingkriterien siehe (Brodeur et al., 1993)). Einheitliche Symptome gibt es nicht, da die Lokalisation der Tumoren stark variabel ist und sich Symptome, wie z.B. die Horner-Trias (Ptosis, Myosis und Pseudoenophthalmus) bei Befall des Ganglion stellatum, vom Manifestationsort ableiten. Die Therapie erstreckt sich von „watchful waiting“ bis hin zu multimodalen Ansätzen mit Chirurgie, Radiotherapie, Chemotherapie und autologer Stammzelltransplantation.

## **1.2 Hypoxie**

### **1.2.1 Hypoxische Genregulation durch Hypoxie-induzierbare Faktoren**

Hypoxie bezeichnet einen Zustand, in dem das Sauerstoffangebot den Bedarf eines Gewebes oder einer Zelle nicht mehr deckt und somit ein Sauerstoffdefizit entsteht. Eukaryotische Zellen besitzen eine ganze Reihe von Adaptationsmechanismen an Zustände geringer Sauerstoffversorgung. Schlüsselmediatoren auf genomischer Ebene sind dabei heterodimere Transkriptionsfaktoren, die als Hypoxie-induzierbare Faktoren, kurz HIF, bekannt sind (Semenza, 2012a). Ein wichtiger Adaptationsmechanismus an ein niedriges Sauerstoffangebot im Blut ist die Erhöhung der Sauerstofftransportkapazität durch vermehrte Bildung von Erythrozyten mittels Stimulation der Erythropoietinsynthese in der Niere (Semenza & Wang, 1992). Dieser Mechanismus des HIF-vermittelten „Oxygen-sensing“ ist nicht nur auf eine Nierenzellpopulation beschränkt, sondern kommt ubiquitär vor (Ratcliffe, 2013). Der komplexe Mechanismus hinter dieser direkten Sauerstoffantwort ist dabei nicht auf der Ebene von Transkription oder Translation zu finden, sondern beruht auf der hypoxieinduzierten Stabilisierung der HIF-Proteine. Diese gehören zur helix-loop-helix-PAS-Proteinfamilie und bestehen aus jeweils einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit, die als Dimere die Zielgenexpression regulieren (G. L. Wang, Jiang, Rue & Semenza, 1995). Unter atmosphärischen Sauerstoffbedingungen (Normoxie) findet eine proteolytische Degradation der  $\alpha$ -Untereinheit über das Proteasomsystem statt. Entscheidend hierfür ist die über den von-Hippel-Lindau-Tumorsuppressor (pVHL) vermittelte Ubiquitinierung dieser  $\alpha$ -Untereinheit, die das Schlüsselsignal für den Abbau des Proteins darstellt. (Huang, Gu, Schau & Bunn, 1998).

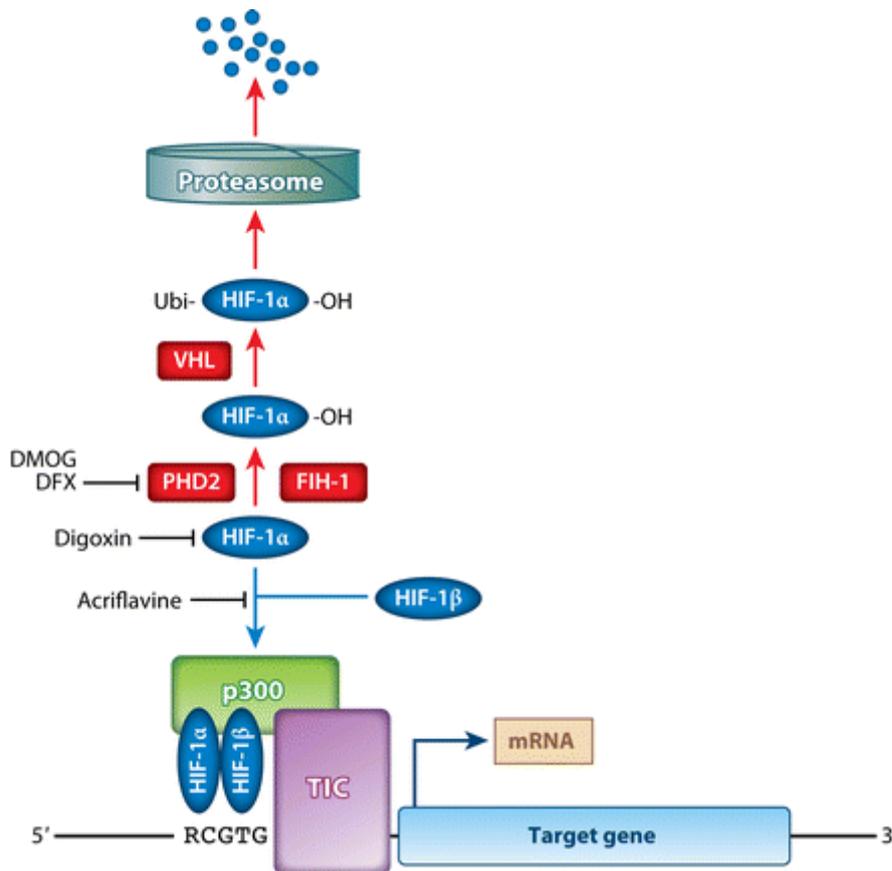


Abbildung 1: Schema des Mechanismus zur Regulation von HIF- 1 $\alpha$

Die Abbildung zeigt die schematische Darstellung der proteasomalen Degradation von HIF-1 $\alpha$  unter Normoxie und Heterodimerisierung, sowie seiner Wirkung als Transkriptionsfaktor unter Hypoxie. Bei 21 % Sauerstoff erfolgt die Hydroxylierung zweier Prolylreste von HIF-1 $\alpha$  durch die Prolylhydroxylase-Domain 2 (PHD2, rote Pfeile). Die Hydroxylierung ist obligat für die Bindung an den von-Hippel-Lindau-Faktor, der wiederum die Bindung an eine Ubiquitin Proteinligase vermittelt und somit eine Degradation durch das Proteasom induziert. Unter Hypoxie sind die Hydroxylierungsreaktionen inhibiert und HIF-1 $\alpha$  wird stabilisiert. Nach der Heterodimerisierung mit der  $\beta$ -Untereinheit und der Rekrutierung von Koaktivator p300 erfolgt die Bildung des Transkriptionskomplexes, aus (Semenza, 2012a).

Voraussetzung hierfür ist die Hydroxylierung zweier Prolylreste der  $\alpha$ -Untereinheit (Pro-402 und Pro-564) durch Vertreter einer sauerstoffabhängigen Enzymfamilie. Für den Menschen wurden drei Vertreter dieser Prolylhydroxylasen (PHD1-3) identifiziert, wobei eine Reihe von Arbeiten gezeigt hat (Fandrey, Gorr & Gassmann, 2006; Kaelin & Ratcliffe, 2008), dass die am stärksten exprimierte PHD2-Isoform wohl die entscheidende Rolle im menschlichen Organismus spielt. Durch massenspektrometrische Untersuchungen konnte eine weitere Hydroxylierungsstelle an einem Asparaginyrest (Asn-803) nachgewiesen werden (Lando, Peet, Whelan,

Gorman & Whitelaw, 2002), deren Hydroxylierung jedoch im Vergleich zu den anderen beiden Aminosäuren keine Auswirkung auf die Stabilität von HIF hat. Vielmehr inhibiert die sauerstoffabhängige Hydroxylierung dieser Aminosäure die Bindung zum transkriptionellen Kofaktor p300 von HIF und vermindert so dessen Aktivität als Transkriptionsfaktor. Diese HIF-Asparaginyhydroxylase findet sich in der Literatur häufig auch als FIH (factor inhibiting HIF) wieder und stellt neben den PHDs den zweiten wichtigen Mechanismus für die Sauerstoffabhängigkeit des HIF-Systems dar (Ratcliffe, 2013).

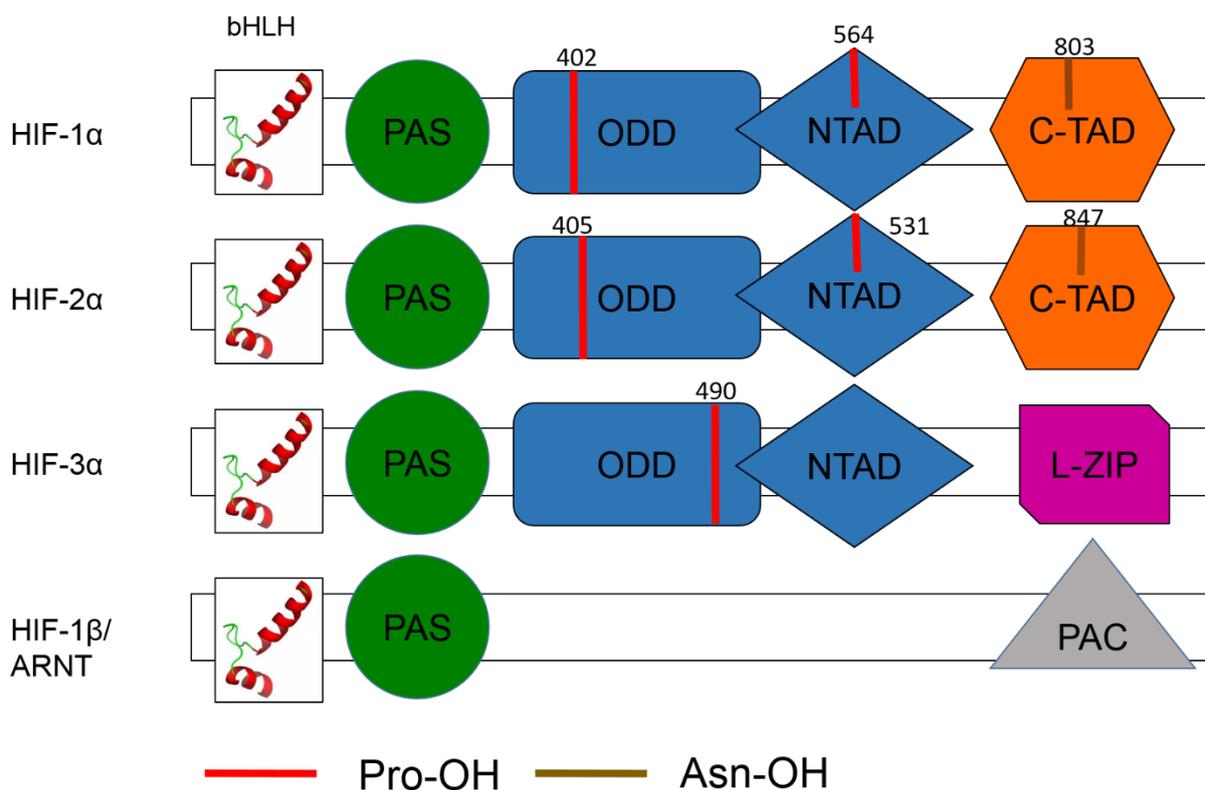


Abbildung 2: Schematischer Aufbau der verschiedenen HIF-Isoformen

Alle Isoformen besitzen am N-terminalen Ende ein klassisches Helix-Loop-Helix-Motiv, das für die Bindung von DNA wichtig ist. Die Per-ARNT-Sim-Domäne (PAS) ist für die Heterodimerisierung von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit nötig. Die  $\alpha$ -Isoformen besitzen darüber hinaus einen Bereich, der durch Hydroxylierung an unterschiedlichen Prolylresten mittels Prolylhydroxylasen eine sauerstoffabhängige Degradation vermittelt (ODD). Damit verknüpft ist eine N-terminale Transaktivierungsdomäne (NTAD), welche ebenfalls über eine Prolylhydroxylierung sauerstoffabhängige Konformationsänderungen vermittelt. HIF-1 $\alpha$  und HIF-2 $\alpha$  besitzen eine C-terminale Transaktivierungsdomäne, die bei Ausbleiben der sauerstoffabhängigen Hydroxylierung von Asparaginyresten Kofaktoren rekrutieren kann und eine Translokation in den Zellkern ermöglicht.

Es sind drei verschiedene HIF-Isoformen bekannt. Neben der ursprünglich identifizierten HIF-1 $\alpha$ -Isoform wurden durch Suche nach Interaktionspartnern mit der  $\beta$ -Untereinheit die Isoformen 2 $\alpha$  und 3 $\alpha$  entdeckt. Im Gegensatz zu HIF-3 $\alpha$ , das in

unterschiedlichen Zellkontexten eher antagonistische Effekte zum klassischen HIF-abhängigen Transkriptionsprofil zu haben scheint, sind sich HIF-1 $\alpha$  und 2 $\alpha$  in Struktur und Funktion sehr ähnlich (Ratcliffe, 2007). Die hochkonservierte Struktur der beiden Isoformen, die aktive Domäne und die Heterodimerisierung mit HIF-1 $\beta$  sind einige Gemeinsamkeiten (Loboda, Jozkowicz & Dulak, 2010). Beide Transkriptionsfaktoren binden an das gemeinsame RCGTG-Motiv (Schodel et al., 2011; Wenger, Stiehl & Camenisch, 2005), allerdings deuten genomweite Bindungsstudien auf unterschiedliche Transkriptionsprofile von HIF-1 und HIF-2 hin. Die beiden Isoformen unterscheiden sich nicht nur deutlich bezüglich ihrer präferenziellen und zellkontextspezifischen Zielgene, sondern auch in Eigenschaften ihrer DNA-Bindung. So bindet HIF-1 $\alpha$  bevorzugt an DNA-Abschnitte in Promotornähe, während HIF-2 $\alpha$  zumeist mit DNA-Sequenzen interagiert, die mehrere Kilobasen von einer Promotorregion entfernt sind (Schodel et al., 2011). In vielen Studien zeigen die verschiedenen HIF-Isoformen unterschiedliche, zum Teil gegensätzliche Effekte auf zentrale Malignitätseigenschaften von Tumoren (Keith B, 2012). HIF-1 $\alpha$  ist in den meisten Tumoren aufgrund der chaotischen Gefäßarchitektur und des schnellen Wachstums vermehrt exprimiert (Vaupel, 2004). Trotzdem gibt es einige Hinweise auf tumorhemmende Eigenschaften dieser HIF Isoform (Chen, Li, Luo & Gu, 2003; P. Gao et al., 2007). Ebenso existieren für HIF-2 $\alpha$  widersprüchliche Befunde (Bertout et al., 2009; Mohlin, von Stedingk, Pietras & Pahlman, 2017). Dies macht klar, wie wichtig die Unterscheidung der beiden Isoformen im Hinblick auf Zielgenselektion, Transkriptionsmechanismen, epigenetische Mechanismen und auch hinsichtlich ihrer funktionellen Eigenschaften in verschiedenen Tumormodellen und -formen ist.

### **1.2.2 Hypoxie in Tumoren**

Tumorhypoxie beschreibt das Phänomen einer lokalen Sauerstoffunterversorgung des Tumorgewebes aufgrund einer massiv gesteigerten Zellproliferation bei zum Teil spärlicher und chaotischer Gefäßarchitektur (Schito & Semenza, 2016). Tumorhypoxie wird schon lange nicht mehr nur als Folge eines besonders malignen Tumorphänotyps betrachtet. Vielmehr unterstützt eine Reihe von gut untersuchten Mechanismen die Theorie, dass Hypoxie bzw. die erhöhte Expression von Hypoxie-induzierbaren Faktoren in Tumoren einen unabhängigen negativen prognostischen Marker darstellen (Vaupel, 2004). In den meisten Krebsarten zeigt sich eine im Vergleich zu normalem Gewebe deutlich erhöhte Expression von HIF-1 $\alpha$  und HIF-2 $\alpha$ . Die gesteigerte

Expression ist in vielen Fällen auch mit einer signifikant erhöhten Mortalität assoziiert (Überblick in (Schito & Semenza, 2016; Semenza, 2014)). Die der erhöhten HIF-Expression zu Grunde liegenden Mechanismen sind zum einen eine hohe intratumorale Hypoxie, die sich in über 50 % der lokal fortgeschrittenen Tumoren findet (Schito & Semenza, 2016) und zum anderen tumorassoziierte Genmutationen, die entweder als „oncogene gain of function“ (z.B. PI3K/AKT → mTOR) (Zhong et al., 2000) oder Tumorsuppressor „loss of function“ Mutation (VHL oder p53 Mutation) (Ravi et al., 2000) zu einer erhöhten Expression von Hypoxie-induzierbaren Faktoren führen. Über verschiedene Kaskaden kann dies zu Tumorgenese, Tumorwachstum und Metastasierung beitragen. HIF kann unter anderem über transkriptionelle Mechanismen die für die Immortalität von Tumorzellen verantwortliche Telomerase aktivieren (Yatabe et al., 2004), über Epo→VEGF→IGF2 Zellproliferation und Zellüberleben induzieren (Semenza, 2014), die Tumervaskularisation erhöhen und die lymphogene sowie hämatogene Aussaat beschleunigen (Liao, Corle, Seagroves & Johnson, 2007). Die Datenlage bezüglich der proonkogenen Wirkung von HIF ist für einige Tumore, wie z.B. das Mammakarzinom, relativ eindeutig (Liu, Semenza & Zhang, 2015). Jedoch gibt es nach wie vor kontroverse Ergebnisse bei der Betrachtung einzelner Aspekte der Hypoxiemaschinerie und unterschiedlicher Tumorentitäten (Semenza, 2012a). Hierbei kommen nicht nur Zweifel an einer rein proonkogenen Wirkung von HIF auf, sondern auch die Frage nach möglicherweise antagonistischen Effekten der einzelnen HIF-Isoformen (Ratcliffe, 2007).

Konventionelle Therapiekonzepte basieren überwiegend auf der Wirkung an stark proliferierenden Tumorzellen in gut oxygenierten Tumoranteilen (Kizaka-Kondoh, Inoue, Harada & Hiraoka, 2003). Trotz zahlreicher Evidenzen für die Bedeutung von intratumoraler Hypoxie für das maligne Wachstum ist die zielgerichtete Therapie gegen hypoxische Tumorzellen noch nicht in die klinische Anwendung gelangt (Schito & Semenza, 2016).

### **1.2.3 Hypoxie und HIF in Neuroblastomen**

Wie bereits erwähnt, ist Tumorphypoxie ein Phänomen, das der Diskrepanz zwischen rascher Tumorzellproliferation und unzureichender bzw. irregulärer Vaskularisation geschuldet ist (Semenza, 2014). Für Neuroblastome ist es bis dato noch nicht gelungen, durch in-vivo-Experimente Aussagen über den lokalen Sauerstoffgehalt in primären Tumoren zu treffen. Hochrisikotumoren weisen oft nekrotische Areale als

Ausdruck von Sauerstoffunterversorgung auf. Außerdem sind immunhistochemische Färbungen in perinekrotischen Arealen hochpositiv auf Hypoxie-induzierbare Faktoren. Daher liegt die Vermutung nahe, dass große Teile der Tumoren hypoxisch sind (Pahlman & Mohlin, 2018). In-vitro-Experimente zeigten, dass Hypoxie die Differenzierung von Neuroblastomzelllinien verhindert und die Ausprägung eines eher stammzellartigen Zelltyps induziert (Holmquist-Mengelbier et al., 2006). Aus diesem Grund kam die Frage nach der Rolle der verschiedenen HIF-Isoformen in Neuroblastomen und deren Einfluss auf Phänotyp und Prognose der Tumoren auf. In Datensätzen aus der R2-Datenbank, einer Sammlung bioinformatischer Expressionsdaten verschiedener Tumorentitäten (Einzelheiten siehe Methodenteil), zeigen Neuroblastome deutliche HIF-Expressionsniveaus. Dabei ist zu beachten, dass HIF-1 $\alpha$  und HIF-2 $\alpha$  in den meisten Neuroblastomen stark exprimiert sind und HIF-3 $\alpha$  sowohl in den Analysepanels wenig Beachtung findet als auch das Expressionsniveau bedeutend geringer ist (Pahlman & Mohlin, 2018). R2-Datensätze und andere Studien (Holmquist-Mengelbier et al., 2006; Pietras et al., 2009; H. Zhang et al., 2014) verbinden HIF-2 $\alpha$ , und nicht HIF-1 $\alpha$ , mit einem malignen Tumorphänotyp. Des Weiteren ist HIF-2 $\alpha$  meist mit einem höheren Tumorstadium und einer schlechteren Prognose assoziiert, wobei hohe HIF-1 $\alpha$ -Niveaus eher mit günstigen Prognosen und frühen Tumorstadien zusammenhängen (Pahlman & Mohlin, 2018). Jedoch gibt es in der Frage nach den Effekten der HIF-Isoformen gerade bei ex-vivo-Daten und Patientendaten teilweise kontroverse Ergebnisse, so dass allgemeingültige Aussagen noch nicht gemacht werden können.

### **1.3 WT1**

#### **1.3.1 Der Wilms-Tumor-Transkriptionsfaktor**

Das *WT1*-Gen auf Chromosom 11p13 kodiert für das Wilms-Tumor-Protein 1. Der Wilms-Tumor (Nephroblastom) ist ein bösartiger Nierentumor bei Kindern, der erstmalig durch den Chirurgen Max Wilms beschrieben wurde und als das Resultat einer gestörten Nierenentwicklung gilt. *WT1* wurde aufgrund der Beobachtung, dass Nephroblastome erst bei Mutation beider Allele entstehen, zunächst als klassisches Tumorsuppressorgen eingestuft (Knudson & Strong, 1972). Es wurde aus einer Reihe von Kandidatengenen identifiziert, deren Mutation vermutlich ursächlich für den Wilms-Tumor ist (Call et al., 1990; Gessler et al., 1990). Das humane *WT1*-Gen auf dem

kurzen Arm von Chromosom 11 (11p13) ist ca. 50 kb lang und beinhaltet 10 Exons (Hastie, 2017). Durch unterschiedliche transkriptionelle und post-transkriptionelle Mechanismen können in Säugetieren theoretisch maximal 36 verschiedene *WT1*-mRNAs gebildet werden. Jedoch sind beim Menschen davon lediglich acht Varianten proteinkodierend. Diese resultieren zum einen aus variablen Transkriptions- und Translationsstarts und zum anderen aus alternativem mRNA-Spleißen und RNA-Prozessierung (Haber et al., 1991).

### **1.3.2 WT1 in der Embryo- und Organogenese**

Neben seiner ursprünglichen Bedeutung als Tumorsuppressor spielt WT1 eine zentrale Rolle in der Embryonalentwicklung. Eine Deletion des *Wt1*-Gens ist embryonal letal für Mäuse (Kreidberg et al., 1993). Ein auffälliges Merkmal dieser Tiere ist ihre gestörte Nierenentwicklung (Buckler, Pelletier, Haber, Glaser & Housman, 1991; Kreidberg et al., 1993). Während der Nierenentwicklung spielt WT1 zusammen mit *Wnt-4* eine entscheidende Rolle in der epithelialen Transformation des metanephrischen Mesenchyms, aus dem sich die Nephrone entwickeln (Stark, Vainio, Vassileva & McMahon, 1994). Mit Hilfe von genomweiten ChIP-Sequenzierungsanalysen konnte eine Vielzahl potenzieller WT1-Zielgene in der embryonalen Niere identifiziert werden, darunter *Pax2*, *Sal1* und *Bmp7* (Hartwig et al., 2010). Innerhalb der Nieren ist WT1 ein Schlüsselregulator für die Differenzierung und den Erhalt der Podozyten (Berry et al., 2015; Chau et al., 2011; Hammes et al., 2001; Moore, McInnes, Kreidberg, Hastie & Schedl, 1999). Podozyten sind mit der Schlitzmembran, die sich zwischen deren Fußfortsätzen befindet, von wesentlicher Bedeutung für die Regulation der glomerulären Filtrationsrate. Für rund die Hälfte der Podozyten-spezifischen Gene konnte eine WT1-Bindung an deren Promotoren oder Enhancer nachgewiesen werden (Dong, Pietsch & Englert, 2015; Kann et al., 2015; Lefebvre et al., 2015). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass WT1 essentiell für die Entwicklung der Gonaden ist (Pritchard-Jones et al., 1990). Durch In-situ mRNA-Hybridisierungen in Mausembryonen wurde WT1 in Granulosa- und Epithelzellen des Ovars, in Sertoli-Zellen des Hodens und in Zellen der Uteruswand nachgewiesen (Armstrong, Pritchard-Jones, Bickmore, Hastie & Bard, 1993; Pelletier et al., 1991). Hierbei induziert insbesondere die wichtige WT1  $\alpha$ -KTS-Isoform zusammen mit GATA4 über die Aktivierung des SRY-Promotors die männliche Geschlechtsdifferenzierung (Miyamoto, Taniguchi, Hamel, Silversides & Viger, 2008).

Es gibt eine ganze Reihe an Erkrankungen, die mit genetischen Alterationen des *WT1*-Gens assoziiert sind (Übersicht in (Hastie, 2017)). Beispielsweise beruht das Frasier Syndrom, das u.a. durch eine Gonadendysgenese gekennzeichnet ist, auf einem Verlust der (+)-KTS-Spleiß-Variante (Barboux et al., 1997; Hammes et al., 2001). Auch für die Nebennierenentwicklung ist *WT1* erforderlich (Bandiera, Sacco, Vidal, Chaboissier & Schedl, 2015). Weitere Organe und Gewebe, deren Entwicklung durch *WT1* reguliert wird, sind: Das Herz, hierbei insbesondere das Epikard und die epikardialen Gefäße (Moore et al., 1999; K. D. Wagner, Wagner, Bondke, et al., 2002), die Milz (Herzer, Crocoll, Barton, Howells & Englert, 1999) und das Zwerchfell (Moore et al., 1998). Der Großteil der Gewebe und Organe, die *WT1* exprimieren, sind mesodermalen Ursprungs. Daneben wird *WT1* unter anderem auch im ependymalen Anteil des Dachs des vierten Ventrikels in unmittelbarer Nähe zur Medulla oblongata und dem sich entwickelnden sensorischen Nervensystem (Armstrong et al., 1993) exprimiert. Innerhalb des letzteren wurde *WT1* insbesondere in der Retina (K. D. Wagner, Wagner, Vidal, et al., 2002), dem olfaktorischen System (N. Wagner, Wagner, Hammes, et al., 2005) und dem hinteren Geschmacksfeld (Y. Gao, Toska, Denmon, Roberts & Medler, 2014) nachgewiesen.

### **1.3.3 *WT1* im adulten Organismus**

Die Rolle von *WT1* in der Embryonalentwicklung wurde in einer Vielzahl von Publikationen illustriert und ist für die Differenzierung einiger Gewebe von entscheidender Bedeutung. Ob das Protein allerdings im adulten Organismus noch eine wesentliche Rolle spielt, war lange Zeit ungeklärt. Beim Erwachsenen wird *WT1* nur in wenigen Geweben exprimiert, u.a. in den Podozyten der Nierenglomeruli, den Gonaden, den mesothelialen Anteilen von Organen und in ca. 1 % der Knochenmarkszellen (Hastie, 2017). Ein Knockout von *WT1* in sechs Wochen alten Mäusen war nicht mit dem Leben vereinbar. Es kam unter anderem zu einer Glomerulosklerose, Atrophien von Milz und exokrinem Pankreas und einem generalisierten Verlust von Fett- und Knochensubstanz (Chau et al., 2011). Eine weiterführende Analyse zeigte, dass die IGF1-Protein-Serumkonzentrationen dieser Tiere um 95 % reduziert war, wodurch sich die partielle Organatrophie nach *WT1*-Deletion zumindest teilweise erklären lässt. Dies verdeutlicht, dass *WT1* auch nach vollendeter Entwicklung eine fundamentale Rolle in der Homöostase dieser Organsysteme spielt. Leider sind wir von einem vollständigen Verständnis der Rolle

von WT1 nach Abschluss der Embryogenese noch entfernt. Vor allem die wiederkehrenden Beobachtungen der WT1 Expression in neuronalen Geweben (Y. Gao et al., 2014; K. D. Wagner, Wagner, Vidal, et al., 2002; N. Wagner, Wagner, Hammes, et al., 2005) wirft Fragen auf und bedarf einer mechanistischen Aufklärung.

#### **1.3.4 Der Transkriptionsfaktor WT1 und seine Zielgene**

Sowohl im adulten als auch im embryonalen Organismus ist WT1 am besten hinsichtlich seiner Funktion als Transkriptionsfaktor untersucht (Stoll et al., 2007). WT1 kann auf transkriptioneller Ebene die Genexpression sowohl aktivieren als auch hemmen (Toska & Roberts, 2014). Dass WT1 unabdingbar für die embryonale Entwicklung der Nieren ist, weiß man schon aus früheren Arbeiten und Beobachtungen (Armstrong et al., 1993; Hammes et al., 2001; Moore et al., 1999; Scholz & Kirschner, 2005). Obgleich der genaue Mechanismus noch unbekannt bleibt, identifizierten Hartwig et al. verschiedene für die Nierenentwicklung essenzielle Gene, darunter *Pax2*, *Sal1* oder *Bmp7* (Hartwig et al., 2010), mit denen WT1 in genomweiten ChIP-Analysen interagiert. Über die Nierenentwicklung hinaus ist WT1 durch die Aktivierung von SRY und die Induktion einer komplexen Signalkaskade in die männliche Geschlechtsdifferenzierung involviert (Hossain & Saunders, 2001). Das für die Entwicklung der Herzkranzgefäße wichtige *Ntrk2*, das für den TrkB-Neurotrophinrezeptor kodiert, ist ein weiteres WT1-Zielgen (N. Wagner, Wagner, Theres, et al., 2005). Weiterhin reguliert WT1 die Expression von Genen, die für die Zelldifferenzierung von Bedeutung sind. Diese kodieren u.a. für Proteine des Zytoskeletts und der Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten (Toska & Roberts, 2014). Beispielhaft zu nennen sind MYO1B, LSP1 und ACTN1 (Hartwig et al., 2010). Über die Regulation des IGF1-Rezeptors kann WT1 in zellspezifischem Kontext Mechanismen des Zellüberlebens aktivieren und antiapoptotisch wirken (Nichols, Re, Yan, Garvin & Haber, 1995).

#### **1.3.5 Die Rolle von WT1 in verschiedenen Tumoren**

Aufgrund seiner das Wachstum von Wilms-Tumoren hemmenden Funktion galt WT1 für lange Zeit ausschließlich als Tumorsuppressor (Hastie, 2017). Diese Auffassung wurde durch die Beobachtung unterstützt, dass WT1 den Zellzyklus hemmt und die epitheliale Differenzierung der Nephrone in embryonalen Nieren fördert (Hammes et al., 2001; Stark et al., 1994). In scheinbarem Widerspruch zur vermuteten Funktion als

Tumorsuppressor wurde allerdings eine starke WT1 Expression in verschiedenen Tumoren nachgewiesen. Bereits früh wurde WT1 in einigen Leukämieformen entdeckt (Miwa, Beran & Saunders, 1992). Aber auch in soliden Tumoren konnte eine WT1 Expression nachgewiesen werden (Qi et al., 2015). Konkrete Beispiele hierfür sind u.a. nicht kleinzellige Lungenkarzinome, Kolonkarzinome (Menssen et al., 2000), Mammakarzinome (Miyoshi et al., 2002; Qi et al., 2012), hepatozelluläre Karzinome (Sera et al., 2008), Ovarialkarzinome (Hylander et al., 2006) und Weichgewebssarkome (Sotobori et al., 2006). In vielen Studien konnte die Höhe der WT1 Expression mit höherer Malignität bzw. schlechterem klinischem Outcome korreliert werden (Miyoshi et al., 2002; Qi et al., 2012; Sera et al., 2008; Sotobori et al., 2006). Auch in einigen Tumoren neuronalen Ursprungs konnte eine erhöhte WT1 Expression gezeigt und mit einem ungünstigen klinischen Verlauf in Verbindung gebracht werden (Menssen et al., 2000; Rauscher et al., 2014). Der Einsatz von pharmakologischen Substanzen mit WT1 als Ziel einer Tumorthherapie ist Gegenstand aktueller Forschung. Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine Hemmung der WT1-Expression mittels shRNA in einigen soliden Tumoren Apoptose induziert (Tatsumi et al., 2008). Ein gegen WT1 gerichteter Impfstoff erscheint vielversprechend und ist Gegenstand intensiver Erprobung (Dao et al., 2013; Nishida & Sugiyama, 2016; Van Driessche, Berneman & Van Tendeloo, 2012).

## 2 Fragestellung

Im Rahmen meiner Dissertation habe ich die Fragestellung untersucht, ob die Expression von WT1 in Neuroblastomzellen durch Hypoxie induziert wird. Weiterhin sollte geklärt werden, ob ein Zusammenhang zwischen einer hypoxischen WT1-Expression und der prognostisch ungünstigen *MYCN*-Amplifikation in Neuroblastomzellen besteht. Ein weiteres Ziel der Arbeit bestand darin, den molekularen Mechanismus der sauerstoffabhängigen WT1-Expression in Neuroblastomzellen zu charakterisieren. Insbesondere sollte die Frage beantwortet werden, ob die WT1-Expression in Neuroblastomzellen bevorzugt durch HIF-1 oder HIF-2 induziert wird und welche *cis*-regulatorischen Bereiche im *WT1*-Gen hierbei eine Rolle spielen. Schließlich sollten im Rahmen dieser Arbeit erste Hinweise erbracht werden, welche funktionellen Auswirkungen eine hypoxieinduzierte WT1-Expression auf Neuroblastomzellen hat.

Die Realisierung dieser Zielstellung erfolgte in folgenden Arbeitsschritten:

**Arbeitsschritt 1:** Es sollte das WT1-Expressionsniveau in verschiedenen Neuroblastomzelllinien mit und ohne *MYCN*-Amplifikation ermittelt werden.

Um die Auswirkungen einer Hypoxie auf die WT1-Expression zu ermitteln, wurden verschiedene Neuroblastomzelllinien mit und ohne *MYCN*-Amplifikation bei 1 % O<sub>2</sub> und - zur Kontrolle - bei 21 % O<sub>2</sub> (Normoxie) kultiviert. Die Messung der WT1-Expression erfolgte auf RNA-Ebene mittels RT-qPCR und auf Proteinebene mittels Western Blot.

**Arbeitsschritt 2:** Nachdem nachgewiesen werden konnte, dass Hypoxie die Expression von WT1 in Kelly-Neuroblastomzellen tatsächlich stimuliert, sollte überprüft werden, ob dieser Effekt durch HIF-1 und/oder HIF-2 vermittelt ist.

Der Knockdown von HIF-1 $\alpha$  und HIF-2 $\alpha$  erfolgte durch Transfektion mit spezifischen siRNAs. Anschließend wurden die Neuroblastomzellen für 24 h einer Hypoxie (1 % O<sub>2</sub>) ausgesetzt und die WT1 Expression mittels RT-qPCR und Western Blot gemessen. Zusätzlich wurden unter Verwendung der CRISPR/Cas9 Technologie stabile, HIF-1 $\alpha$ - und HIF-2 $\alpha$ -defiziente Klone von Kelly-Neuroblastomzellen hergestellt. Nach 24-stündiger Exposition gegenüber Hypoxie wurde das WT1-Niveau mittels RT-qPCR und Western Blot bestimmt.

**Arbeitsschritt 3:** Es sollten potenzielle HIF-Bindungsstellen im *WT1* Genlocus ermittelt werden.

Unter Verwendung des UCSC Genome Browsers des ENCODE Projekts wurden zunächst in Zusammenschau von Histonmodifizierungen, DNaseI-Hypersensitivität und des Kernmotivs potenzielle regulatorische HIF-Bindungselemente im *WT1*-Locus lokalisiert. Anschließend wurde die HIF-Bindung an die identifizierten Elemente mittels Elektromobilitätshiftassays und Chromatinimmunopräzipitation experimentell validiert.

**Arbeitsschritt 4:** Es sollte festgestellt werden, ob die identifizierte HIF-Bindungsstelle Hypoxieempfindlichkeit vermittelt.

Dazu wurden Luciferase-Reporterkonstrukte hergestellt, die entweder einen *SV40*- oder den humanen *WT1*-Promotor enthielten. Anschließend wurde untersucht, ob die 5'-Ligation eines 256 bp langen Nukleotids, das die potenzielle HIF-Bindungsstelle aus dem *WT1*-Genlocus enthielt, den ansonsten hypoxieresistenten Promotorkonstrukten Sauerstoffempfindlichkeit verleiht.

**Arbeitsschritt 5:** Es sollten anhand bioinformatischer Datensätze von großen Tumorkollektiven Zusammenhänge zwischen HIF- bzw. *WT1*-Expression und klinischem Outcome von Neuroblastomen hergestellt werden.

Mit Hilfe der öffentlich verfügbaren R2-Datenbank wurden Kaplan–Meier-Analysen durchgeführt. Mit diesem Tool der Plattform wurde nach signifikanten Unterschieden im Überleben von Neuroblastompatienten in Abhängigkeit von ihrer HIF- bzw. *WT1*-Expression gesucht.

**Arbeitsschritt 6:** Es sollte exemplarisch untersucht werden, über welche Wirkungen *WT1* möglicherweise das maligne Wachstum von Neuroblastomen fördert.

Hierzu wurde an Neuroblastomzellen (SK-NA-S) mit hoher endogener *WT1*-Expression ein Knockdown von *WT1* mittels RNA-Interferenz durchgeführt. Anschließend wurde mittels Transwellassays überprüft, ob *WT1* das Migrationsverhalten von Neuroblastomzellen beeinflusst.

### 3 Materialien und Methoden

#### Allgemeine Bemerkungen:

Alle beschriebenen Methoden wurden, wenn nicht anders spezifiziert, im gentechnischen Labor der AG Scholz des Instituts für Vegetative Physiologie unter der gentechnischen Sicherheitsstufe S1 nach GenTechnikgesetz (GenTG, Anlagen Nr. 165/05) durchgeführt. Alle verwendeten Substanzen entsprachen dem analytischen Reinheitsgrad („Reinst“, Reinheit > 99 %, siehe Herstellerangaben). Alle für die Zellkultur verwendeten Produkte waren für diesen Gebrauch vom Hersteller ausgewiesen. Im Folgenden werden zunächst Bezugsquellen (siehe Tabelle 1), Geräte (siehe Tabelle 2) und Zusammensetzungen der verwendeten Materialien und Substanzen (siehe Tabelle 3 und 4) tabellarisch dargestellt.

#### 3.1.1 Bezugsquellen

Tabelle 1: Kommerzielle Bezugsquellen mit Firmensitz

<b>Firma</b>	<b>Firmensitz</b>	<b>Land</b>
Abcam	Cambridge	Vereinigtes Königreich
Addgene	Watertown	USA
Advansta	Menlo Park	USA
Amsbio	Abingdon	Vereinigtes Königreich
Analytik Jena	Jena	Deutschland
Applied Biosystems	Waltham	USA
BD Biosciences	Franklin Lakes	USA
Beckman-Coulter	Brea	USA
Berthold Technologies	Bad Wildbad	Deutschland
Binder	Tuttlingen	Deutschland
Biochrom	Berlin	Deutschland
Bioline	London	Vereinigtes Königreich
Bio-Rad	Hercules	USA
biostep	Burkhardtsdorf	Deutschland
BioTek	Winooski	USA
Biozym	Hessisch Oldendorf	Deutschland
Corning Life Sciences	Corning	USA
Dharmacon	Lafayette	USA
Diagenode	Seraing	Belgien
Don Whitley Scientific	Shipley	Vereinigtes Königreich
eppendorf	Hamburg	Deutschland

GE Healthcare	Buckinghamshire	Vereinigtes Königreich
Greiner BioOne	Kremsmünster	Österreich
Hamamatsu	Hamamatsu City	Japan
Heidolph Instruments	Schwabach	Deutschland
Heraeus	Hanau	Deutschland
Hettich	Tuttlingen	Deutschland
Intas Science Imaging Instruments	Göttingen	Deutschland
Invitrogen	Carlsbad	USA
Labnet International	Edison	USA
Labsystems	Beverly	USA
LAUDA-Brinkmann	Delran	USA
Liebisch	Bielefeld	Deutschland
Life Technologies	Carlsbad	USA
Marienfeld	Lauda- Königshofen	Deutschland
Merck Millipore	Billerica	USA
Minerva Biolabs	Berlin	Deutschland
Novus Biologicals	Centennial	USA
PAA Laboratories	Cölbe	Deutschland
Promega	Fitchburg	USA
Qiagen	Venlo	Niederlande
Qualitron	Karachi	Pakistan
Roche	Basel	Schweiz
Roth	Karlsruhe	Deutschland
Santa Cruz Biotechnology	Dallas	USA
Scientific Industries	New York	USA
Severin	Sundern	Deutschland
Sigma Aldrich	St. Louis	USA
SPOT Imaging	Burroughs	USA
Tec lab	Taunusstein	Deutschland
Thermo Fisher Scientific	Waltham	USA
Thomas Geyer	Renningen	Deutschland
UniEquip	Planegg	Deutschland
Whirlpool	Benton Harbor	USA
Zeiss	Oberkochen	Deutschland

### 3.1.2 Geräteliste

Tabelle 2: Geräteliste mit Beschreibung, Bezeichnung und Herstellername

Gerät	Bezeichnung	Firma
Durchlichtmikroskop	Axiovert 35	Zeiss
Kamera Durchlichtmikroskop	SPOT RT SE Monochrome CCD Scientific Digital Camera System	SPOT Imaging
Vortexer	Vortex Genie 2	Scientific Industries
Tischzentrifuge	Minizentrifuge	Qualitron
Hybridisierungssofen	Unitherm Hybridization Oven Model 12/24	UniEquip
Laborzentrifuge	Laborzentrifuge Universal 30F	Hettich
Hybridisierungssofen	Amersham hybridization oven	GE Healthcare
Hypoxie Station	Whitley H35 hypoxo station	don whitley Scientific
Werkbank Zellkultur	Hera Safe HS12 Sicherheitswerkbank Klasse 2	Heraeus
Inkubator	CO <sub>2</sub> Inkubator CB 160	Binder
Western Blot, Gel und Fluoreszenz Imager	ECL Chemostar Advanced Imager	Intas Science Imaging Instruments
Plattenreader	Synergy HTX Multi-Mode Reader	BioTek
RT-qPCR Light Cyclers	StepOne Plus	Applied Biosystems
Tischzentrifuge	3K15 Benchtop Centrifuge	Sigma Aldrich
Schüttelinkubator	311DS Environmental Shaking Incubator	Labnet International
Fotometer	NanoDrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific
Luminometer	Luminoskan	Labsystems
Fluoreszenzmikroskop	Axiovert S100	Zeiss
Kamera Fluoreszenzmikroskop	Diagnostic SPOT RT	SPOT Imaging
CCD Kamera Blautisch	CCD Camera C 2400	Hamamatsu
Blautisch	Bioview transilluminator blue light	biostep
Heizblock	Test Tube Thermostat TCR 100	Roth
Tischzentrifuge	Minizentrifuge	Roth
Luminometer	FB 12 Tube Luminometer	Berthold
Magnetrührer	MR 3001 Magnetrührer	Heidolph Instruments
Tischzentrifuge	MIKRO 12/24 Tischzentrifuge	Hettich
Fotometer mit Küvette	DU 730 UV-Vis Spectrophotometer	Beckman-Coulter
Taumelschüttler	WT12 Taumelschüttler	Biometra
Wärmeschüttler	Thermomixer F1.5	Eppendorf

Wasserbad	Ecoline 003 E100	LAUDA-Brinkmann
Tischzentrifuge	Centrifuge 5415R	Eppendorf
Wärmeschüttler	Thermomixer 5437	Eppendorf
Mikrowelle	M505 Microwave	Whirlpool
Spannungsgeber für Elektrophoreseapparatur	PowerPac 3000	Bio-Rad
Blautisch	Safe Imager blue light transilluminator	Invitrogen
Semidry Blotting Apparatur	TransBlot SD	Bio-Rad
Semidry Blotting Apparatur	Transblot Turbo	Bio-Rad
Folienschweißgerät	Folio	Severin
Thermoblock	Thermoblock	Liebisch
Laborzentrifuge	Laborzentrifuge Universal 30RF	Hettich
Tischzentrifuge	Minizentrifuge	Biozym
Thermocycler	T100 Thermal Cycler	Bio-Rad
Thermocycler	UNO II Thermoblock	Biometra
Ultraschall für Protein	Biorutpr Plus	Diagenode

### 3.1.3 Chemikalien

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien mit Bezeichnung und Hersteller

<b>Bezeichnung</b>	<b>Bezugsquelle</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Bezugsquelle</b>
2-Mercaptoetethanol	Roth	Lithiumchlorid	Merck
Acrylamid/Bis (Rotiphorese®)	Roth	Magnesiumacetat	Sigma-Aldrich
Agar	Roth	Magnesiumchlorid	Sigma-Aldrich
Agarose	Roth	Magnesiumsulfat	Merck
Ammoniumpersulfat	Roth	Mayer's Haemalaun	Applichem
Ampicillin	Roth	Medizinische Kohle	Charité Apotheke
Borsäure	Merck	Methanol	Thermo Fisher
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich	Methylenblau	FERAK
Calf Thymus DNA	Sigma-Aldrich	Milchpulver	Roth
Chloroform/ Isoamyalkohol	Thermo Fisher	Mini Complete	Merck
Chromassie Brilliant Blau	Sigma-Aldrich	MOPS	Roth

Citronensäure	Roth	Natriumacetat	Roth
D (+) Glukose	Sigma-Aldrich	Natriumchlorid	Roth
D (+) Saccharose	Roth	Natriumcitrat	Merck
Dithiothreitol	Sigma-Aldrich	Natriumdesoxycholat	Sigma-Aldrich
EDTA	Roth, Merck	Natriumdihydrogen phosphat	Roth
Eosin	Roth, Sigma- Aldrich	Natriumdodecylsulfat	Sigma-Aldrich
Ethanol	ChemSolute	Natriumhydrogen carbonat	Merck
FCS	Sigma-Aldrich	Natriumhydroxid	Merck
Formaldehyd 16%	Thermo Fisher	Nonidet-40	Roche
Formamid	Merck	Phenylmethylsulfonyl fluorid	Sigma-Aldrich
G418	Calbiochem	Polyethylenglykol	Sigma-Aldrich
Glycerol	Th. Geyer	Ponceau S	Sigma-Aldrich
Glykogen	Thermo Fisher	Reinstwasser	Sigma-Aldrich
Glycin	Roth	RNase A	Roche
Harnstoff	Sigma-Aldrich	TEMED	Roth
Hefeextrakt	Roth	Tetranatriumpyrophos phat	Fluka
HEPES	Roth	Tris Base	Sigma-Aldrich
Isopropanol	Merck	Tris HCl	Sigma-Aldrich
Kaliumacetat	Sigma-Aldrich	Triton X-100	Roth
Kaliumchlorid	Roth	Trypanblau	Sigma-Aldrich
Kaliumhydroxid	Merck	Trypsin	Merck
LB-Agar	Roth	Trypton	Roth
LB-Medium	Roth	Tween 20	SERVA
L-Glutamat	Sigma-Aldrich	$\epsilon$ -Aminocaprinsäure	Roth

### 3.1.4 Lösungen und Puffer

Alle verwendeten Lösungen wurden entweder mit doppelt destilliertem Reinstwasser ddH<sub>2</sub>O oder DEPC behandeltem Wasser angesetzt.

Tabelle 4: Lösungen und Puffer mit Bezeichnung und Zusammensetzung.

<b>Bezeichnung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
PBS	8,18 g NaCl; 0,186 g KCl; 0,218 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 2,15 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; ad 1000 ml ddH <sub>2</sub> O
DEPC-H <sub>2</sub> O	0,1 % (v/v) Diethylpyrocarbonat; ddH <sub>2</sub> O; Inkubation bei 37 °C für mehrere Stunden; Autoklavierung 45 Min
Tris-EDTA-Puffer	25 mM Tris; 192 mM Glycin; 1mM EDTA
10 x TBE-Puffer	108,0 g Tris Base; 9,3 g Na <sub>2</sub> EDTA, 55,0 g Borsäure; ddH <sub>2</sub> O ad 1000; pH 8,3
<b>Western Blot</b>	
<b>Bezeichnung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
10 x TBS	48,4 g Tris Base; 160 g NaCl auf pH 7,6 mit HCl titrieren; ddH <sub>2</sub> O ad 2000 ml
TBS-Tween	1x TBS, 0,05% Tween 20
SDS Semi-Dry-Blotpuffer	10 mM ε-Aminocaprinsäure; 10 % (v/v) Methanol; ddH <sub>2</sub> O ad 2000 ml
Trenngelpuffer	1,5 M Tris-HCl; 0,4 % (w/v) SDS (pH 8,8)
Sammelgelpuffer	1 M Tris-HCl; 0,8 % (w/v) SDS (pH6,8); dd H <sub>2</sub> O ad 250 ml
Trenngel 10%	10 % (v/v) Acrylamid/Bisacrylamid (30/0,8); 25% (v/v) Trenngelpuffer; 25 % (v/v) ml ddH <sub>2</sub> O; 0,5 % (v/v) Ammoniumperoxodisulfat (APS; 10%); 0,05 % (v/v) Tetramethylethylendiamin (TEMED)
Sammelgelmischung	11 % (v/v) Acrylamid/Bisacrylamid (30/0,8); 12,5 % (v/v) Sammelgelpuffer; ddH <sub>2</sub> O ad 50 ml
Sammelgel	2 ml Sammelgelgemisch; 20 µl APS; 2 µl TEMED
Stoppgel	1 ml Acrylamid/Bisacrylamid; 20µl APS; 20 µl TEMED
10 x SDS-Laufpuffer	250 mM Tris Base; 1,92 M Glycin; 1 % (v/v) SDS; ddH <sub>2</sub> O ad 2000 ml
2 x SDS Probenpuffer	100 mM Tris-HCl (pH 6,8) 8 M Harnstoff; 2 % (v/v) SDS; 65 mM DTT
<b>Zellkultur</b>	
<b>Bezeichnung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
LB-Medium	1 % (w/v) Trypton; 0,05 % (w/v) Hefeextrakt; 1 % (w/v); 1 % (w/v) NaCl; ddH <sub>2</sub> O ad 1000 ml (pH 7,0)
SOB Medium	2 % (w/v) Trypton; 0,5 % (w/v) Hefeextrakt; 0,05 % (w/v) NaCl; 1 % (v/v) KCl (250mM); ddH <sub>2</sub> O ad 900 ml (pH 7,0); ddH <sub>2</sub> O ad 990 ml; Autoklavieren + 10 ml MgCl <sub>2</sub> (1 M)
SOC Medium	2 % (w/v) sterilfiltrierte Glukose (1 M); SOB Medium ad 1000 ml
Freezing Medium	65 % /v/v) Glycerol; 0,1 M MgSO <sub>4</sub> ; 0,025 M Tris Base (pH 8); Autoklavieren
Gefriermedium Bakterien	65 % Glycerin (v/v), 0,1 M MgSO <sub>4</sub> , 0,025 M Tris-HCl, (pH 8), steril
Ampicillin-Agarplatten	LB-Medium, 15g/l Agarose, 100µg/ml Ampicillin
5 x siRNA Puffer	2,24 % (w/v) KCl; 0,72 % (w/v) HEPES; 0,02 % (w/v) MgCl; DPEC-H <sub>2</sub> O ad 30 ml; 2 M KOH bis pH 7,3-7,6; DPEC-H <sub>2</sub> O ad 100 ml; Autoklavieren

Gefriermedium Zellen	70 % (v/v) Kulturmedium, 20 % (v/v) FCS, 10 % (v/v) DMSO, steril
Trypanblau-Lösung	0,4 % Trypanblau (w/v) in PBS, steril
<b>Proteinpuffer</b>	
<b>Bezeichnung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
PE Rohpuffer	6,65 M Urea; 10% (v/v) Glycerol; 1% (v/v) SDS; 10mM Tris pH 6,8
HIF-Lysepuffer	1ml PE-Rohpuffer; 25 µl 1M DTT; 40 µl 25x MC
SDS Lysepuffer	1 % (v/v) SDS; 10 mM EDTA; 50 mM Tris-HCl (pH 8,1)
<b>ChIP</b>	
<b>Bezeichnung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
ChIP-Lysepuffer (hypoton)	20 mM HEPES NaOH, pH 7,5; 250 mM Saccharose. 3 mM MgCl <sub>2</sub> ; 0,2 % (w/w) Nonidet-40; 3 mM β-Mercaptoethanol
IP-/Dilutionspuffer	0,01 % (v/v) SDS; 1,1 % Triton X-100; 1,2 mM EDTA; 16,7 mM Tris-HCl (pH ,1); 167 mM NaCl
Elutionspuffer	1 % (v/v) SDS; 0,1 mM NaHCO <sub>3</sub>
Waschpuffer: Niedriges Salzanteil	0,1 % (v/v) SDS; 1 % Triton X-100; 2 mM EDTA; 20 mM Tris-HCl (pH 8,1); 150 mM NaCl
Waschpuffer: Hoher Salzanteil	0,1 % (v/v) SDS; 1 % Triton X-100; 2 mM EDTA; 20 mM Tris-HCl (pH 8,1); 500 mM NaCl
LiCl-Waschpuffer	0,25 M LiCl; 1 % NP-40; 1 % Natriumdesoxycholat; 1 mM EDTA; 10 mM Tris-HCl (pH 8,1)
TE Puffer	10 mM Tris-HCl (pH 8); 1 mM EDTA
<b>EMSA</b>	
<b>Bezeichnung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Bindepuffer EMSA	10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 50 mM KCl; 50 mM NaCl; 1mM MgCl <sub>2</sub> ; 5 mM DTT; 5 mM Phenylmethylsulfonylfluorid
Kernextrakt Puffer A (EMSA)	1 mM HEPES pH 7,9; 1,5 mM MgCl <sub>2</sub> ; 10 mM KCl; vor Benutzung: 0,5 mM PMSF; 0,5 mM DTT; 0,4 % Nonidet P40; 1x Mini Complete Proteaseinhibitor
Kernextrakt Puffer B (EMSA)	20 mM HEPES ph 7,9; 420 mM NaCl; 1,5 mM MgCl <sub>2</sub> ; 0,2 mM EDTA; vor Benutzung: 0,5 mM PMSF; 0,5 mM DTT; 1x Mini Complete Proteaseinhibitor
Gel-Ladepuffer	80% Formamid; 1 x TBE-Puffer; 0,1 % Bromphenolblau; 0,1 % Xylencyanol
20 x SSC	175,3 g NaCl; 88,23 g Tri-Natrium-Citrat; ddH <sub>2</sub> O ad 900 ml; pH 7,0

### 3.2 Primer und Oligonukleotide

Tabelle 5: RT-qPCR-Primer und ChIP-Primer. Leserichtung von 5'- zu 3'-Ende

Bezeichnung	Sequenz
<b>RT-qPCR</b>	
WT1-F	CACACGTCGCACATCCTGAAT
WT1-R	CAGCTGGAGTTTGGTCATGTT
Aktin-F	AGAAAATCTGGCACACCACACC
Aktin-R	GCCATGTGTTGCTCGAAGTC
CA9-F	ACACTGTGGAAGGCCACCGTTTCC
CA9-R	GACAGCAACTGCTCATAGGCACTG
Epo-F	AGGCCAAGGAGGCCGAGAATATCA
Epo-R	CACGGCTGGGAAGAGTTGACCAA
HIF-1α-F	CAGCCGCTGGAGACACAATCATAT

HIF-1 $\alpha$ -R	TTCTTGATTGAGTGCAGGGTCAGC
HIF-2 $\alpha$ -F	ATGGTAGCCCTCTCCAACAAGTGTG
HIF-2 $\alpha$ -R	CTCAGTGGCTTGTCCGGCATCAAA
<b>ChIP Primer</b>	
EGLN3-fwd	5'-AGTGTCCGTTCCCAGCTCAG-3'
EGLN3-rev	5'-TAGGCACAGTAAACAGGCC-3'
WT1promoter-fwd	5'-ACCTGAACGGACTCTCCAGT-3'
WT1promoter-rev	5'-CTCGGAGACACCCTCCTCTT-3'
WT1intron3-fwd	5'-CACTTCCGAACAGGCAGAGT-3'
WT1intron3-rev	5'-GCTCAACACCCAGCTCTCAT-3'
WT1intron1-fwd	5'-GCCAGCAGGCATTACACTTC-3'
WT1intron1-rev	5'-TCCAGGGTGGAGAAGAAGGA-3'
ChIPneg-fwd	5'-ACAGTAAGGCCCAACACTGC-3'
ChIPneg-rev	5'-AACCGGCCAGGCAATAACTG-3'
WT1-Ex3-fwd	5'-GCTCAGCTGTCTTCGGTTC-3'
WT1-Ex3-rev	5'-CAAGGACCCAGACGCAGAG-3'
WT1-Ex5-fwd	5'-CCAGATCCATGCATGCTCCA-3'
WT1-Ex5-rev	5'-TAACTCCTGCATTGCCCCAG-3'
WT1-Ex7-fwd	5'-GTAGCCCCGACTCTTGTACG-3'
WT1-Ex7-rev	5'-GCAGTGTGAGAGCCTGGAAA-3'
WT1-Ex9-fwd	5'-CAGACATTGCAGGCATGGC-3'
WT1-Ex9-rev	5'-GTGTGGGTCTTCAGGTGGTC-3'

Tabelle 6: Oligonukleotide für EMSA

<b>Bezeichnung</b>	<b>Sequenz</b>
WT1-HRE-sense	5'-[Cy5]-CTGAAATGCCTACGTGACCACAGTGGTC-3'
WT1-HRE-antisense	5'-GACCACTGTGGTCACGTAGGCATTTTCAG-3'
WT1-HREmut-sense	5'-[Cy5]-CTGAAATGCCTAAAAAACCACAGTGGTC-3'
WT1-HREmut-antisense	5'-GACCACTGTGGTTTTTTTAGGCATTTTCAG-3'
EPO-HRE-sense	5'-[Cy5]-GCTGGGCCCTACGTGCTGTCTCACACAG-3'
EPO-HRE-antisense	5'-CTGTGTGAGACAGCACGTAGGGCCCAGC-3'

Tabelle 7: CRISPR/Cas9-Primer für sgRNAs

<b>Bezeichnung</b>	<b>Sequenz</b>
hHIF-1 $\alpha$ _C/Cas9 F2	CACCGCTCGAGATGCAGCCAGATCT
hHIF-1 $\alpha$ _C/Cas9 R2	AAACAGATCTGGCTGCATCTCGAGC
hHIF-2 $\alpha$ _C/Cas9 F1	CACCGCAAGGCCTCCATCATGCGAC
hHIF-2 $\alpha$ _C/Cas9 R1	AAACGTCGCATGATGGAGGCCTTGC

### **3.3 Methoden der Zellkultur**

#### **3.3.1 Kultivierung und Konservierung von Zelllinien**

Die SK-N-AS-, SH-SY-5Y-, IMR-32-, SK-N.BE(2)- und die SH-EP1-Zellen wurden von der American Type Culture Collection erworben. Die humanen Kelly-Zellen entstammten der „Leibniz Institute DSMZ–Deutschen Gesellschaft für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH“. Bei allen verwendeten Zelltypen handelte es sich um adhärente, in Mono- bzw. Multilayer (Kelly) wachsende humane Zellen. Alle verwendeten, immortalisierten Zelllinien wurden ursprünglich aus Neuroblastomen unterschiedlicher Charakteristika isoliert (für Details siehe Tabelle 8). Alle Zelllinien wurden in einem Inkubator bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit, 21 % O<sub>2</sub> und 5 % CO<sub>2</sub> auf Kunststoffzellschalen (Thermo Fisher Scientific) kultiviert. Bis auf die Kelly-Zellen wurden alle Neuroblastomzelllinien in DMEM/Ham's F12 („high glucose“, PAA Laboratories) mit stabilem Glutamin und 10 % FCS (Biochrom) kultiviert. die Kelly-Zellen hingegen wurden in RPMI 1640 („high glucose“, PAA Laboratories) mit GlutaMax (TheDmo Fisher Scientific) und 10 % FCS kultiviert. Zur Erhaltung einer optimalen Konfluenz der Zellen wurden die adhärennten Zellen zur Passagierung nach zweimaligem Waschen mit PBS vorsichtig mit Trypsin (Merck) von der Zellkulturschale gelöst. Die Passagierung erfolgte dreimal pro Woche nach Beurteilung von Konfluenz und Zellmorphologie unter dem Lichtmikroskop (Axiovert 35, Zeiss). Hierbei erfolgte die optische Bestimmung der Zellzahl unter dem Lichtmikroskop (Zeiss) nach Trypanblaufärbung (zur Ermittlung der Fraktion nicht vitaler Zellen) unter Zuhilfenahme einer verbesserten Neubauer-Zählkammer (Marienfeld). Anschließend wurden die Zellen in optimaler Verdünnung in frischem Medium suspendiert und erneut ausgesät. Eine Mykoplasmenkontamination wurde regelmäßig mit Hilfe des Venor®GeM Kits (Minerva Biolabs) ausgeschlossen.

Zur Erhaltung einer kontinuierlichen Reserve von Originalzelllinien möglichst früher Passage erfolgte die Kryokonservierung aller kommerziell erworbenen und generierten stabilen Zelllinien in Stickstofftanks (Tec lab) bei -196 °C. Dafür wurden die zu konservierenden Zellen in geeigneter Konfluenz auf einzelnen 10-cm-Zellkulturschalen (Thermo Fisher Scientific) in möglichst früher Passage vorbereitet. Es erfolgte die Suspension der Zellen in geeignetem Zellmedium mit 10 % DMSO (Santa Cruz) und 20 % FCS (Sigma) nach Ablösung der adhärennten Zellen durch Trypsinierung und Gewinnung eines Zellpellets durch Zentrifugation bei 1000 g. Vor

der eigentlichen Kryokonservierung erfolgte die schonende und gleichmäßige Kühlung der Kryoröhrchen (Greiner BioOne) auf -20 °C mit Hilfe eines Gefriercontainers (Nalgene).

Das Auftauen der Zellen erfolgte zügig durch Resuspension in 37 °C warmen Medium. Zum Auswaschen des toxischen Gefriermediums DMSO erfolgte die mehrfache Zentrifugation bei 1000 g und mehrfache Resuspension des Zellpellets in frischem Medium. Die Aussaat und Kultivierung erfolgte, wenn nicht anders beschrieben, in 10-cm-Zellkulturschalen (Thermo Fisher Scientific).

Tabelle 8: Charakteristika der verwendeten Zelllinien

Zelllinie	Katalognummer	Bezugsquelle	Ursprung	Klinische Daten	MYCN-Amplifikation
Kelly	ACC-355	DSMZ	Nicht näher beschrieben	fehlen	Ja
SK-N-AS	CRL-2137	ATCC	Knochenmarksmetastase eines Kindes mit schlechtdifferenziertem embryonalem Neuroblastom	weiblich, 6 Jahre alt, kaukasisch	Nein
SH-SY-5Y	CRL-2266	ATCC	dreifach klonierte Sublinie (SK-N-SH -> SH-SY -> SH-SY5 -> SH-SY5Y) der Zelllinie SK-N-SH, die 1970 aus einer Knochenmarksmetastase isoliert wurde.	weiblich, 4 Jahre alt	Nein
IMR-32	CCL-127	ATCC	abdominelles Tumorkonglomerat mit Diagnosestellung Neuroblastom und zum Teil organoid differenzierten Arealen	männlich, 13 Monate alt, kaukasisch	Ja
SK-N-BE(2)	CRL-2271	ATCC	Etablierung aus einer Knochenmarksbiopsie eines Kindes mit disseminiertem Neuroblastom und nach mehreren Zyklen Radiochemotherapie	männlich, 2 Jahre alt	Ja
SH-EP1	CRL-2269	ATCC	Nicht näher beschrieben	fehlen	Nein

### 3.3.2 Versuche unter Hypoxie und unter Verwendung von Hypoxiemimetika

Alle Hypoxieversuche wurden in der Whitley H35 Hypoxystation (Don Whitley Scientific) durchgeführt. Dadurch konnte ein unterbrechungsfreies, gleichbleibendes Milieu, auch während intermittierender Versuchsschritte, gewährleistet werden.

Die hypoxischen Bedingungen waren, sofern nicht anders beschrieben, 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 1 % O<sub>2</sub> für mindestens 24 Stunden. Als weiteres Modell kam die simulierte

Hypoxie mittels Verwendung von Dimethyloxallylglycin (DMOG) - ein kompetitiver Inhibitor der Prolylhydroxylasen - zur Anwendung. Hierfür wurde dem Zellkulturmedium bei normoxischen Bedingungen (21 % O<sub>2</sub>) DMOG in einer Endkonzentration von 1 mM für mindestens 24 h hinzugegeben.

### **3.3.3 Transiente Transfektionen**

Wenn nicht anders beschrieben, erfolgten die Transfektionen von Kelly- und SK-NA-S-Neuroblastomzellen bei einer Konfluenz von ca. 60-70 %. Die Zellen wurden mit unterschiedlichen Mengen an Plasmid-DNA transfiziert. Zunächst erfolgte die Inkubation von Plasmid, serumfreiem Zellkulturmedium und Fugene® 6 Transfektionsreagenz (Roche) in einem 1 µg zu 3 µl Verhältnis von Plasmid-DNA zu Fugene® 6 für 20 min bei Raumtemperatur. Es erfolgte ein Mediumwechsel bei den zu transfizierenden Zellen. Danach wurde der Transfektionsansatz vorsichtig dem Zellkulturmedium zugegeben und mit diesem vermischt. Danach erfolgte eine 24-stündige Inkubation der Zellen bei 21 % O<sub>2</sub>. Anschließend wurde ein Teil der Zellen für weitere 24 h bei 1 % O<sub>2</sub> bzw. unter Zusatz des Hypoxiemimetikums DMOG unter normoxischen Bedingungen kultiviert.

### **3.3.4 Knockdown mittels RNA-Interferenz (siRNA)**

Die zu transfizierenden Kelly-Zellen wurden zunächst auf 6-Loch-Platten (Thermo Fisher Scientific) ausgesät und bis zu einer Dichte von etwa 60 % bei 21 % O<sub>2</sub> kultiviert. Anschließend wurden sie jeweils mit einem Gemisch aus vier verschiedenen siRNAs gegen das humane *HIF-1α* (ON-TARGETplus, SMARTpool siRNA, L-004018-00-0005, NC\_000014.9; Dharmacon), gegen das humane *HIF-2α* (ON-TARGETplus, SMARTpool siRNA, L-004814-00-0005, NC\_000002.12; Dharmacon) und als Negativkontrolle mit vier nicht zielgerichteten siRNAs (siGENOME non-targeting siRNA pool 2; Dharmacon) mit dem Dharmafect I Transfektionsreagenz (Dharmacon) nach Herstellerprotokoll transfiziert. Dabei wurden, wenn nicht anders angegeben, 5,26 pmol/cm<sup>2</sup> der siRNA und 1,04 µl/cm<sup>2</sup> Dharmafect I Transfektionsreagenz verwendet. Nach 24 h Inkubation unter normoxischen Bedingungen wurden die Zellen für 24 h unter Hypoxie (1 % O<sub>2</sub>) gesetzt und anschließend Protein und mRNA zur Analyse gewonnen.

### 3.3.5 Transwell-Migrationsassays

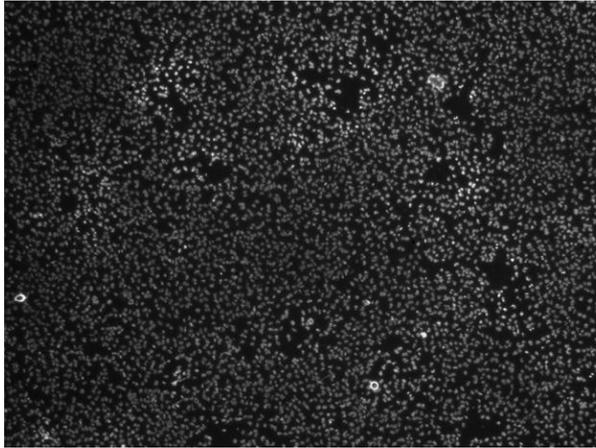
Für die Migrationsassays wurden die SK-N-AS-Zellen in 12 Loch-Platten (Thermo Fisher Scientific) nach oben beschriebenem Protokoll mit gegen *WT1* gerichteter siRNA oder Kontroll-siRNA transfiziert und für 24 h bei Normoxie inkubiert. Für die Kelly-Zellen erfolgte die Inkubation bei Hypoxie (1 % O<sub>2</sub>). Die Migrationsassays wurden in 24-Loch-Transwellfilteransätzen (Corning Life Sciences) durchgeführt. Diese wurden vorbereitet, indem die benötigten Löcher einer 24-Loch-Platte (Thermo Fisher Scientific) mit 600 µl serumhaltigen Medium (37°C) befüllt wurden. Die Zellen einer 10-cm-Schale wurden anschließend von überschüssigem Medium befreit, der Monolayer zweimal mit 37 °C warmen PBS gewaschen und mit 100 µl 1x Trypsin (Merck) vorsichtig von der Zellkulturplatte gelöst. Die Resuspension der Zellen erfolgte zunächst zum Stopp des Enzymverbaus in serumhaltigem Medium. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte unter dem Lichtmikroskop (Zeiss) nach Trypanblaufärbung (zur Ermittlung der Fraktion nicht vitaler Zellen) unter Zuhilfenahme einer verbesserten Neubauer-improved-Zählkammer (Marienfeld). Hiernach wurde die Zellsuspension für 3 min bei 1000 rpm zentrifugiert und das gewonnene Zellpellet in serumfreiem Medium mit einer Endkonzentration von  $0,33 \cdot 10^6$  Zellen/ml aufgenommen und jeweils 100 µl in das entsprechende Inlay eines 24-Loch-Transwellfilters pipettiert. Anschließend wurde die 24-Loch-Platte für weitere 24 h unter Normoxie (oder Hypoxie für die Kelly-Zellen) inkubiert.

Zur Zellfixierung und -färbung wurden die Inlays aus den Platten gelöst und vorsichtig vom Medium befreit. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurde die Innenseite jedes Filters mit Hilfe eines Wattestäbchens vorsichtig, aber gründlich, für 30 s von nicht migrierten Zellen befreit. Nach einem erneuten Waschschrift mit PBS wurden die migrierten Zellen auf der Unterseite durch ein zweiminütiges Bad in 100 % Methanol fixiert. Nach Auswaschen des Methanols mit PBS wurden die Membranen dann vorsichtig mit Hilfe eines Skalpellens aus den Inlays herausgeschnitten. Die Färbung der migrierten Zellen erfolgte für 10 min mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI, ThermoFisher Scientific) unter Lichtabschluss. Nach 10 min Waschen in PBS konnte die Membran dann auf ein Deckglas gelegt und unter dem Mikroskop (Axiovert S100, Zeiss) analysiert werden.

Von jedem Filter wurde ein Bild in 40-facher Vergrößerung aufgenommen und mit Hilfe von ImageJ (National Institutes of Health und Laboratory for Optical and Computational Instrumentation) ein binäres Bild generiert (siehe Abbildung 3). Die Bilder wurden dann

mit Hilfe einer modifizierten und standardisierten Partikelanalyse verarbeitet und somit die Zellzahl automatisch ermittelt (Bild in 40-facher Vergrößerung entspricht einem Drittel der Gesamtfilterfläche).

**Bild in 40-facher Vergrößerung**



**Binäres Bild zur Partikelanalyse**



Abbildung 3: Generierung eines binären Bilds aus der Aufnahme eines mikroskopischen Bildes der fixierten Filter aus einem der Transwellmigrationsassays

Die Aufnahme erfolgte in 40-facher Vergrößerung. Anschließend wurde in ImageJ nach Generierung einer binären Kopie eine standardisierte, automatisierte Partikelanalyse durchgeführt.

### 3.4 Molekularbiologische Methoden

#### 3.4.1 CRISPR/Cas9 Knockout von HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$ und WT1 in Kelly-Neuroblastomzellen

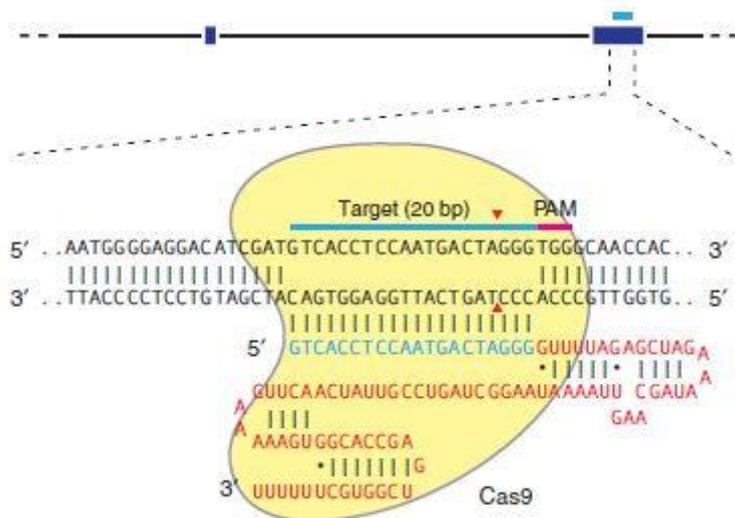


Abbildung 4: Schematische Darstellung der sequenzspezifischen DNA-Interaktion der Cas9 mittels sgRNA

Die Zielsequenz der Doppelstrang-DNA ist mit der blauen Linie gekennzeichnet. Die in rosa gekennzeichnete PAM Sequenz ist auch auf der sgRNA enthalten und essenziell für den exakten Doppelstrangbruch, der drei Basenpaare upstream der PAM Sequenz mit Hilfe der Cas9 induziert wird. Abbildung aus (Ran et al., 2013).

#### Prinzipien der CRISPR/Cas9-Technik

Die CRISPR/Cas9 („clustered regularly interspaced short palindromic repeats“ und „CRISPR associated protein 9“) Technologie ermöglicht es, genomische Veränderungen durch gezielte DNA-Doppelstrangbrüche zu induzieren (Übersicht in (Doudna & Charpentier, 2014)). Sie basiert auf einem in Bakterien und Archaeen weit verbreiteten Abwehrmechanismus gegen invadierende Nukleinsäuren wie z.B. Viren. Bis heute wurden drei verschiedene Typen (I-III) von CRISPR-Systemen in verschiedenen Bakterien und Archaeen beschrieben und charakterisiert (Makarova et al., 2011). Sogenannte CRISPR-Loci im jeweiligen Genom beinhalten CRISPR assoziierte Gene (Cas), nicht kodierende RNAs und charakteristische repetitive Basenelemente. Diese Wiederholungen werden regelmäßig von kurzen, variablen Sequenzen unterbrochen, die von fremden Nukleinsäuren abstammen. Diese sogenannten Protospacer bilden zusammen mit den repetitiven Sequenzen die sogenannte crRNA (CRISPR-RNA). Entscheidend für das Schneiden der spezifischen

DNA-Sequenz ist die zwingend mit dem Protospacer assoziierte PAM-Sequenz (protospacer adjacent motif). Der crRNA-Locus kodiert nicht nur für die sequenz- und schnittspezifische guide-RNA, sondern auch für die zur Prozessierung wichtige tracrRNA (transactivating crRNA). In der Molekularbiologie findet das am besten charakterisierte Typ II CRISPR System breite Anwendung und ist den Zink-Finger-Nukleasen und den TALENs (transcription activator-like effector nuclease) in vielerlei Hinsicht überlegen (Gaj, Gersbach & Barbas, 2013). Hier werden crRNA und tracrRNA zur 20 bp langen single guide RNA (sgRNA) fusioniert und ermöglichen so eine fast unbegrenzte Zahl an Schnittstellen in unmittelbarer Nähe der upstream PAM-Sequenz 5'-NGG (Ran et al., 2013).

Nach dem DNA-Schnitt gibt es in humaner DNA zwei verschiedene Reparaturmechanismen, die man sich für unterschiedliche Zwecke des Genom-Ingenieurswesens zu Nutze macht: „Non homologous end joining“ (NHEJ) und „Homology directed repair“ (HDR). HDR bezeichnet einen auf einer DNA-Reparaturschablone basierenden Mechanismus, der zum präzisen Ändern einzelner Basenabschnitte in der Zielsequenz genutzt wird. Das fehlerhafte NHEJ kann man sich zu Nutze machen, um nach einem Doppelstrangbruch Insertionen und Deletionen bei der Reparatur des Locus zu verursachen und so eine Verschiebung des DNA-Leserasters (Frameshift Mutation) oder den vorläufigen Abbruch der Translation (frühzeitiges Stopcodon) zu induzieren. Das resultierende Protein ist dadurch in einer Weise verändert, dass von einer Funktionslosigkeit ausgegangen werden kann, bzw. ein stabiler Knockout des Proteins erzeugt wurde.

#### Klonierung des CRISPR/Cas9 – GFP Plasmids:

Es wurde das Plasmid pSpCas9(BB)-2A-GFP (Addgene plasmid # 48138; <http://n2t.net/addgene:48138>; RRID: Addgene\_48138) für die Klonierung verwendet. Abbildung 5 zeigt eine schematische Darstellung des ca. 9300 bp langen Plasmids. Es beinhaltet die Expressionskassette für das Cas9-Protein von *Streptococcus pyogenes* und einen Klonierungsbereich für eine beliebige single-guide-RNA. Tabelle 7 zeigt die Oligonukleotidsequenzen, die in das Plasmid kloniert wurden, um eine spezifische Cas9-Expression und den gewünschten Doppelstrangbruch an der korrekten Stelle im Genom zu induzieren. Nach erfolgter Transfektion kommt es zur Koexpression eines grün fluoreszierenden Proteins (GFP). Unter dem UV-Mikroskop konnten so die transfizierten Zellen identifiziert und die ungefähre Transfektionseffizienz bestimmt

werden. Die Optimierung des Transfektionsprotokolls führte zu verbesserten Effizienzen über 5 %, sodass die anschließende Zellsortierung vereinfacht und die Ausbeute an Einzelzellkolonien erhöht wurde.

Created with SnapGene®

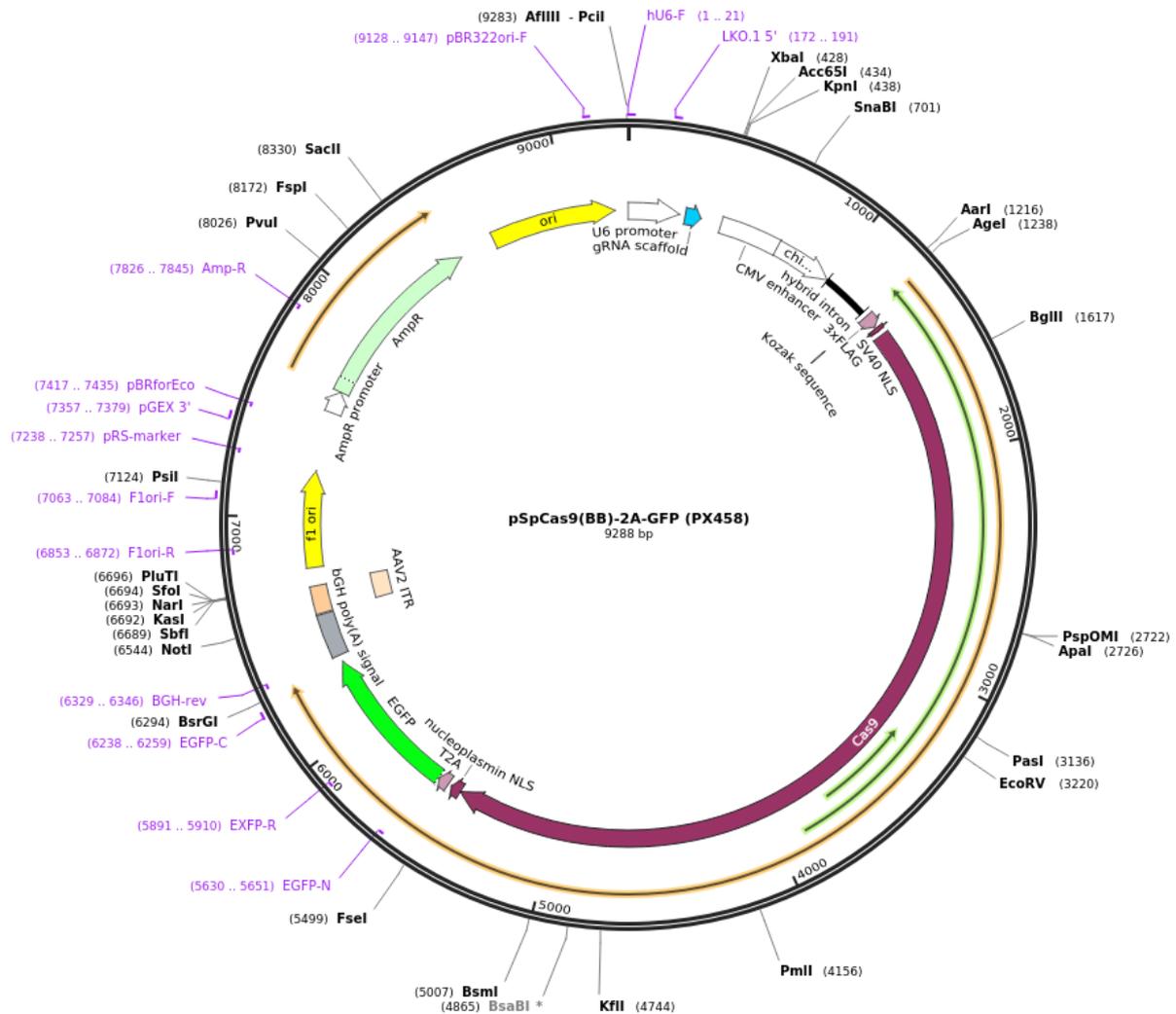


Abbildung 5: Schematische Darstellung des CRISPR/Cas9 GFP-gekoppelten Klonierungsplasmids pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458) von AddGene

Ganz außen in schwarz sind in der Sequenz enthaltene Schnittstellen für Restriktionsenzyme angegeben. Die Zahl in Klammern hinter der Bezeichnung der Schnittstelle beschreibt die Lage auf dem ca. 9300 bp langen Plasmid. Spezifische Stellen der funktionellen Sequenz sind in lila dargestellt. Außerdem sind funktionelle Abschnitte, wie z.B. die für das grün fluoreszierende Protein kodierende Sequenz oder die für die Ampicillinresistenz kodierende Sequenz, mit farbigen Pfeilen schematisch dargestellt (Feng Zhang, Addgene plasmid # 48138; <http://n2t.net/addgene:48138>; RRID: Addgene\_48138).

### Linearisierung und Dephosphorylierung des Plasmids:

Die Linearisierung des Plasmids erfolgte mit dem Restriktionsenzym Bpi I FD Thermo (ThermoFisher Scientific). Dazu wurden 7,5 µg Plasmid-DNA mit 7,5 µl Bpi I FD Thermo (#FD1014, ThermoFisher Scientific) und 10 µl 10x FD Puffer (Thermo Fisher Scientific) ad 100µl ddH<sub>2</sub>O für zehn Minuten im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde 5 µl Alkaline Phosphatase (#FD0654 Fast AP, Thermo Fisher Scientific) hinzugegeben und weitere 30 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert.

### Gelelektrophorese und DNA-Aufreinigung:

Zur Verifizierung der erfolgreichen Linearisierung wurde die gesamte Probe (mit 1 x Ladepuffer) auf ein 1 %iges Agarosegel mit 0,5 % (v/v) SYBR Green Reagenz geladen und 1 h bei 80 V aufgetrennt. Das unbehandelte Plasmid wurde als Vergleichskontrolle herangezogen. Das linearisierte Plasmid wurde mit 2 mm Randabständen aus dem Gel herausgeschnitten und mit dem Mini Elute Gel Extraction Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben aufgereinigt und eluiert.

### Phosphorylierung und Annealing der zu ligierenden Oligonukleotide:

Tabelle 9: Schema für Annealing und Phosphorylierung der Oligonukleotide

F-Primer	100 ng
R-Primer	100 ng
T <sub>4</sub> -Polynukleotidkinase (Promega)	10 u/µl 0,5 µl
10x Kinase Puffer (Promega)	0,5 µl
ATP 10 mM (Thermo Fisher Scientific)	0,5 µl
ddH <sub>2</sub> O	Ad 5 µl

Die Proben wurden 30 min bei 37 °C im Thermocycler inkubiert. Nach Erhitzen auf 95 °C für 5 min wurden die Proben mit einer Kühlrate von  $\Delta T = -5$  °C/min auf Raumtemperatur abgekühlt.

## Ligation von phosphoryliertem Oligonukleotid und linearisiertem, dephosphoryliertem

### Plasmid:

Tabelle 10: Ligationsschema

Plasmid	30 ng
Oligonukleotid-Mix	75 ng
T <sub>4</sub> -Ligase 20 u/µl (Promega)	1 µl
2x Rapid Ligase Puffer (Promega)	5 µl
ddH <sub>2</sub> O	Ad 10 µl

Es folgte eine zehnmünütige Inkubation bei Raumtemperatur.

### Transformation des Ligationsprodukts in kompetente E. coli und Plasmidaufreinigung:

Sofern nicht anders beschrieben, erfolgten alle Arbeitsschritte bei mindestens 4 °C bzw. während ständiger Kühlung auf Eis. Das Ligationsprodukt wurde im Verhältnis 1:10 zu kompetenten TOP 10 E. coli gegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Die Transformation erfolgte bei 42 °C für 1 min im Wasserbad. Anschließend wurde nach einminütiger Kühlung auf Eis das zehnfache Volumen an SOC Medium hinzugegeben und die Suspension für 1 h bei 37 °C im Inkubator präinkubiert. Die Bakteriensuspension wurde bei 6000 rpm 1 min lang zentrifugiert, der Überstand bis auf 20 µl entfernt und die Resuspension auf mit Ampicillin versetztem Agar ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Für jedes Oligonukleotidkonstrukt wurden 4 bis 6 Bakterienkolonien mit Hilfe einer Pipettenspitze von der Agarplatte isoliert, in 5 ml LB Medium mit 0,1 % (v/v) Ampicillin resuspendiert und über Nacht als Schüttelkultur bei 37 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurde das Plasmid mit dem PureYield Plasmid Miniprep System (Promega) nach Herstellerangaben aus den Bakterien isoliert und zur Überprüfung des korrekten Inserts zum Sequenzieren eingeschickt (Serviceleistung durch MWG Eurofins).

### Plasmidtransfektion:

Die Transfektion der CRISPR/Cas9-Konstrukte erfolgte in ca. 60 % konfluenten Kelly-Zellen auf 6-Loch-Zellkulturplatten (Thermo Fisher Scientific). Nach 24 h wurde die Transfektionseffizienz unter dem Fluoreszenzmikroskop (Axiovert S100, Zeiss) überprüft und bei ausreichender Zahl an grün fluoreszierenden Zellen die Zellen für die Durchflusszytometrie vorbereitet.

### FACS – Durchflusszytometrische Zellsortierung:

Zur Vorbereitung der Zellsortierung erfolgte die Gewinnung von konditioniertem, zellspezifischem Medium. Dazu wurde zunächst RPMI-Medium (Thermo Fisher Scientific) von ca. 50 % konfluenten Kelly-Zellen (10-cm-Zellkulturschalen) abgenommen und für 10 min bei 5500 rpm zentrifugiert, um eventuelle Zellen und Zelltrümmer vom Medium zu trennen. Der Überstand wurde anschließend durch Membranen mit 0,2 µm Porendurchmesser filtriert. Die Verwendung des konditionierten Mediums erfolgte, wenn nicht anders beschrieben, im Verhältnis 1:1 mit frischem Medium. Vor der Durchflusszytometrie wurde eine entsprechende Anzahl an 96-Loch-Platten mit diesem Medium und Penicillin/Streptomycin zur Vorbeugung von bakteriellen Verunreinigungen während des semisterilen Sortings befüllt und auf 37 °C erwärmt. Die transfizierten Zellen wurden zunächst von überschüssigem Medium befreit und zweimal mit PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen mit 1x Trypsin (Merck) vorsichtig von der Zellkulturschale gelöst und in frischem Medium resuspendiert. Nach Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen bei 3000 rpm für 3 min abzentrifugiert, das Pellet mit PBS gewaschen und in 500 µl PBS aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen auf Eis zur FACS-Core Facility des Deutschen Rheumaforschungszentrums bzw. Berlin Center for Regenerative Therapies transportiert. Dort wurden die Zellen zur Vermeidung von Zellklumpen durch einen Filter mit 30 µm Porendurchmesser filtriert und die GFP-positiven Zellen im BD FACSAria™ II (BD Biosciences) mittels Einzelzellsorting in die vorbereiteten 96-Loch-Platten sortiert (Serviceleistung der FACS Core Facility des DRFZ). Diese wurden im Anschluss weiterhin mit Penicillin/Streptomycin-Zusatz in konditioniertem Medium kultiviert und bei entsprechender Koloniegröße bzw. Konfluenz auf größere Zellkulturplatten und -schalen expandiert.

### Einzelklonprüfung und Bestätigung des Knockouts auf genomischer Ebene:

Aus den verschiedenen Klonen wurde nach dem unten beschriebenen Protokoll (siehe SDS Page und Western Blot) Protein zum Nachweis des Knockouts mittels Western Blot gewonnen. Bei positivem Western Blot Ergebnis wurde ,ebenfalls mit Hilfe des Genra Puregene Kits (Qiagen), nach Herstellerprotokoll genomische DNA isoliert und unter Verwendung von Primern, die die zu modifizierende Genregion flankierten, mittels PCR amplifiziert.

Die PCR erfolgte dabei nach folgendem Schema:

Tabelle 11: PCR Schema gDNA

Genomische DNA	2 µl (50 ng/µl)
dNTPs	1 µl (10mM)
F-Primer	1 µl
R-Primer	1 µl
Ampli-Taq Polymerase (Roche)	0,2 µl (1 U/µl)
ddH <sub>2</sub> O	Ad 25 µl

Das PCR-Gemisch wurde zunächst für 5 min auf 94 °C erhitzt. Anschließend erfolgten 40 Zyklen mit Denaturierung bei 94 °C für 30 sec, Primerhybridisierung bei 60 °C für 30 sec und dem Elongationsschritt bei 72 °C für 45 sec.

Die PCR-Produkte wurden anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt und mit dem MiniElute PCR Purification Kit (Qiagen) nach Herstellerprotokoll aufgereinigt und sequenziert (MWG Eurofins). Die erhaltene Sequenz wurde zum Abschluss mit der Wildtypsequenz verglichen, um die genaue Mutation nachzuweisen und letztlich einen homo- oder heterozygoten Knockout (folgend aus einer Frameshift-Mutation) nachzuweisen.

### 3.4.2 RNA-Extraktion

Zur Extraktion der Gesamt-RNA wurde unter sterilen Bedingungen das Kulturmedium entfernt und die Zellen vorsichtig mit eiskaltem PBS (Thermo Fisher Scientific) gewaschen. Die Zellyse erfolgte durch Zugabe von TriZol<sup>®</sup>-Reagenz (Invitrogen) bzw. RNA-Bee (Amsbio). Die Zellsuspension wurde 5 min lang homogenisiert und nach Zugabe von 0,2 ml Chloroform pro 1 ml TriZol<sup>®</sup> für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation (12000 g, 15 min, 4 °C) zur Phasentrennung wurde die obere wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt, es folgte die RNA-Präzipitation mit 0,5 ml Isopropanol, Waschen des RNA-Pellets in 75 %-igem Ethanol und die Resuspension in RNase freiem Wasser.

### 3.4.3 Bestimmung der optischen Dichte: Konzentrationsbestimmung von DNA, RNA und Protein

Zur Bestimmung der optischen Dichte (OD) der Nukleinsäuren wurde eine Messung bei 260 nm im NanoDrop 2000 (Thermo Fisher) im Abgleich gegen das verwendete

Lösungsmittel (Wasser bzw. Puffer) durchgeführt. Einer OD von 1 bei 260 nm entsprechen 50 µg/ml dsDNA und 40 µg/ml RNA. Zur Bestimmung der Verunreinigung der Proben mit Proteinen wurde zusätzlich die OD bei 280 nm gemessen. Lag das Verhältnis 260/280 zwischen 1,6 und 1,8 (DNA) bzw. 1,8 und 2,0 (RNA), wurde die ausreichende Reinheit der Proben angenommen. Zur Konzentrationsbestimmung der Proteinproben wurde die OD bei 280 nm und 260 nm ermittelt und mit Hilfe der Formel  $1,55 \times OD_{280} - 0,76 \times OD_{260}$  der Proteingehalt bestimmt (Stoscheck, 1990).

#### **3.4.4 Reverse Transkription**

Zur Vergleichbarkeit der Proben wurden 2 µg Gesamt-RNA direkt nach der Isolation für die Umschreibung zu cDNA verwendet. Die RNA-Lösung wurde mit RNase-freiem Wasser auf 11 µl aufgefüllt. Nach Zugabe von 1 µl dNTPs (Bioline) und 1 µl OligodT bzw. RandomHexamer erfolgte eine fünfminütige Inkubation bei 65 °C im Thermocycler. Nach mindestens 1 min bei 4 °C wurde ein Mastermix bestehend aus 4 µl 5x RT Puffer, 2 µl 0,1 M DTT und 0,5 µl SST III Reverse Transkriptase hinzugegeben und anschließend 50 min lang bei 65 °C und 15 min lang bei 75 °C inkubiert. Die cDNA wurde mittels RT-qPCR vermessen und bei -20 °C gelagert.

#### **3.4.5 SDS-Page und Western Blot**

Für die Proteingewinnung aus den Zellen wurde das Zellkulturmedium entfernt und der Monolayer zweimal mit 4 °C kaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen je nach Größe der Kulturschale mit 100 bis 300 µl 1x SDS-Puffer lysiert und durch mehrfaches Hoch- und Herunterpipettieren homogenisiert. Proben, in denen HIF-Proteine nachzuweisen waren, wurden in einem speziellen Puffer auf PE-Rohpuffer Basis aufgenommen (HIF-Lysepuffer). Zur Reduzierung der Viskosität wurden die Proben dreimal 2 s mit Ultraschall behandelt. In verschiedenen Ansätzen wurden 10-25 µg Protein verwendet, mit 6x Ladepuffer versetzt und 5 min bei 95 °C im Heizblock denaturiert. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in einem 10 %-igen TGX™ Fastcast™ Acrylamid-Gel für 70-90 min. Danach wurden die Proteine mit Hilfe eines halbtrockenen Blottingsystems bei 15 V über 45 min auf eine Polyvinylidendifluorid-Membran übertragen. Diese wurde zuvor kurz in Methanol äquilibriert und gemeinsam mit den verwendeten Filterpapieren für 30 min inkubiert. Zur Überprüfung des erfolgreichen Proteintransfers wurden die Membranen mit Ponceau S für 30 Sekunden zwischengefärbt und anschließend mit 0,1 M NaOH entfärbt. Zur Blockierung

unspezifischer Antikörperbindungsstellen wurde die Membran in 5 % Magermilchlösung (in TBS-Tween) bei Raumtemperatur für 60 min inkubiert. Die Inkubation des Primärantikörpers in 2,5 % Magermilchlösung (in TBS-Tween) erfolgte über Nacht bei 4 °C. Nach viermal 10 min Waschen in TBS-Tween wurde eine Stunde lang mit dem HRP-konjugierten Sekundärantikörper in 2,5 % Magermilchlösung in TBS-Tween bei Raumtemperatur inkubiert. Zur chemilumineszenten Detektion des Zweitantikörpers erfolgte die Inkubation mit dem ECL Reagenz (Biozym) für zwei min bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Membran luftblasenfrei in Klarsichtfolie eingeschweißt und im ECL Chemostar Advanced Imager (Intas) analysiert (standardmäßige Belichtungszeiten von 2, 5, 10, 30 und 60 min als Inkremente programmiert). Zur Verifizierung der gleichmäßigen Proteinbeladung wurden im Anschluss Western Blots für ein *housekeeping* Protein durchgeführt. Hierzu wurden sämtliche Antikörper entweder durch Inkubation mit 0,2 M NaOH für 5 min bei Raumtemperatur oder mittels dreistündiger Inkubation mit HRP-Stripping Buffer von der Membran entfernt. Nach viermal 10 min Waschen in TBS-Tween und einstündigem Blocken in 5 % Magermilchlösung in TBS-Tween erfolgte die Inkubation mit dem Erstantikörper gegen beta-Aktin, GAPDH oder 18S über Nacht bei 4 °C.

### 3.4.6 Antikörper

Tabelle 12: Liste der verwendeten Antikörper

Anwendung	Klonalität	Spezies	Spezifität	Quelle	Katalognummer
WB	MAK	Maus	all-Aktin	Chemicon	MAB1501R
WB	MAK	Maus	m/r/h-GAPDH	Chemicon	MAB374
WB	PAK	Kaninchen	m/r/h-HIF-1 $\alpha$	Novus Biologicals	NB 100-449
WB	PAK	Kaninchen	h-HIF-2 $\alpha$	Oxford Group	- Vermerk: PM 8
WB, ChIP	MAK		h/m-HIF-2 $\alpha$	Novus Biologicals	NB 100-132
WB	MAK	Kaninchen	m/r/h-Wt1	Abcam	ab52933
WB	PAK	Kaninchen	m/r/h-Wt1	Santa Cruz Biotechnologies	sc-192
ChIP	PAK	Kaninchen	m/r/h-HIF-2 $\alpha$	Abcam	ab199
ChIP	PAK	Kaninchen	m/h-H3K27ac	Diagenode	C15410174
ChIP	PAK	Kaninchen	m/r/h/c-Pol II	Santa Cruz Biotechnologies	sc-899x
ChIP	PAK	Kaninchen	Unspezifisch; Rb-IgG	Diagenode	C15410206

### 3.4.7 Quantitative RT-PCR

Die RT-qPCR wurde mit dem StepOnePlus™ Real-Time PCR System (bestehend aus Software und Gerät) durchgeführt. Für jede zu messende Probe wurden stets mindestens zwei technische Replikate und für jedes vermessene Primerpaar zwei Negativkontrollen mit ddH<sub>2</sub>O angesetzt. Es wurden MicroAmp®Fast 96-Well Reaction Plates (Life Technologies) verwendet und mit Adhesive Clear PCR Seals (Biozym) versiegelt. Der Probenansatz bestand standardmäßig aus 2 µl cDNA (1/10 verdünnt mit ddH<sub>2</sub>O), 400 nM Primermix in 3 µl dd H<sub>2</sub>O und 5 µl 2 x SYBR® Green PCR Master Mix (Life Technologies). Im Folgenden sind die Standardeinstellungen eines zweistündigen RT-qPCR Laufs mit SYBR Green Reagenzien aufgeführt:

Die Proben wurden 10 min lang auf 95°C erhitzt, es folgten 45 Zyklen mit 95 °C/15 s (Denaturierung), 60 °C/60 s (Primerannealing und Elongation) und 77 °C/30 s (Fluoreszenzdetektion). Zur Überprüfung des korrekten Amplikons wurde anschließend die Schmelzkurve (kontinuierliche Fluoreszenzmessung des PCR Produktes unter konstanter Erwärmung von 60 °C auf 95 °C in 0,3 °C/15 s) ermittelt. Für jeden Primer wurde außerdem einmalig eine gelelektrophoretische Auftrennung des PCR Produktes durchgeführt, um das Amplikon anhand seiner Größe zu identifizieren. Zur Beurteilung der enthaltenen cDNA Menge wurden die Ct-Werte (cycle threshold: Amplifikationszyklus, in dem das Lichtsignal der Probe das Hintergrundsignal übersteigt) herangezogen. Stets wurden die Ct-Werte des Housekeeping Gens (je nach Kontext 18S, GAPDH oder β-Aktin) von denen des zu untersuchenden Gens subtrahiert. Die so gewonnenen ΔCt-Werte spiegeln das Transkriptionsniveau des zu untersuchenden Gens wider, bezogen auf ein vom Experiment unabhängiges Gen. X-fache Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Zellen wurden nach der Formel  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  berechnet (Livak & Schmittgen, 2001).

#### **3.4.8 Chromatinimmunopräzipitation (ChIP)**

Die ChIP-Experimente wurden mit freundlicher Unterstützung von Dr. rer. nat. Katharina Krueger geplant und durchgeführt. Das Vorgehen erfolgte dabei anhand nachfolgender Schritte:

#### Formaldehydquervernetzung:

Für den ChIP-Assay wurden Kelly-Zellen auf 10 cm Schalen bei 21 % oder 1 % O<sub>2</sub> für 24 Stunden kultiviert. Durch Zugabe von Formaldehyd in 1 %-iger Endkonzentration und Inkubation für 10 min bei Raumtemperatur wurden die DNA-gebundenen Proteine quervernetzt. Anschließend wurde die Reaktion mit 125 mM Glycin Endkonzentration für 5 min bei Raumtemperatur gestoppt. Die Zellen wurden dann zweimal mit eiskaltem PBS + Proteinaseinhibitor gewaschen und der Zell-Monolayer mittels Zellschaber in 2 ml Residualmedium suspendiert. Nach Zentrifugation für 5 min bei 4 °C und 1350 g wurde das Zellpellet entweder bei -80 °C eingefroren oder unmittelbar für die nachfolgenden Arbeitsschritte verwendet.

#### Zellyse und Ultraschallbehandlung:

Das Zellpellet wurde in hypotonem ChIP-Lysepuffer + Proteinaseinhibitor resuspendiert und zweimal für 5 s bei 40 % der maximalen Schallintensität ultraschallbehandelt. Daraufhin wurde der Ansatz für 5 min bei 4 °C und 3000 g zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes erfolgte ein Waschschriff mit oben genanntem ChIP-Lysepuffer und nach erneuter Zentrifugation das Lösen des Zellpellets in 300 µl SDS-Lysepuffer + Proteinaseinhibitor. Das Zellysate wurde anschließend mittels Bioruptor Plus (Diagenode) mit maximal 20 Zyklen (30 s Ultraschall high intensity und 45 s Pause) ultraschallbehandelt und somit eine Scherung in DNA-Fragmente von 200-600 bp Länge erreicht. Nach abschließender Zentrifugation für 5 min bei 4 °C und 14000 g konnte der Überstand für die Immunpräzipitation verwendet werden.

#### Immunpräzipitation:

Für die Immunpräzipitation wurden zu gleichen Anteilen Magnetpartikel (Merck Millipore) verwendet, an die jeweils rekombinantes Protein A und Protein G gekoppelt waren. Die Magnetpartikel wurden pro Immunpräzipitation mit 5 x IP + Proteinaseinhibitor gewaschen, anschließend in 200 µl IP + Proteinaseinhibitor resuspendiert und mit dem jeweiligen Antikörper über 2 h bei 4 °C und 200 rpm im Rotator inkubiert.

Nach Bestimmung der Chromatin-DNA-Konzentration der gescherten DNA nach der OD-Methode wurden zur Präzipitation 30 µg Chromatin zum Magnetpartikel-Antikörpergemisch gegeben und über Nacht bei 4 °C im Rotator bei ca. 200-300 rpm

inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden die immunpräzipitierten Proben dann jeweils für 5 min bei Raumtemperatur in Waschpuffer mit niedrigem Salzanteil, Waschpuffer mit hohem Salzanteil, Lithium Puffer und zweimal in TE-Puffer (siehe Tabelle 4) gewaschen. Anschließend erfolgte die Elution der gebundenen DNA mit insgesamt 500 µl Elutionspuffer EB durch Vortexen und 15 min Rotationsinkubation bei RT.

#### Decrosslinking und Proteinverdau:

Das Aufheben der Proteinquerverbindungen erfolgte durch Hinzugabe von 30 µl 5 M NaCl und dreistündiger Inkubation bei 65 °C. Um die spätere DNA-Aufreinigung zu verbessern, wurde anschließend der Proteinverdau mit 10 µl 0,5 M EDTA, 10 µl 2 M Tris-HCl (pH 6,6) und 2 µl Proteinase K (20 mg/ml) bei 45 °C für eine Stunde durchgeführt.

#### DNA-Aufreinigung:

Anschließend wurde der Verdau mit 500 µl Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) vermischt und für 5 min bei 4 °C mit 17000 g herunterzentrifugiert. Daraufhin wurde die obere, wässrige Phase (ca. 500 µl) in ein neues Eppendorfgesäß überführt und mit 10 µl Glykogen (5 µg/µl) und 24 µl 5 M NaAc vermischt. Die Fällung erfolgte mit 1 ml 100 %-igem Ethanol über Nacht bei -80 °C.

Am nächsten Tag wurde für 20 min bei 4 °C und 17000 g zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde das DNA-Pellet mit 750 µl 75 %-igem Ethanol gewaschen und erneut für 5 min bei 17000 g und 4 °C abzentrifugiert. Das getrocknete Pellet wurde anschließend in 100 µl TE-Puffer resuspendiert und für 30 min bei 37 °C mit RNase A zum Verdau etwaiger RNAs inkubiert. Für die RT-qPCR (Protokoll siehe oben) wurden stets 2 µl eingesetzt. Die verwendeten Primer sind Tabelle 5 zu entnehmen.

### **3.4.9 Gewinnung von Kernextrakten für EMSA**

Die Zellen wurden der Versuchsbedingung entsprechend auf 10 cm Schalen mit ca. 80 % Konfluenz kultiviert. Zunächst wurde das Zellmedium verworfen, der Zelllayer vorsichtig zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und die Zellen sorgfältig von überschüssiger Flüssigkeit befreit. Es wurden anschließend 150 µl Kernextraktbuffer A (siehe Tabelle 4) hinzugefügt und die adhärennten Zellen vorsichtig mittels Zellschaber von der Oberfläche der Zellkulturschale gelöst. Durch vorsichtiges Hoch-

und Herunterpipettieren wurden die Zellen gleichmäßig im Puffer resuspendiert und in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt. Nach 20 min Inkubation bei 4 °C wurde das Zellysate bei 4 °C und 5000 rpm für 5 min in der Tischzentrifuge herunterzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Kernpellet wurde dann in 50 µl Kernextrakt Puffer B (siehe Tabelle 4) resuspendiert und für 30 min bei 4 °C mit Hilfe eines sterilen Magnetrührfischs homogenisiert. Der anschließende Zentrifugationsschritt erfolgte bei 4 °C und 13000 rpm für 30 min. Anschließend wurde der Überstand (Kernfraktion) in ein frisches 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Zuletzt erfolgte die Proteinkonzentrationsbestimmung unter Verwendung des BCA-Proteinkits (Thermo Fisher) nach Herstellerangaben.

#### **3.4.10 Elektromobilitätsshiftassay (EMSA)**

EMSAs wurden mit Kernextrakten aus Kelly-Zellen nach Kultivierung unter Normoxie (21% O<sub>2</sub>; 24 h) oder Hypoxie (1% O<sub>2</sub>; 24 h) durchgeführt. Jeweils 10 µg der Kernextrakte wurden zusammen mit 1x Bindepuffer EMSA, 5% Glycerol und 1 µg Kalbsthymus-DNA (Sigma) in die Bindungsreaktion eingesetzt und für 15 min auf Eis inkubiert.

Zur Durchführung der Supershift-Experimente wurde den Reaktionsansätzen 1 µg des Antikörpers gegen HIF-1α (Novus, 100-449) oder HIF-2α (Novus, 100-132) hinzugefügt und für 1 h auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 1 pmol der in Tabelle 6 gelisteten Oligonukleotide (am 5'-Ende mit Cy5 fluoreszenzmarkiert; MWG Eurofins Genomics) beigefügt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur kompetitiven Hemmung der markierten HRE-Oligos wurde ein unmarkiertes Oligonukleotid, das die Sequenz eines beschriebenen Epo 3'-Enhancers enthielt (G. L. Wang & Semenza, 1995), in 100-facher, 50-facher und einfacher Konzentration hinzugefügt. Die Reaktionsprodukte wurden auf ein 6 %-iges Polyacrylamidgel in 1 x Tris-EDTA Puffer aufgetragen und für 2 h bei 100 V aufgetrennt. Das Fluoreszenzsignal der markierten Oligonukleotide wurde mit dem ChemoCam Imaging System (Intas Science Imaging) detektiert.

### 3.4.11 Reporter-Assays

Die Transfektion der Kelly-Zellen erfolgte bei ca. 70-80 % Konfluenz. Dazu wurden die Zellen am Vortag nach Zellzahlbestimmung mit Hilfe einer erweiterten Neubauer Zählkammer auf 24-Loch-Zellkulturplatten (Thermo Fisher Scientific) ausgesät. Es erfolgte die Kotransfektion von 250 ng eines Firefly Luciferase Reporterkonstruktes (pGL3 basic, Promega) und 25 ng eines Renilla Luciferase Plasmids (Promega), um die Transfektionseffizienzen zu normalisieren. Die Transfektion erfolgte mit dem Fugene® 6 Transfektionsreagenz (Roche) wie oben beschrieben. Nach 24-stündiger Inkubation bei 21 % O<sub>2</sub> mit den Transfektionsansätzen erfolgte eine weitere Inkubation der Zellen bei entweder 21 % oder 1 % O<sub>2</sub> bzw. mit dem Zusatz von DMOG. Die Promotorkonstrukte exprimierten eine Firefly Luciferase unter der Kontrolle entweder eines SV40 Promotors (pGL3-Promoter Vektor, Promega) oder einer 2,5 kb langen Sequenz des humanen *WT1* Promotors (in pGL3 basic Vektor, Promega). Für weitere Experimente wurde in beide Plasmide ein 256 bp langes DNA-Fragment, das die putative intronische HIF Bindungsstelle enthielt, in 5'-Position zu den jeweiligen Promotoren ligiert. Für die Messungen wurde dann zügig das Medium von den Zellen entfernt und der Zelllayer vorsichtig zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Die Zellyse erfolgte in Passive Lysis Buffer (Promega) für eine Stunde bei -20 °C. Das Lysat wurde anschließend homogenisiert und mit Hilfe des FB 12 Luminometers (Berthold) nach Zugabe des Firefly Reagenzes (Promega) vermessen. Sofort im Anschluss erfolgte die Zugabe von Renilla Juice (Promega) + 1 % Coelenterazine (Promega) und die Messung der Renilla Luciferase Aktivität. Zur Datenverarbeitung wurden alle Firefly Luciferase Aktivitäten auf ihre jeweilige Renilla Luciferase Aktivität normalisiert, um unterschiedliche Transfektionseffizienzen in unterschiedlichen Ansätzen auszugleichen. Die Darstellung erfolgte in relativen Lichteinheiten der normalisierten Luciferase Aktivitäten.

## **3.5 Analyse bioinformatischer Datensätze**

### **3.5.1 R2-Datenbankanalysen**

Die „R2: Genomics analysis and visualization platform“ ist eine kostenlose und öffentlich zugängliche Online-Plattform (Link: <https://hgserver1.amc.nl/cgi-bin/r2/main.cgi>). Die browsergestützte Anwendung erlaubt es, benutzerfreundlich klinische und bioinformatische Daten zu suchen, analysieren, integrieren und visualisieren. Die Online-Bibliothek der Website wird kontinuierlich um neue Datensätze erweitert. Dabei handelt es sich hauptsächlich um genomische Daten von primären Tumorproben. Zusätzlich zu umfangreichen Genexpressionsdaten der Probensets gibt es auch Informationen in unterschiedlichem Umfang zu klinischen Verläufen, Patienteneigenschaften und klinisch-onkologischen oder histologischen Klassifikationen der Proben. In der vorliegenden Arbeit wurden hauptsächlich immortalisierte Tumorzelllinien als Modell genutzt. Um gewonnene Erkenntnisse besser in einen klinischen Kontext einordnen zu können und eventuelle Implikationen für die Pathogenese von Neuroblastomen ableiten zu können, wurde die R2-Datenbank als augmentierendes Medium genutzt. Hier können anhand deutlich größerer Fallzahlen und einer umfangreichen Untersuchung der Tumorproben bessere Aussagen bezüglich des Einflusses eines oder mehrerer Gene auf Krankheitsverlauf oder Mortalität formuliert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde R2 genutzt, um die Expression von Hypoxie induzierbaren Faktoren und *WT1* in einen klinischen Kontext einzubetten. Die hauptsächlichsten Fragestellungen waren dabei: Expressieren primäre Neuroblastomtumoren Hypoxie induzierbare Faktoren und *WT1*? Gibt es Unterschiede in der Expression zwischen verschiedenen Patienten? Kann man diese Unterschiede mit Krankheitsverläufen oder Mortalität korrelieren?

### **3.5.2 Kaplan-Meier-Scan**

Das genutzte Tool hierfür war das sogenannte „Kaplan Meier by gene expression“. Hierfür kalkuliert das Analyse-Tool der R2-Plattform für jedes Gen oder jede andere numerische Variable einen optimalen Grenzwert, um die Proben in eine Kohorte mit guter bzw. schlechter Prognose einzuordnen. Anschließend werden die Tumorproben je nach Expression dieses Gens entsprechend des Grenzwertes in zwei Subgruppen aufgeteilt, vorausgesetzt, die Einteilung erfüllt für beide die Bedingung einer vorher durch den Benutzer festgelegten minimalen Gruppengröße. Anschließend werden für

beide Gruppen Überlebensraten analysiert und graphisch dargestellt. Typischerweise findet sich die graphische Aufzeichnung der Zeit nach Diagnose auf der x-Achse und der Anteil der noch lebenden Patienten auf der y-Achse wieder und es entsteht ein im x-Verlauf fallender Graph. Für jeden potenziellen Grenzwert (im Folgenden auch „Cutoff“ genannt) ermittelt das Programm einen P-Wert, der die Signifikanz des Unterschieds der beiden Subgruppen für den entsprechenden Grenzwert angibt. Das Programm ermittelt den besten P-Wert für alle untersuchten Grenzwerte und selektiert den entsprechenden Grenzwert. Nach diesem wird der Graph angefertigt und samt des Grenzwertes, des P-Wertes, der Gruppengrößen und eines nach Bonferroni korrigierten P-Wertes ausgegeben.

Tabelle 13: Übersicht über die verwendeten R2-Datensätze

R2-Datensätze mit Bezeichnung, Kurzbeschreibung, sogenannten Tracks (also Möglichkeiten die Gesamtheit der Samples anhand von Kriterien in Gruppen aufzuteilen), Erscheinungsdatum, Anzahl der Proben und Identifikationscodes. Bei allen Daten handelt es sich um Genexpressionsdaten von primären Tumorsamples, wobei zu beachten ist, dass unterschiedliche Methoden zur Erfassung der Genexpression und der bioinformatischen Aufarbeitung angewandt wurden.

<b>Nummer</b>	<b>1</b>	<b>2</b>
<b>Bezeichnung</b>	Tumor Neuroblastoma public - Versteeg - 88 - MAS5.0 - u133p2	Tumor Neuroblastoma non MYCN amplified - Seeger - 102 - MAS5.0 - 133a
<b>Kurzbeschreibung</b>	mRNA Datenbank von 88 humanen Tumorsamples	Genexpressionsprofile von Primärtumoren von Patienten mit metastatischen Neuroblastomen ohne <i>MYCN</i> -Amplifikation
<b>Tracks</b>	Alter, Todesursache, Geschlecht, Histologie, INSS, Ereignisse, Überleben, <i>MYCN</i>	Keine
<b>verfügbar seit</b>	Okt 10	Jul 08
<b>Anzahl der Proben</b>	88	102
<b>R2 Identifikationscode</b>	ps_avgpres_nbadam88_u133p2	ps_avgpress_seeger102_u133a
<b>Nummer</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
<b>Bezeichnung</b>	Tumor Neuroblastoma - Kocak - 649 - custom - ag44kcwolf	Tumor Neuroblastoma - SEQC - 498 - custom - ag44kcwolf
<b>Kurzbeschreibung</b>	"one color" - Genexpressionsanalyse in 649 Neuroblastomtumoren mit 44K Oligonukleotid Microarrays	RNA-seq von 498 primären Neuroblastomen
<b>Tracks</b>	Alter, <i>MYCN</i> -Amplifikation, Geschlecht, INSS	Diagnosealter, Tod, INSS, Geschlecht, hohes Risiko
<b>verfügbar seit</b>	Mai 13	Mrz 14
<b>Anzahl der Proben</b>	649	498
<b>R2 Identifikationscode</b>	ps_avgpres_gse45547geo649_ag44kcwolf	ps_avgpres_gse49710geo498_ag44kcwolf

### **3.6 Statistik**

Wenn nicht anders angegeben, sind alle Werte als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler (SEM) dargestellt. Die RT-qPCR-Daten wurden teilweise mit dem Student's t-Test (gepaart bei eindeutiger Zuteilung zugehöriger Paare) statistisch ausgewertet (Sigma Plot 9.0, SYSTAT Data). Vergleichende Betrachtungen zwischen mehr als zwei normalverteilten Gruppen wurden mittels zweiseitiger ANOVA mit Tukey's post-hoc-Test (SPSS Statistics 22, IBM) statistisch analysiert. P-Werte  $<0,05$  wurden als signifikant betrachtet und somit das  $\alpha$ -Level auf 0,05 festgelegt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Hypoxische WT1 Expression in Neuroblastomzelllinien

#### 4.1.1 WT1 Genexpression in verschiedenen Neuroblastomzelllinien

Es wurden verschiedene humane Neuroblastomzelllinien auf ihre WT1-Proteinexpression, sowohl unter normoxischen als auch hypoxischen Bedingungen, untersucht. Dazu wurden die in Abbildung 6 bezeichneten Zelllinien für 24 h entweder bei 21 % O<sub>2</sub> (Normoxie) oder 1 % O<sub>2</sub> (Hypoxie) kultiviert und anschließend die Gesamtzelllysate mittels Western Blot analysiert. Die WT1-Expression unter normoxischen Bedingungen variiert zwischen den verschiedenen Zelllinien stark. Weiterhin ließ sich keine Korrelation zwischen *MYCN*-Amplifikation und WT1-Expression feststellen. Das höchste Niveau an WT1 Protein bei 21 % O<sub>2</sub> fand sich in den SK-N-BE(2)- und SK-N-AS-Zellen, während sich die Expression in den SH-SY-5Y- und in den Kelly-Zellen unterhalb der Nachweisgrenze befand. Nach 24 h Hypoxie (1% O<sub>2</sub>) war in diesen beiden Zelllinien ein deutliches WT1-Proteinsignal nachzuweisen. In allen anderen untersuchten Zelllinien hingegen hatte der verringerte Sauerstoffgehalt keinen eindeutig nachweisbaren Einfluss auf die Menge an exprimiertem WT1-Protein. Da die Effekte einer Hypoxie auf die WT1- Expression in Kelly-Neuroblastomzellen am stärksten ausgeprägt waren, wurde diese Zelllinie für alle weiteren Untersuchungen verwendet.

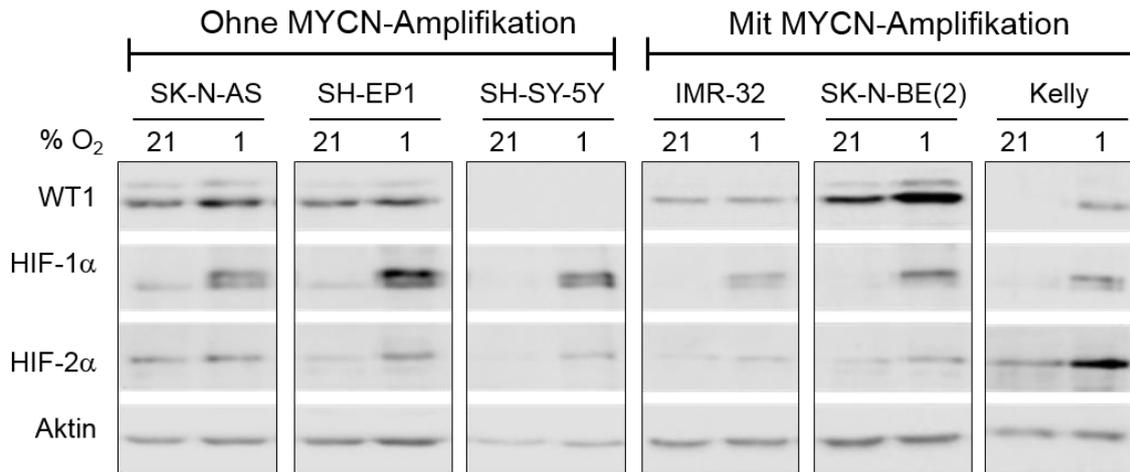


Abbildung 6: Western Blot der Gesamtzelllysate verschiedener Neuroblastomzelllinien mit oder ohne MYCN-Amplifikation

Es wurden verschiedene humane Neuroblastomzelllinien untersucht (Einzelheiten zu den Zelllinien in Tabelle 8). Es wurden Primärantikörper gegen Aktin, HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  und WT1 verwendet (siehe Tabelle 12), nach (Krueger, Catanese, Sciesielski, Kirschner & Scholz, 2019).

#### 4.1.2 Hypoxieinduzierbarkeit der WT1 Expression in Kelly-Zellen

Die WT1-Proteinexpression in Kelly-Zellen, die sich bei 21 % O<sub>2</sub> unterhalb der Nachweisgrenze befand, ließ sich durch 24-stündige Inkubation bei 1 % O<sub>2</sub> induzieren. Auch in der RT-qPCR zeigte sich ein signifikanter Anstieg des *WT1* mRNA Niveaus nach 24-stündiger Hypoxieexposition der Kelly-Zellen, wohingegen bei Normoxie (21 % O<sub>2</sub>) *WT1*-Transkripte in diesen Zellen kaum zu detektieren waren (Abb. 8). Ein signifikanter Anstieg des WT1 Expressionsniveaus konnte auch durch Behandlung mit 1 mM Dimethoxyallylglycin (DMOG) über 24 h bei 21 % O<sub>2</sub> herbeigeführt werden (Abb. 8). Bei DMOG handelt es sich um einen nicht-selektiven Inhibitor von Prolylhydroxylasen, die für die Hydroxylierung von HIF-1 $\alpha$  und HIF-2 $\alpha$  und deren Abbau unter normoxischen Bedingungen essentiell sind (siehe Einleitung). Weiterhin konnte in den Kelly-Zellen sowohl unter Hypoxie als auch durch Behandlung mit DMOG unter Normoxie ein deutlicher Anstieg der Proteinniveaus von HIF-1 $\alpha$  und HIF-2 $\alpha$  induziert werden (Abb. 7).

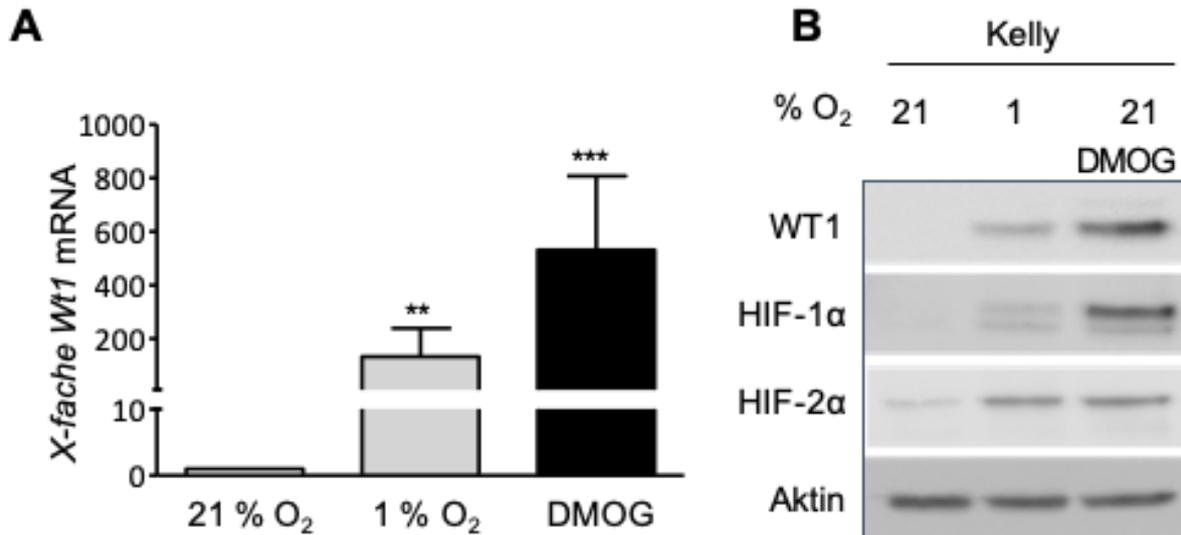


Abbildung 7: Sauerstoffabhängige Expression von WT1 in Kelly-Zellen

Kelly-Zellen wurden für 24 h entweder bei 21 % O<sub>2</sub> bzw. 1 % O<sub>2</sub> inkubiert oder bei 21% mit dem HIF-Stabilisator DMOG (1mM). **(A)** WT1-mRNA wurde mittels RT-qPCR gemessen. Die ermittelten  $\Delta\text{Ct}$ -Werte von Hypoxie- bzw. DMOG behandelten Zellen wurden mit denen von normoxischen, unbehandelten Kelly-Zellen verglichen. Die Werte sind angegeben in Mittelwerten + Standardfehler, wobei der relative Anstieg der mRNA im Vergleich zu unbehandelten Kelly-Zellen mit Hilfe der Formel  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  (Livak & Schmittgen, 2001) berechnet wurde. \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001; n = 5; ANOVA mit Tukey's post-hoc Test. **(B)** Die Gesamtzellproteine wurden mittels Western Blot analysiert, nach (Krueger, Catanese, Sciesielski, Kirschner & Scholz, 2019).

## 4.2 Regulation der WT1 Expression durch Hypoxie-induzierbare Faktoren

### 4.2.1 HIF-2α Silencing durch siRNA verringert die Hypoxieinduzierbarkeit von WT1

Die Hypoxie-induzierbaren Faktoren (HIFs) spielen eine zentrale Rolle in der hypoxischen Genregulation (C. W. Pugh & Ratcliffe, 2017). Um den Mechanismus der hypoxischen WT1-Expression aufzuklären, wurden HIF-1α und HIF-2α mittels RNA-Interferenz gehemmt. Hierzu wurden Kelly-Zellen unter normoxischen Bedingungen (21 % O<sub>2</sub>) zunächst mit einem Gemisch aus vier verschiedenen siRNAs gegen entweder HIF-1α oder HIF-2α transfiziert und für 24 h inkubiert. Anschließend wurde ein Teil der behandelten Zellen für weitere 24 h bei 1 % O<sub>2</sub> inkubiert. Wie in Abbildung 8 zu sehen, spiegelt sich der Knockdown, wie erwartet, in einem deutlich reduzierten Level an HIF-1α und HIF-2α Protein im Western Blot wider. Auch der mRNA Gehalt verringert sich im entsprechenden siRNA-Ansatz in der RT-qPCR signifikant. Um die Effektivität des Knockdowns auch funktionell zu überprüfen, wurden die

Transkriptionsniveaus zweier bekannter Zielgene - Carboanhydrase 9 für HIF-1 $\alpha$  und Erythropoietin für HIF-2 $\alpha$  - bestimmt. Auch hier zeigte sich eine deutliche Reduktion der mRNA (Abb. 8). Außerdem ließ sich eine reziproke Beeinflussung der beiden Proteine beim jeweiligen Knockdown feststellen, wobei ein Silencing von HIF-1 $\alpha$  eine Steigerung des HIF-2 $\alpha$  Proteins zur Folge hatte und umgekehrt.

Das Expressionsniveau der *WT1*-mRNA ließ sich nur durch Knockdown von HIF-2 $\alpha$ , nicht aber durch Knockdown von HIF-1 $\alpha$ , reduzieren (Abb. 9). Auch das WT1-Protein war bei Silencing von HIF-2 $\alpha$  nicht mehr nachzuweisen, wohingegen die Herabregulation von HIF-1 $\alpha$  ein erhöhtes WT1-Proteinsignal zur Folge hatte.

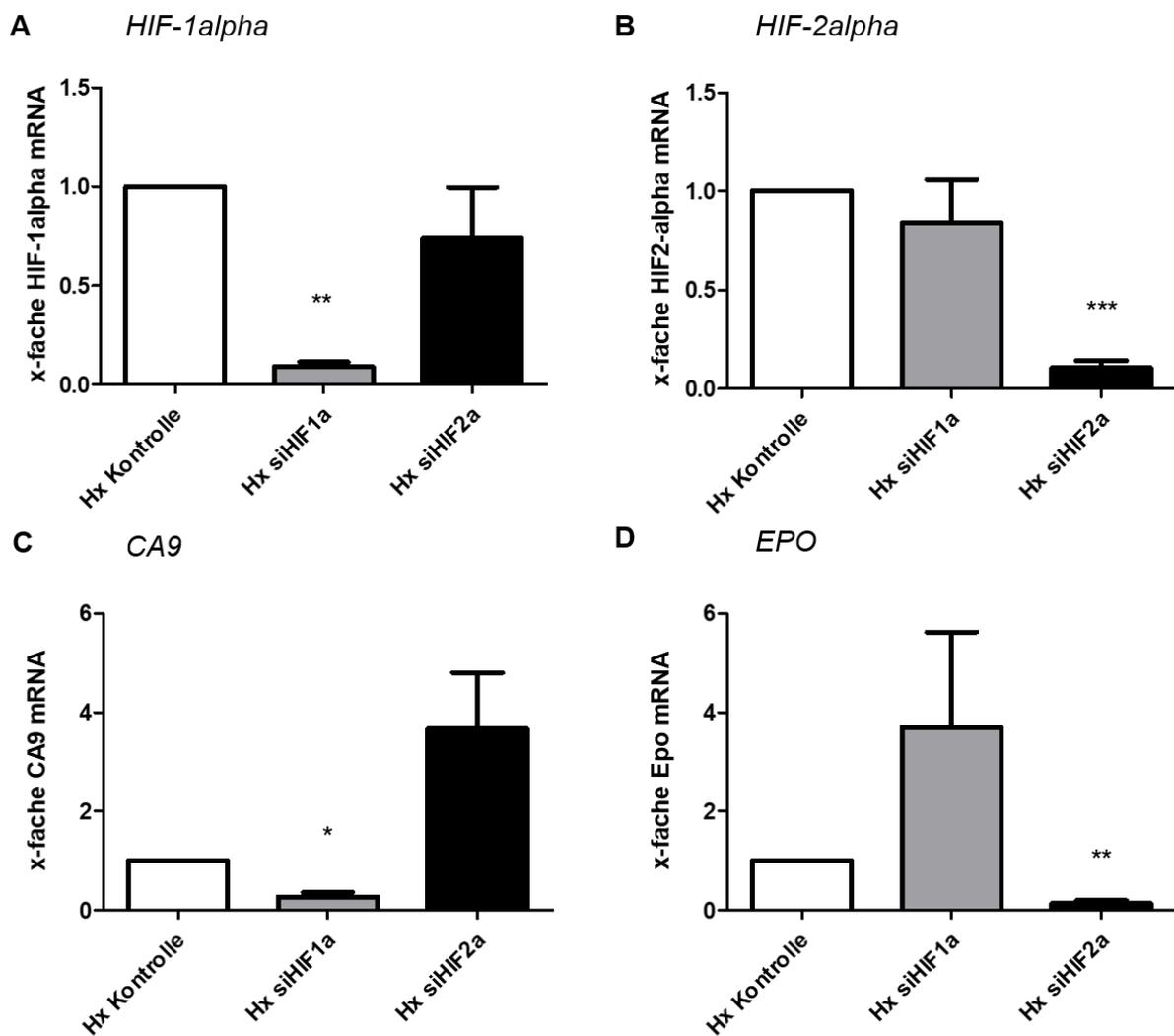


Abbildung 8: Silencing von HIF-1 $\alpha$  und HIF-2 $\alpha$  reduziert die mRNA Expression von *CA9* bzw. *EPO* in hypoxischen Kelly-Zellen

Kelly-Zellen wurden mit einem Gemisch aus vier verschiedenen siRNAs gegen HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  und ungerichteter siRNA transfiziert und für 24 h bei 21 % O<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für weitere 24 h bei 1 % O<sub>2</sub> exponiert. Die Messung der mRNA-Niveaus erfolgte mit Light Cycler RT-qPCR.

Aufgeführt sind die Transkriptionsniveaus von *HIF-1α* (A), *HIF-2α* (B) und den entsprechenden Zielgenen *CA9* (C) und *Epo* (D). Die Werte sind angegeben in Mittelwerten + Standardfehler, wobei der relative Anstieg der mRNA im Vergleich zu mit ungerichteter siRNA behandelten Zellen mit Hilfe der Formel  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak & Schmittgen, 2001) berechnet wurde. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ;  $n = 6$ ; ANOVA mit Tukey 's post-hoc Test.

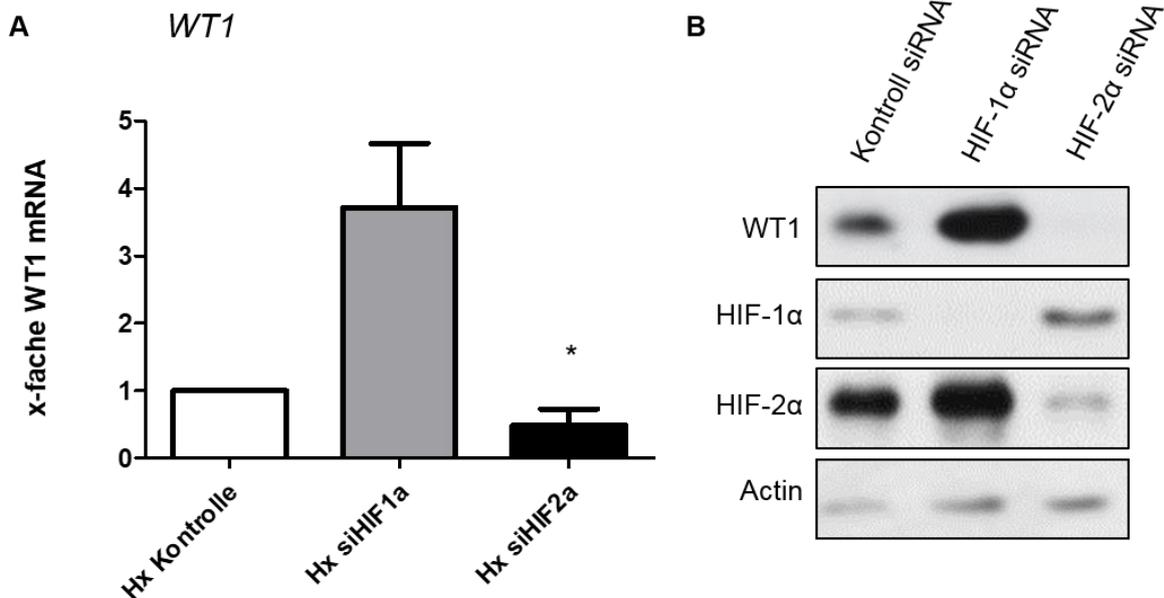


Abbildung 9: Knockdown von HIF-2α reduziert die WT1 Expression in hypoxischen Kelly-Zellen

Kelly-Zellen wurden mit einem Gemisch aus vier verschiedenen siRNAs gegen HIF-1α, HIF-2α und ungerichteter siRNA transfiziert und für 24 h bei 21 % O<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für weitere 24 h bei 1 % O<sub>2</sub> exponiert. Die Messung der mRNA-Niveaus erfolgte mit Light Cycler RT-qPCR. (A) Es zeigt sich eine signifikante Verringerung des *WT1*-Transkriptionsniveaus bei Behandlung mit gegen HIF-2α gerichteter siRNA im Vergleich zur Kontrolle mit ungerichteter siRNA. Die Werte sind angegeben in Mittelwerten + Standardfehler, wobei der relative Anstieg der mRNA im Vergleich zu mit ungerichteter siRNA behandelten Zellen mit Hilfe der Formel  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak & Schmittgen, 2001) berechnet wurde. Zu beachten ist die Zunahme der *WT1* mRNA unter Behandlung mit siRNA gegen HIF-1α. \*  $p < 0,05$ ;  $n = 6$ ; ANOVA mit Tukey's post-hoc Test. (B) Repräsentativer Western Blot vom selben siRNA-Experiment. Der Knockdown von HIF-2α bewirkt im Gegensatz zum Silencing von HIF-1α eine Abnahme von WT1 Protein in hypoxischen Kelly-Zellen (1 % O<sub>2</sub>) unter die Nachweisgrenze. Zur Bestätigung des erfolgreichen Knockdowns mittels RNA-Interferenz wurden die Proteinniveaus von HIF-1α und HIF-2α bestimmt, nach (Krueger, Catanese, Sciesielski, Kirschner & Scholz, 2019).

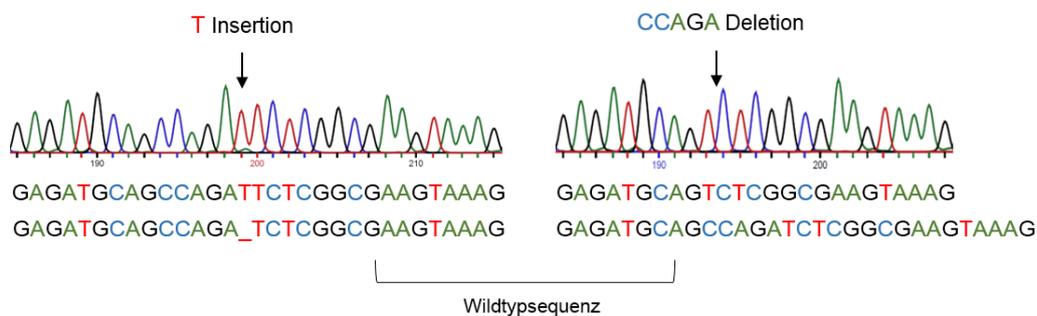
#### 4.2.2 CRISPR/Cas9 Knockout von HIF-2α eliminiert die Hypoxieinduzierbarkeit von WT1

Da mittels siRNA-Transfektion die Expression von HIF-1α und insbesondere HIF-2α nicht vollständig ausgeschaltet werden konnte (Abb. 8), wurde ein kompletter Knockout der für die beiden HIF-Isoformen kodierenden Gene durchgeführt. Hierfür

wurde die CRISPR/Cas9 Technologie verwendet. Dabei werden durch gezielte Doppelstrangbrüche und nachfolgende Reparaturprozesse Mutationen im Genom induziert. Mit Hilfe automatisierter Zellsortierung wurden Einzelzellklone isoliert und anschließend kultiviert. Aus den erhaltenen Klonen wurde genomische DNA isoliert, amplifiziert und anschließend sequenziert. Die Nonsense-Mutationen, die zu einer Auslöschung der Proteinexpression von HIF-1 $\alpha$  und HIF-2 $\alpha$  führten, befanden sich entweder 82 bp (HIF-1 $\alpha$ ) oder 172 bp (HIF-2 $\alpha$ ) nach dem Transkriptionsstart.

**A**

### HIF-1 $\alpha$ Knockout



**B**

### HIF-2 $\alpha$ Knockout

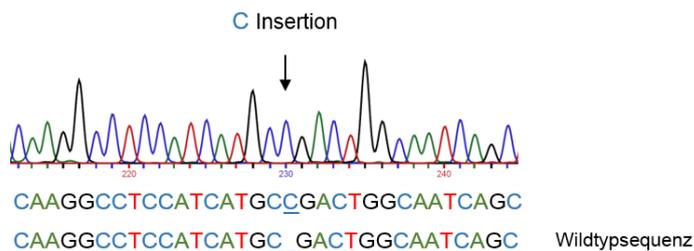


Abbildung 10: Ergebnisse der Sequenzierung des CRISPR/Cas9 vermittelten Knockouts von HIF-1 $\alpha$  (A) bzw. HIF-2 $\alpha$  (B)

Angegeben ist die Teilsequenz des Positivstrangs, in der die sgRNA binden und den Doppelstrangbruch über die Cas9 vermitteln soll. Die aus Datenbanken ermittelte Wildtypsequenz stimmt mit dem Sequenzierergebnis des Leervektors überein (Ergebnis nicht gezeigt). **(A)** HIF-1 $\alpha$  Knockout durch fehlerhafte Doppelstrangbruchreparatur: Die induzierten Doppelstrangbrüche führten auf beiden Allelen zu unterschiedlichen Reparaturergebnissen. Die T-Insertion und CCAGA Insertion führten jedoch in beiden Fällen zu einer Verschiebung des Leserasters bei Transkription und somit zu einem funktionellen Knockout. **(B)** HIF-2 $\alpha$  Knockout: C-Insertion und folglich Verschiebung des DNA-Leserasters bei Transkription.

Im HIF-2 $\alpha$  Knockout war auch das entsprechende Transkript nicht mehr durch RT-qPCR nachweisbar. Hingegen konnte HIF-1 $\alpha$ -mRNA in Kelly-Zellen mit mutiertem *HIF-1 $\alpha$* -Gen detektiert werden. Jedoch wurden die mutierten Transkripte offensichtlich nicht in HIF-1 $\alpha$  Protein translatiert (Abb. 11, F). Um den Knockout der beiden HIFs auch auf funktioneller Ebene zu überprüfen, wurde mittels RT-qPCR die Zielgenexpression in Kelly-Zellen (1 % O<sub>2</sub>) ermittelt. Der Knockout von HIF-1 $\alpha$  führte zu einer signifikanten Reduktion der CA9-mRNA (Abb. 11C), während Inaktivierung von HIF-2 $\alpha$  eine Abnahme der Erythropoietin (*Epo*)-mRNA bewirkte (Abb. 11D). Der CRISPR/Cas9-Knockout von HIF-2 $\alpha$ , nicht aber der von HIF-1 $\alpha$ , resultierte in einer signifikanten Abnahme der *WT1*-mRNA nach 24 h Hypoxie (1 % O<sub>2</sub>) (Abb. 11A). Nach Knockout von HIF-2 $\alpha$  war das WT1-Protein in hypoxischen Kelly-Zellen mittels Western Blot nicht nachweisbar (Abb. 11B). Bei Knockout von HIF-1 $\alpha$  kam es zu einem signifikanten Anstieg des WT1 Proteins, der sich am ehesten durch die Zunahme von HIF-2 $\alpha$  erklären lässt.

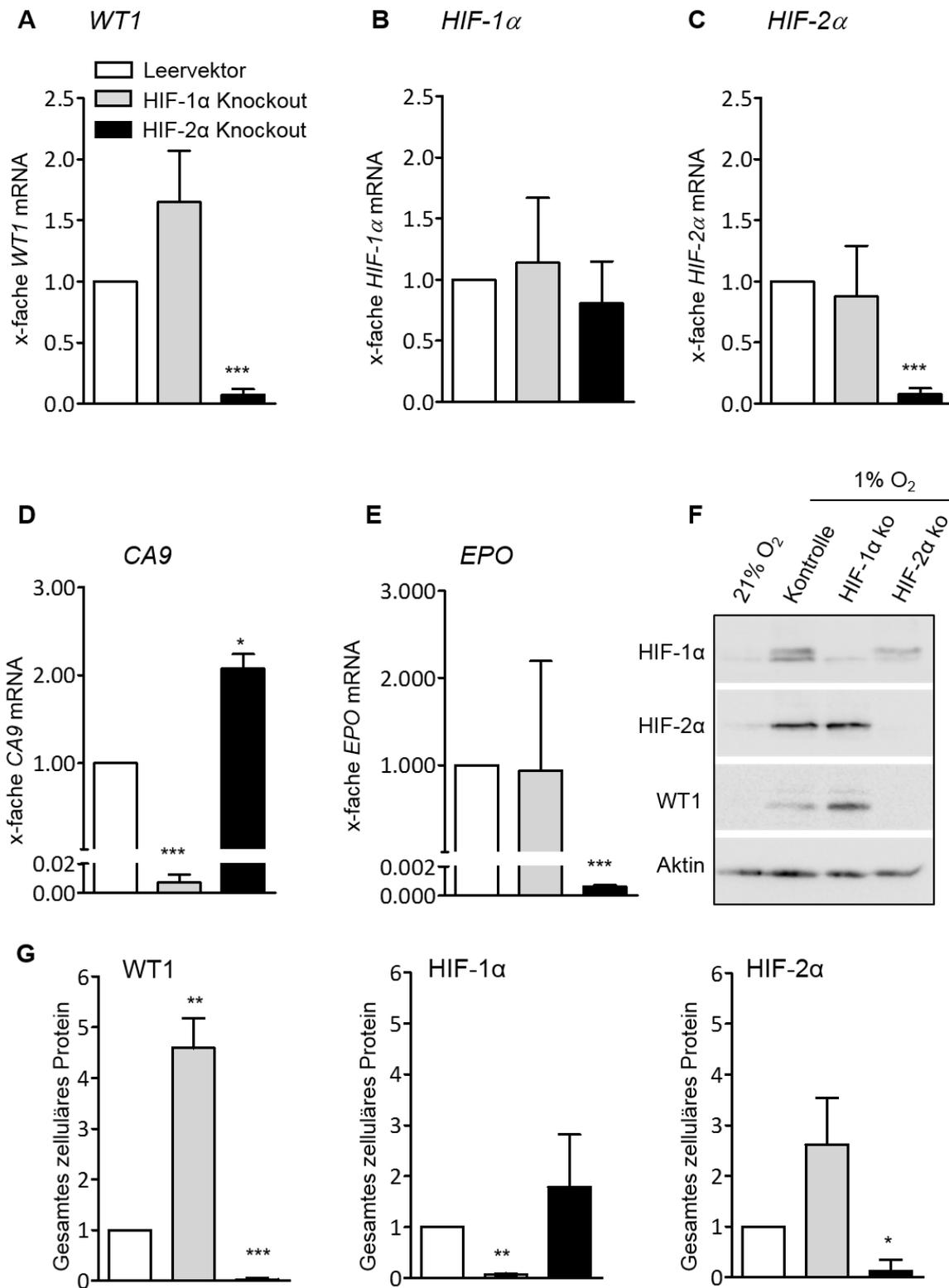


Abbildung 11: CRISPR/Cas9 Knockout von HIF-1α und HIF-2α in Kelly-Neuroblastomzellen

Als Kontrolle wurden mit dem leeren CRISPR/Cas9-Plasmid (siehe oben) transfizierte Zellen verwendet. Die mRNA Niveaus der Knockout Klone nach 24 h Inkubation bei 21 % O<sub>2</sub> von *WT1* (A), *HIF-1α* (B) und *HIF-2α* (C), sowie der entsprechenden HIF-Zielgene *CA9* (D) für HIF-1α und *EPO* (E) für HIF-2α wurden mittels RT-qPCR ermittelt. Die Werte sind angegeben in Mittelwerten + Standardfehler, wobei der relative Anstieg der mRNA im Vergleich zum Leervektorklon mit Hilfe der Formel  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak & Schmittgen, 2001) berechnet wurde; \*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001; n = 5; ANOVA mit Tukey's post-hoc Test. (F) zeigt einen repräsentativen Western Blot der beiden HIFs und des WT1 in den

CRISPR/Cas9 Klonen vergleichend bei Normoxie und Hypoxie. Zur Normalisierung wurde das Proteinniveau von Aktin herangezogen. (G) zeigt die quantitative Analyse des Gesamtzellproteins nach 24 h Inkubation bei 1 % O<sub>2</sub> von WT1, HIF-1 $\alpha$  und HIF-2 $\alpha$  bei Knockout von HIF-1 $\alpha$  bzw. HIF-2 $\alpha$ . Die Werte sind angegeben in Mittelwerten + Standardfehler, wobei die Quantifizierung des Proteins im Verhältnis zum Leervektorklon erfolgte. \*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001; n = 5; ANOVA mit Tukey's post-hoc Test, nach (Krueger, Catanese, Sciesielski, Kirschner & Scholz, 2019).

## **4.3 Regulationsmechanismus der hypoxischen WT1 Expression**

### **4.3.1 Identifikation von potentiellen HIF-Bindungsstellen mit Hilfe des UCSC Genome Browsers in Intron 3 des WT1-Genlocus**

Ein geeignetes Instrument, um potentielle HIF-Bindungsstellen in einem Gen zu lokalisieren, ist der UCSC Genome Browser (<https://genome.ucsc.edu>) des ENCODE (The Encyclopedia of DNA-Elements) Projekts (Rosenbloom et al., 2010). Hier können aus integrierten Datensätzen von 125 Zelllinien und über 100 groß angelegten ChIP-seq Experimenten potentielle cis-regulatorische Elemente anhand von spezifischen Clustern ausfindig gemacht werden. Besonders geeignet sind sogenannte DNaseI-Hypersensitivitätscluster, die offenes, d.h. für die Bindung von Transkriptionsfaktoren vorbereitetes Chromatin anzeigen. Diese finden sich an regulatorischen Elementen im Genom wie Promotoren, Enhancern oder Silencern (Boyle et al., 2008). In Abbildung 12 ist zu sehen, dass sich neben dem Promotorbereich und der 3'-UTR auch in Intron 1 und 3 des *WT1*-Gens sowohl Bereiche mit DNaseI-Hypersensitivität, als auch ChIP-seq-Cluster für verschiedene Transkriptionsfaktoren befinden. Bei Sequenzanalyse auf das typische HIF-Bindungsmotiv 5'-RCGTG-3' (Schodel et al., 2011) findet sich innerhalb des DNaseI-Clusters eine potentielle HIF-Bindungsstelle an Position 32442918 von Chromosom 11 (Abb. 13). In Intron 3 des *WT1*-Gens beschrieben Zhang et al. (X. Zhang, Xing, Fraizer & Saunders, 1997) bereits ein Enhancer-Element, das durch GATA-1 und cMyb transaktiviert wird.

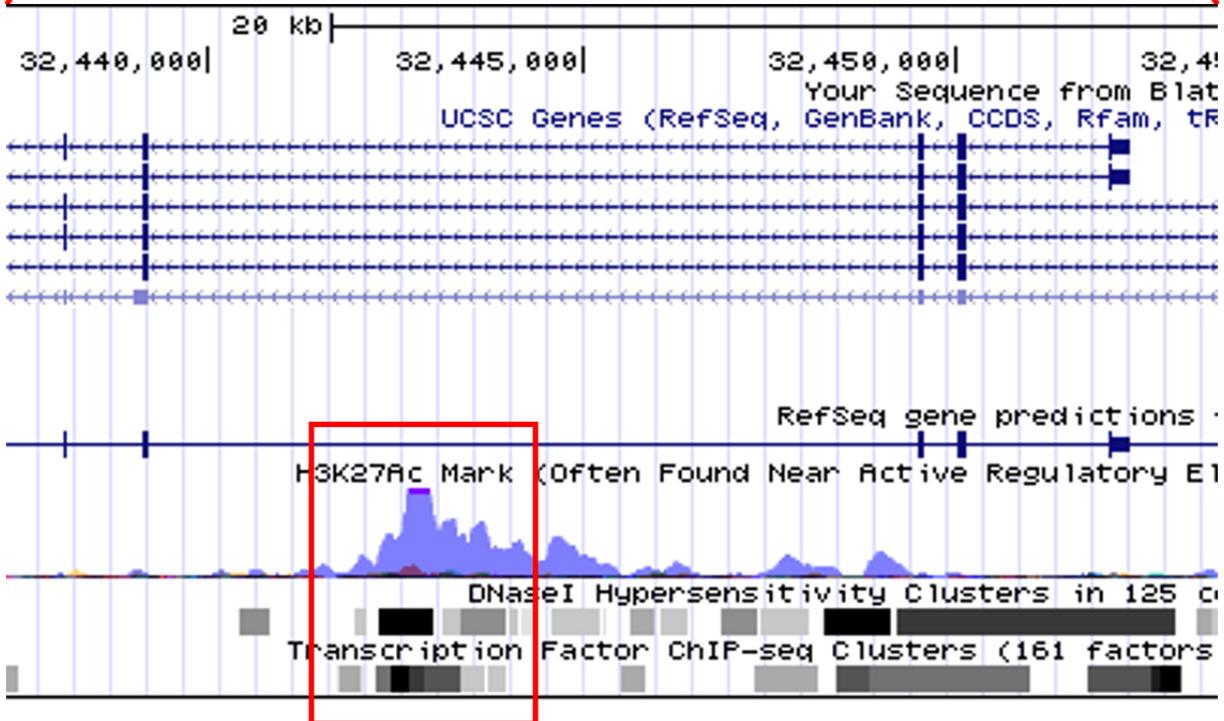
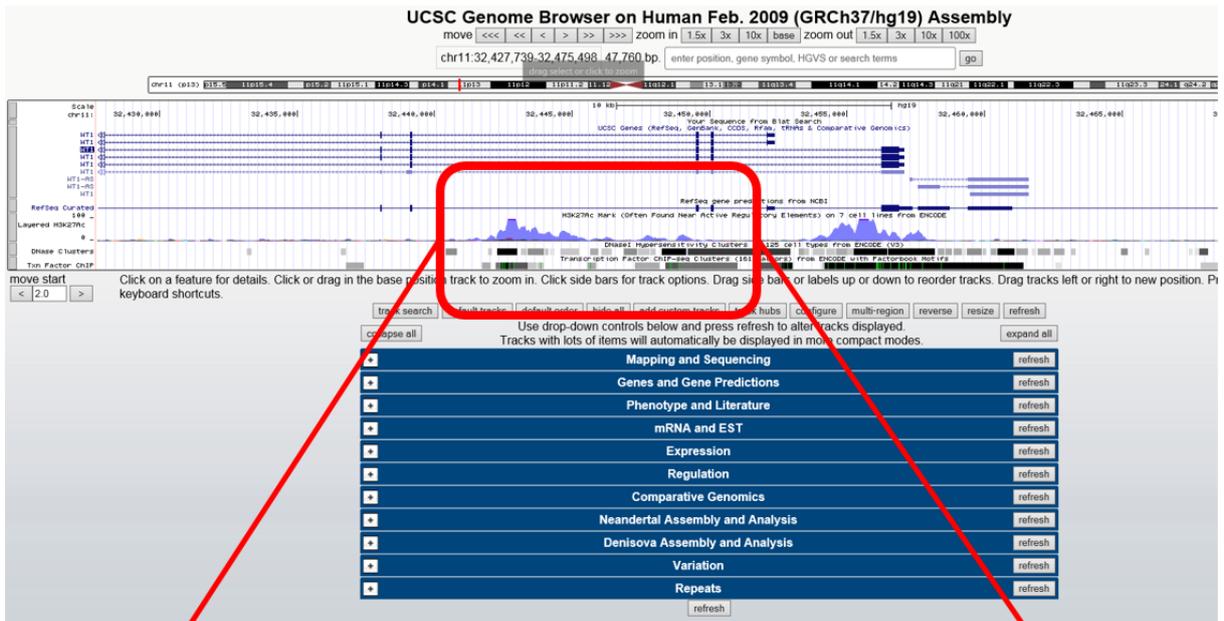
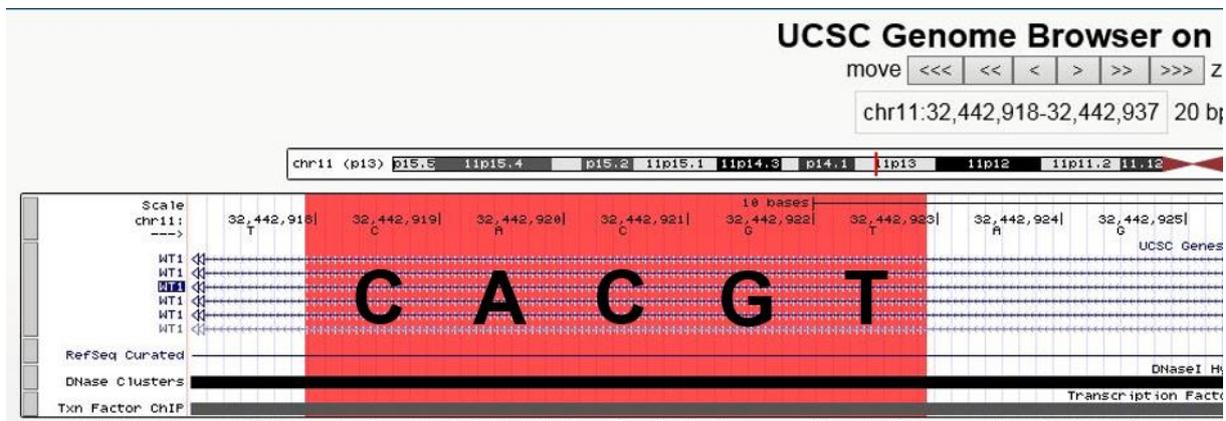


Abbildung 12: Screenshot aus dem UCSC Genome Browser für den *WT1* Genlocus

Oben sind in schwarzen Skalen für die Länge des Genabschnitts angegeben und die ungefähre Position auf dem Chromosom 11 ist an den mit Kommas unterbrochenen Zahlen abzulesen. Eine Auswahl an Transkriptvarianten (Leserichtung von rechts nach links) ist in blau angezeigt. Regionen mit DNase-Hypersensitivität sind mit blauen Spitzen dargestellt. Darunter sind die jeweiligen Cluster für die DNase-

Hypersensitivität und die Bindungsstellen für verschiedene Transkriptionsfaktoren aus ChIP-seq Experimenten mit schwarzen und grauen Balken dargestellt.



**G T G C R**  
 ←

Abbildung 13: Zoom des Screenshots aus dem UCSC Genome Browser

Innerhalb des 3. Introns des *WT1*-Gens zeigt sich im Bereich der DNaseI-Hypersensitivitätsregion ein typisches HIF-Bindungsmotiv mit der 5'-RCGTG-3' Zielsequenz an Position 32.442.918 von Chromosom 11, hier als reverses Komplement CACGT zu lesen.

#### 4.3.2 HIF-1 $\alpha$ und HIF-2 $\alpha$ interagieren mit potenzieller HBS in Intron 3 des *WT1* Gens

Um die ermittelten möglichen HREs innerhalb des *WT1* Gens zu überprüfen, wurden zunächst Immunopräzipitationen mit Chromatin von hypoxischen Kelly-Zellen durchgeführt. Dabei zeigte sich eine signifikante Anreicherung von Chromatin aus dem Intron 3 des *WT1* Gens (Abb. 14) nach Inkubation mit Antikörper gegen HIF-1 $\alpha$  und HIF-2 $\alpha$ . Auch eine DNA-Sequenz aus der *WT1*-Promotorregion wurde durch Inkubation mit diesen Antikörpern angereichert, jedoch nicht die Sequenz einer weiteren, theoretisch ermittelten HRE aus dem Intron 1 (Abb. 14). Des Weiteren ließ sich insbesondere für die Inkubation mit dem Antikörper gegen HIF-2 $\alpha$  eine hochsignifikante Anreicherung ( $p < 0,001$ ) der putativen HRE aus dem Intron 3 nachweisen. Als Positivkontrolle für HIF-Bindung wurde eine Sequenz aus dem intronischen Enhancer des *EGLN3*-Gens, einer bekannten HRE (Aprelikova et al., 2004), amplifiziert. Hier zeigte sich erwartungsgemäß eine Anreicherung von Chromatin bei Inkubation mit Antikörper gegen HIF-1 $\alpha$  und HIF-2 $\alpha$  (Abb. 14, zweite Reihe). Um offenes, für Transkriptionsfaktoren zugängliches Chromatin zu indizieren

wurde die Immunopräzipitation mit einem Antikörper gegen das Histon H3K27ac durchgeführt. Hier zeigte sich für alle untersuchten DNA-Sequenzen eine signifikante Anreicherung. Als Negativkontrolle für die Protein-Chromatin-Bindung wurde ein Antikörper, der r-IgG bindet, zur Immunopräzipitation eingesetzt. Als Negativkontrolle für DNA-Sequenzen wurden Primerpaare benutzt, die sogenannte „Gene-desert“-Regionen flankieren. Dies sind Genorte, an denen es keine nachgewiesenen Transkriptionsfaktorbindungen gibt.

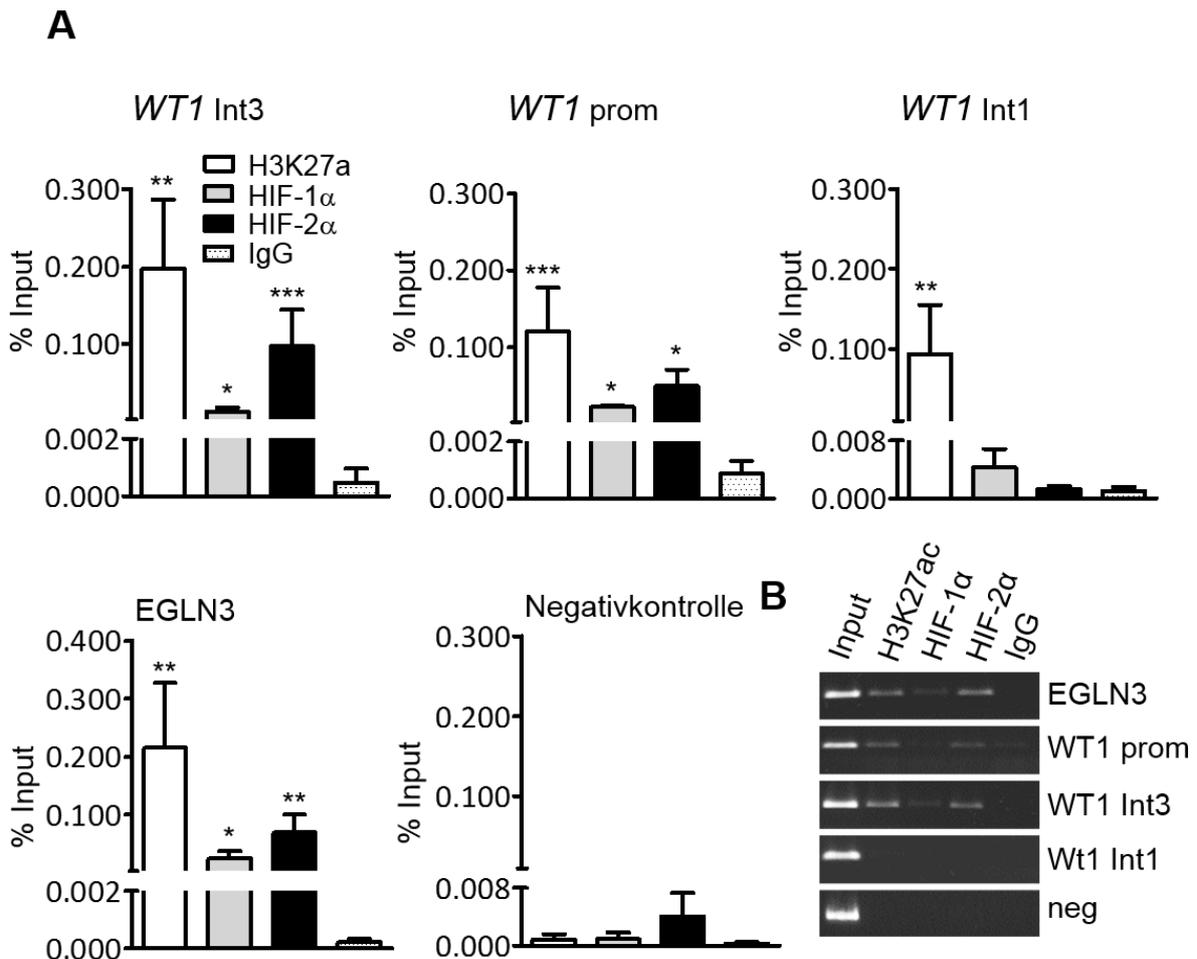


Abbildung 14: Chromatinimmunopräzipitation

(A) Chromatin von hypoxischen (1 % O<sub>2</sub>) Kelly-Zellen wurde zur Immunopräzipitation mit Antikörper gegen HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$ , Histon H3K27ac als Marker für offenes Chromatin und IgG als Negativkontrolle verwendet. Es zeigte sich eine signifikante Anreicherung von Chromatin aus der Promotorregion und des Intron 3 des *WT1* Gens bei Inkubation mit Antikörper gegen beide HIF-Isoformen. Der H3K27ac-Antikörper zeigte für die *WT1* Promotorregion, Intron 1, Intron 3 und die *EGLN3* Region Anreicherung. Als Negativkontrolle für die verwendeten Genregionen wurden Primer, die eine „Gene desert“-Region flankieren, benutzt, an der es keine nachgewiesenen Transkriptionsfaktorbindungen gibt. Die Analyse folgte mittels RT-qPCR nach oben beschriebener Methode. Alle Werte sind in Prozent vom eingesetzten Chromatin angegeben. Die Werte sind angegeben in Mittelwerten + Standardfehler im Vergleich zur Antikörpernegativkontrolle (IgG), wobei die  $\Delta$ CT-Werte im Vergleich zum normalisiertem Input-Ct-Wert

zur Berechnung hinzugezogen wurden,  $n=5$ ,  $*p < 0,05$ ;  $**p < 0,01$ ;  $***p < 0,001$ ;  $n = 5$ ; ANOVA mit Tukey's post-hoc Test, nach (Krueger, Catanese, Sciesielski, Kirschner & Scholz, 2019).

#### **4.3.3 Die HBS in Intron 3 bindet HIF-1 $\alpha$ und HIF-2 $\alpha$ und ist Bestandteil eines hypoxiesensitiven Enhancers**

Um experimentell zu überprüfen, ob HIF tatsächlich an das Konsensuselement im Intron 3 des WT1-Gens bindet, wurde ein 28 bp langes, doppelsträngiges Oligonukleotid mit dem 5'-RCGTG-3' HIF-Bindungsmotiv konstruiert (Tabelle 6). Der Vorwärtsstrang des Oligonukleotids wurde am 5' Ende mit Cyanin 5-Farbstoff markiert (Service von MWG Eurofins Genomics), sodass die DNA im Polyacrylamidgel visualisiert werden konnte. Die Kernextrakte von hypoxischen Kelly-Zellen (24h, 1 % O<sub>2</sub>) ergaben einen Bandenshift („shift“ in Abb. 15; Gelspuren 2 und 3), der mit Kernextrakten von normoxischen Kelly-Zellen (21 % O<sub>2</sub>) nicht auftrat. Dieser DNA-Proteinkomplex verschwand bei Inkubation mit Antikörper gegen HIF-1 $\alpha$  (Novus, NB 100-449) und ergab eine Supershift-Bande bei Inkubation mit Antikörper gegen HIF-2 $\alpha$  (Novus, NB 100-132) (Abb. 15; Gelsspuren 4 und 5). Die HIF-2 Bindung konnte in aufsteigenden Konzentrationen kompetitiv gehemmt werden durch Inkubation mit unmarkiertem Oligonukleotid, das die in (G. L. Wang & Semenza, 1995) beschriebene HBS des EPO-3' Enhancers enthielt. Diese Ergebnisse zeigen, dass sowohl HIF-1 $\alpha$  als auch HIF-2 $\alpha$  an die putative Bindungsstelle im Intron 3 des WT1-Gens binden können.

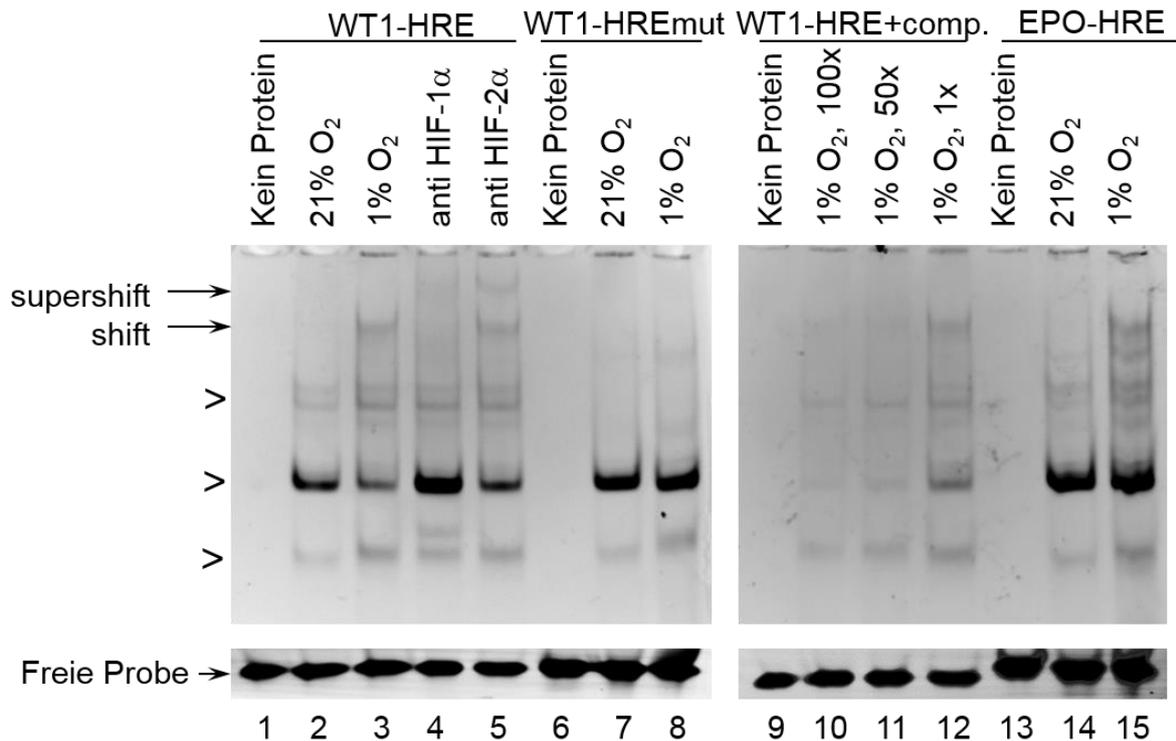


Abbildung 15: Elektromobilitätsshiftassay mit Kernextrakten von Kelly-Zellen

Die Abbildung zeigt die Bindung von HIF-1 $\alpha$  und HIF-2 $\alpha$  an einem 28 bp langen Oligonukleotid mit dem 5'-RCGTG-3' Motiv. Ein spezifisches Bandenshiftmuster konnte nur mit Kernextrakten hypoxischer Kelly-Zellen (Spur 3) und nicht normoxischer Zellen (Spur 2) erzielt werden. Vorinkubation der hypoxischen Kernextrakte mit Antikörpern gegen HIF-1 $\alpha$  oder HIF-2 $\alpha$  führte zum Verlust der charakteristischen Shift Bande (Spur 4) bzw. zu einer Supershift Bande (Spur 5). Durch Mutation der Bindungssequenz im Oligonukleotid war kein Bandenshift unter Hypoxie mehr zu sehen (Spur 8). Die Proteinbindung des Oligonukleotids unter Hypoxie konnte durch Hinzugeben eines unmarkierten Inhibitoroligonukleotids (3'-EPO-Enhancer) in absteigenden Konzentrationen proportional zur eingesetzten Menge reduziert werden (Spuren 10-12). Positivkontrolle eines Bandshifts unter Hypoxie unter Verwendung eines markierten Oligonukleotids, das das HRE innerhalb des 3'-EPO-Enhancers enthält (Spur 15), nach (Krueger, Catanese, Sciesielski, Kirschner & Scholz, 2019).

Des Weiteren wurde in Luciferase-Reporterassays untersucht, ob der Genabschnitt mit der identifizierten HBS im Intron 3 des *WT1* Gens eigentlich hypoxieresistenten Reporterkonstrukten eine Sensitivität gegenüber Hypoxie vermittelt. Dazu wurde ein 256 bp langes Oligonukleotid (siehe oben), das die putative Bindungsstelle enthält, am 5'-Ende vor den SV40-Promotor des pGL3-Promotor Vektors (Promega) kloniert. Für die Experimente diente der pGL3-Promotor Leervektor als Negativkontrolle. Abbildung 16 zeigt, dass die Reporteraktivität des transfizierten Konstrukts in hypoxischen (1 % O<sub>2</sub>, 24 h) versus normoxischen (21 % O<sub>2</sub>, 24 h) Kelly-Zellen um das ca. 22-fache erhöht war. Das Hypoxiemimetikum DMOG (21 % O<sub>2</sub>, 24 h) bewirkte ebenfalls eine signifikante Zunahme der Reporteraktivität (Abb. 16B). Im Gegensatz hierzu wurde der transfizierte pGL3-Promotor-Leervektor

weder durch Hypoxie noch durch DMOG signifikant stimuliert. Um zu überprüfen, ob die HBS für die Übertragung einer Hypoxiesensitivität notwendig war, wurde diese mutiert. Tatsächlich verursachte die Mutation der identifizierten HBS in dem Reporterkonstrukt einen Verlust der Induzierbarkeit durch Hypoxie und DMOG. Weiterhin wurde getestet, ob das hypoxieresponsive Element nicht nur dem heterologen SV40-Promotor, sondern auch dem *WT1*-Promotor eine Hypoxieempfindlichkeit verleiht. Hierzu wurde ein ca. 2,5 kb langes Fragment aus dem *WT1*-Promotorbereich in den pGL3basic-Vektor ligiert. Nach Transfektion dieses Konstrukts in Kelly-Zellen konnte weder bei Hypoxieexposition (1 % O<sub>2</sub>, 24 h) noch bei Behandlung mit DMOG eine signifikante Zunahme der *WT1*-Promotoraktivität festgestellt werden (Abb. 16 A). Durch Ligation des oben genannten, 256 bp langen Oligonukleotids mit der intronischen HBS vor den *WT1*-Promotor waren die Reporteraktivitäten nach Behandlung mit Hypoxie und DMOG 11- bzw. 17-fach erhöht (Abb. 16). Die Effekte auf die Hypoxiesensibilität beider Reporterkonstrukte wurde durch Mutation der HBS verhindert, so dass es zu keiner signifikanten Zunahme der Reporteraktivität des *WT1*-Promotorkonstrukts unter Hypoxie und DMOG kam.

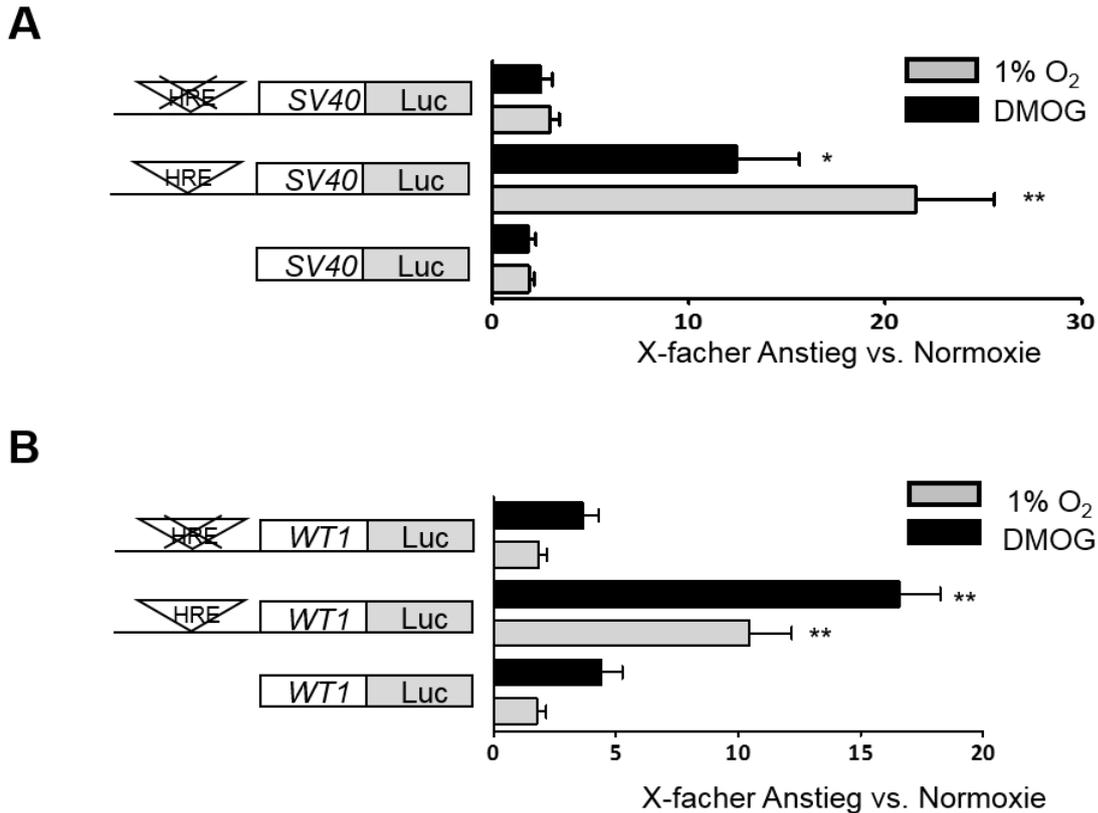


Abbildung 16: Luciferase-Reporterassays

Es wurden durch Ligation eines 256 bp langen Fragments mit dem putativen HRE aus dem Intron 3 des *WT1* Gens vor einen heterologen *SV40*-Promotor und den *WT1*-Promotor Promotor-Reporterkonstrukte hergestellt. Es erfolgte zusammen mit einem Renilla Luciferase Reporter die Kotransfektion der Konstrukte in Kelly-Zellen. Die Renillaaktivitäten dienen zur Normalisierung der gemessenen Luciferaseaktivitäten. Die relativen Luciferaseaktivitäten sind als Vielfache der Aktivität unter Normoxie dargestellt. Die Promotorkonstrukte allein zeigen keine erhöhten Luciferaseaktivitäten unter Hypoxie oder nach Behandlung der Zellen mit DMOG. Die Ligation des 256 bp langen Fragments vor die Promotoren erhöhte die Luciferaseaktivität des *SV40*-Promotorkonstrukts (A) und des *WT1*-Promotorkonstrukts (B) unter Hypoxie und nach Behandlung mit DMOG. Dieser Effekt kann nicht durch Ligation eines analogen DNA-Fragments erzielt werden, in dem die HBS innerhalb des HRE mutiert wurde. Die Werte sind angegeben in Mittelwerten + Standardfehler der relativen Luciferaseaktivitäten im Vergleich zur Normoxie, wobei die statistische Analyse mit den auf die Renillaaktivität normierten Luciferaseaktivitäten erfolgte. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ;  $n = 5$ ; gepaarter Student's t-Test, nach (Krueger, Catanese, Sciesielski, Kirschner & Scholz, 2019).

#### 4.4 Auswirkungen hoher WT1 und HIF-2 $\alpha$ Expression auf Neuroblastome

##### 4.4.1 Hohe WT1-Expression korreliert mit geringerem Gesamtüberleben und geringerem rezidivfreien Überleben von Neuroblastompatienten

Eine einfache und öffentlich zugängliche Möglichkeit Expressionsdaten von primären Tumorproben zu analysieren, ist die R2-Plattform (Genomics Analysis and Visualization Platform; <https://r2.amc.nl>), mit der u.a. Genexpressionsdaten mit

klinischen Verläufen in unterschiedlichen Sätzen von Neuroblastomtumormproben korreliert werden können. In Abbildung 17 sind die Kaplan-Meier-Kurven aus dem selben Tumordatensatz abgebildet (Molenaar et al., 2012). Zu sehen sind die Graphen für das Gesamtüberleben und das rezidivfreie Überleben von Patienten mit Tumoren mit hohem und niedrigem WT1-Expressionsniveau (Für Einzelheiten zur Gruppenbestimmung siehe Methodenteil). Beide Kurven zeigen, dass die Kohorte mit hoher WT1 Expression eine signifikant höhere Mortalität aufweist. Zu beachten ist der unterschiedliche WT1 Expressions-Cutoff (zur Erklärung siehe Methodenteil), der zum einen die Gruppengröße beeinflusst und zum anderen die erhaltenen P-Werte.

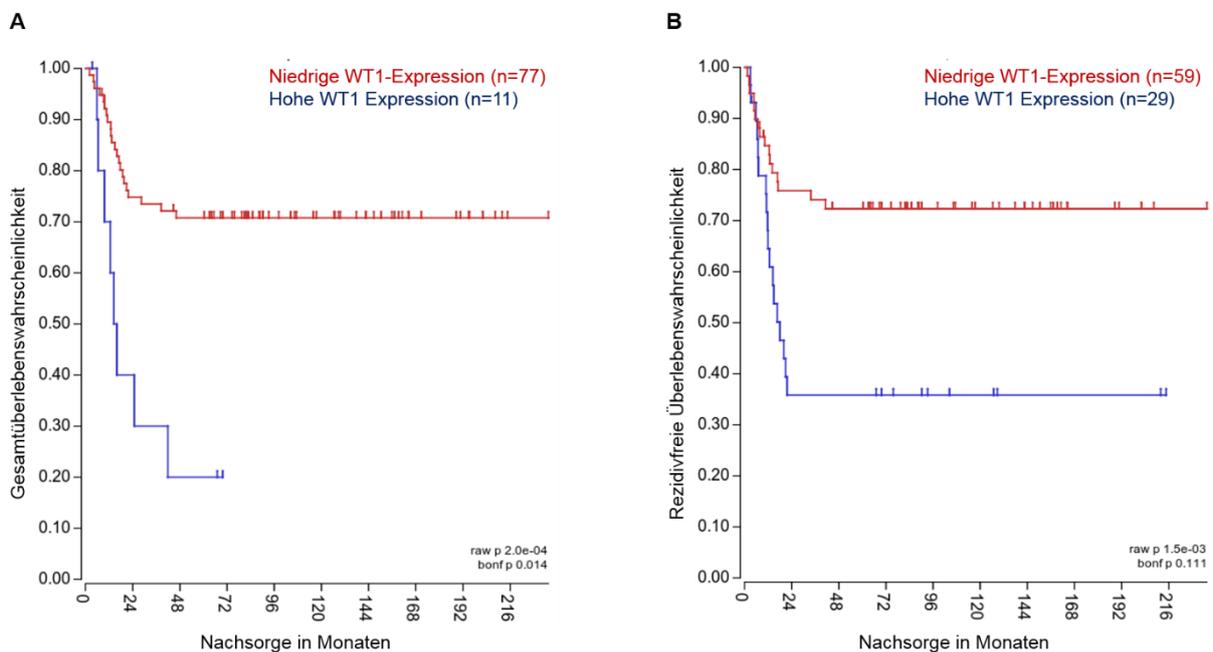


Abbildung 17: Überleben von Neuroblastompatienten nach WT1-Expression

Diese Abbildung zeigt einen Ausschnitt aus einer Datenanalyse mittels des frei verfügbaren R2-Datenanalysetools. Es handelt sich um den Datensatz Nummer 1 (Versteeg) nach Tabelle 13 (Molenaar et al., 2012). Angegeben sind die Kaplan-Meier-Kurven der beiden Subgruppen von Patientenproben, eingeteilt in hohe (blau) und niedrige (rot) WT1-Expression (Expressions Cutoff 19,1 (A) bzw. 5,1 (B); Gruppengröße  $\geq 8$ ). Die Größe der Subgruppe befindet sich anschließend in Klammern. Auf der y-Achse ist die prozentuale Größe des noch lebenden bzw. rezidivfrei lebenden Patientenanteils nach dem auf der x-Achse angegebene Nachsorgezeitraum in Monaten aufgetragen.

#### 4.4.2 Hohe WT1-Expression korreliert mit geringerem rezidivfreiem Überleben von Neuroblastompatienten ohne MYCN-Amplifikation

Abbildung 18 zeigt die Kaplan-Meier-Kurve für zwei Subgruppen der Patientenpopulation nach (Asgharzadeh et al., 2006) eingeteilt nach dem Expressionsgrad von WT1. Wie Tabelle 13 zu entnehmen ist, wurden für die Studie 102 primäre, unbehandelte, bereits metastasierte Neuroblastomtumormproben ohne

*MYCN*-Amplifikation eingeschlossen. Die anschließende Behandlung erfolgte nach Zuweisung in verschiedene Studienprofile multimodal (Asgharzadeh et al., 2006). Bei geeignetem Cutoff für das Expressionsniveau für *WT1* (12,6) zeigt sich ein hochsignifikanter Unterschied der rezidivfreien Überlebenswahrscheinlichkeit zwischen Patientenkollektiven, die an Tumoren mit hoher bzw. niedriger *WT1*-Expression leiden. In der Subgruppe an Tumoren mit hohem *WT1* verstarben 8 von 9 Patienten nach 24 Monaten trotz Therapie. Die 5-Jahres-Überlebensrate der Subgruppe mit niedrigem *WT1* lag hingegen bei über 50 %.

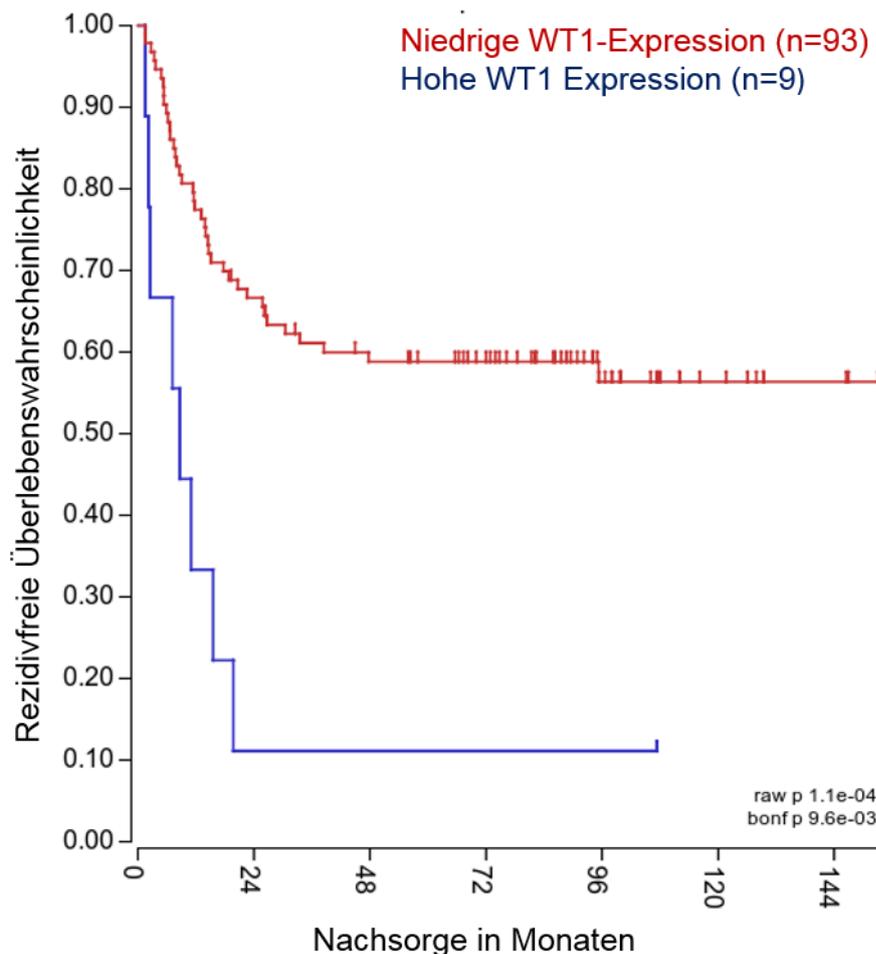


Abbildung 18: Überleben nach *WT1*-Expression ohne *MYCN*-Amplifikation (Seeger)

Diese Abbildung zeigt einen Ausschnitt aus einer Datenanalyse mittels des frei verfügbaren R2-Datenanalysetools. Die Tumorproben aus dem Datensatz Nummer 2 (Seeger) nach Tabelle 13 (Asgharzadeh et al., 2006) enthalten keine *MYCN*-Amplifikation. Angegeben sind die Kaplan-Meier-Kurven der beiden Subgruppen von Patientenproben, eingeteilt in hohe (blau) und niedrige (rot) *WT1*-Expression (Expressions Cutoff 12,6; Gruppengröße  $\geq 8$ ). Die Größe der Subgruppe befindet sich anschließend in Klammern. Auf der y-Achse ist der Anteil der rezidivfreien, noch lebenden Patienten nach dem auf der x-Achse angegebenen Nachsorgezeitraum in Monaten angegeben.

#### 4.4.3 Hohe *WT1*-Expression korreliert mit geringerem ereignisfreiem Überleben in Neuroblastompatienten in nicht fortgeschrittenen Diagnosestadien

In Abbildung 19 werden Datenanalysen aus zwei unterschiedlichen Datensätzen gezeigt. Analysiert man Datensatz 3 (Kocak nach Tabelle 13) und 4 (SEQC nach Tabelle 13) auf Patienten außerhalb des prognostisch ungünstigen Stadiums 4 (siehe Abbildung 19), ergibt sich für Patienten mit hoher *WT1*-Expression in beiden Studien eine signifikant erhöhte Mortalität (blaue Linie, Abbildung 21).

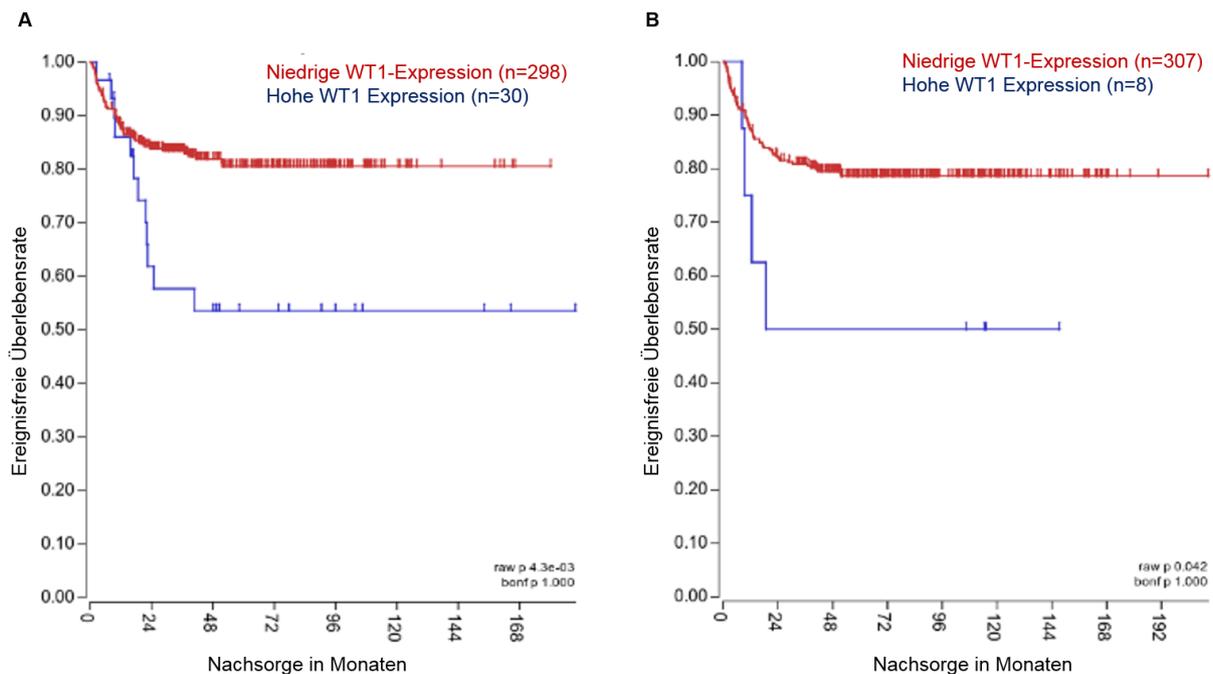


Abbildung 19: Überleben nach *WT1*-Expression ohne *MYCN*-Amplifikation (Kocak und SEQC)

Diese Abbildung zeigt einen Ausschnitt aus einer Datenanalyse mittels des frei verfügbaren R2-Datenanalysetools. Es handelt sich um zwei verschiedene Datensätze: (A) Nummer 3 (Kocak) (Kocak et al., 2013) und (B) Nummer 4 (SEQC) nach Tabelle 13. Des Weiteren wurden für die Analyse nur Proben von Patienten in den Stadien 1, 2, 3 und 4S nach INSS (Brodeur et al., 1993) eingeschlossen. Angegeben sind die Kaplan-Meier-Kurven der beiden Subgruppen von Patientenproben, eingeteilt in hohe (blau) und niedrige (rot) *WT1*-Expression (Expressions Cutoffs 76 (A) und 181,02 (B); Gruppengröße  $\geq 8$ ). Die Größe der Subgruppe befindet sich anschließend in Klammern. Auf der y-Achse ist der Anteil der ohne Ereignis überlebenden Patienten nach dem auf der x-Achse angegebenen Nachsorgezeitraum in Monaten angegeben.

#### 4.4.4 Hohe *HIF-2 $\alpha$* -Expression korreliert mit geringerem Gesamtüberleben bei Neuroblastompatienten

Analysiert man den der Abbildung 19 zugrundeliegenden Datensatz (siehe Tabelle 13) auf *HIF-2 $\alpha$*  (siehe Abbildung 20), stellt man auch für die Expression von *HIF-2 $\alpha$*  ähnliche Ergebnisse zu den Befunden von *WT1* fest. Sowohl in der Betrachtung aller Proben des Datensatzes als auch bei Ausschluss der Tumoren mit *MYCN*-

Amplifikation (dies gilt nicht für Tumoren mit *MYCN*-Amplifikation) zeigt sich bei hoher *HIF-2 $\alpha$* -Expression ein signifikant verringertes Gesamtüberleben der Subgruppe. Die Expressionsniveaus von *HIF-2 $\alpha$*  sind dabei aber auf einem wesentlich höheren absoluten Expressionsniveau als die von *WT1*. Trotz dieses Befundes konnte mit weiteren Analysetools der R2-Plattform keine signifikante Korrelation zwischen *WT1*- und *HIF-2 $\alpha$* -Expression in den Primärtumoren ermittelt werden.

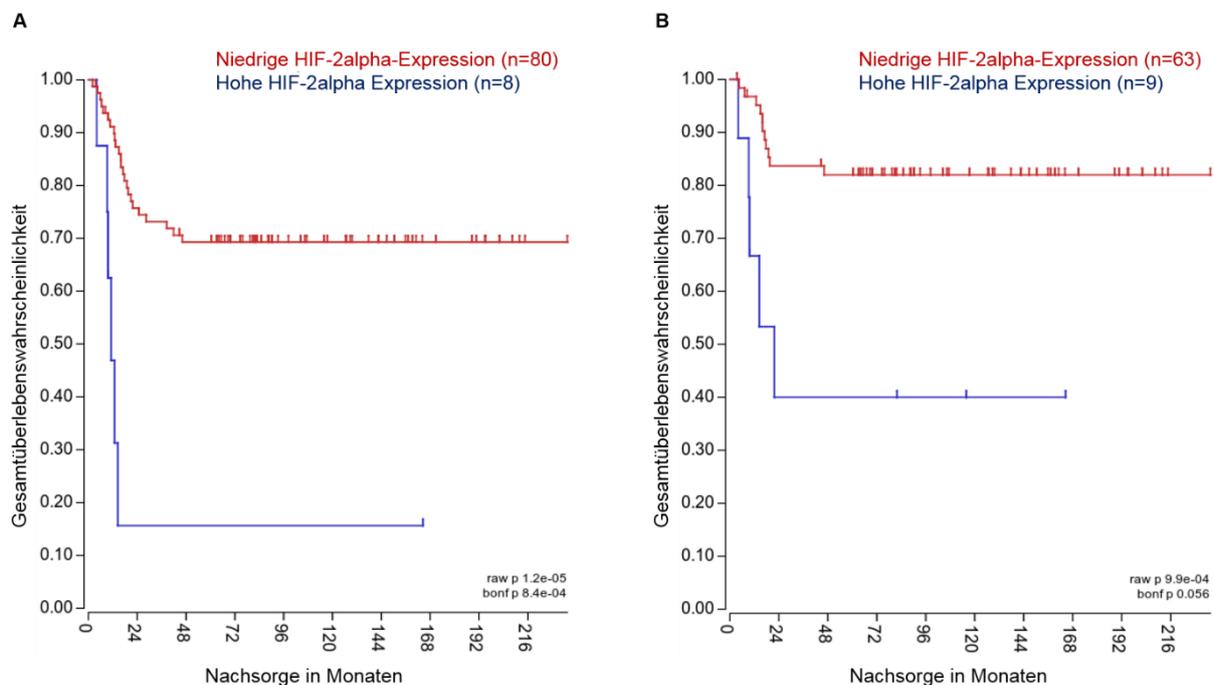


Abbildung 20: Überlebensunterschiede nach Expression von HIF-2 $\alpha$  in Tumoren mit (A) und ohne *MYCN*-Amplifikation (B)

Diese Abbildung zeigt einen Ausschnitt aus einer Datenanalyse mittels des frei verfügbaren R2-Datenanalysetools. Es handelt sich um den Datensatz Nummer 1 (Versteeg) nach Tabelle 13 (Molenaar et al., 2012). (A) beinhaltet alle Tumorproben des Datensatzes und in (B) sind nur die Tumoren ohne *MYCN*-Amplifikation eingeschlossen. Angegeben sind die Kaplan-Meier-Kurven der beiden Subgruppen von Patientenproben, eingeteilt in hohe (blau) und niedrige (rot) *HIF-2 $\alpha$* -Expression (Expressions Cutoffs 2043,9 (A) und 1971,2 (B); Gruppengröße  $\geq 8$ ). Die Größe der Subgruppe befindet sich anschließend in Klammern. Auf der y-Achse ist der Anteil der lebenden Patienten nach dem auf der x-Achse angegebenen Nachsorgezeitraum in Monaten angegeben.

## 4.5 Funktionelle Aspekte der *WT1* Expression in Neuroblastomen

### 4.5.1 Silencing von *WT1* inhibiert die Migration von SK-N-AS-Neuroblastomzellen im Transwellassay

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Hypoxie, vermittelt durch HIF-2 $\alpha$ , die *WT1* Genexpression in Kelly-Neuroblastomzellen stimuliert. Sauerstoffmangel und ein erhöhtes *WT1*-Niveau in Neuroblastomen gelten als ungünstige Prognosefaktoren

(Masserot et al., 2016; Pietras et al., 2009). Eine gesteigerte Proliferationsrate und Migration sind wichtige Indikatoren der zellulären Malignität. Eine robuste WT1-Expression in Kelly-Zellen erfordert die Behandlung mit Hypoxie bzw. Hypoxiemimetika. Um unabhängig von eventuellen Hypoxieeffekten auf das Migrationsverhalten von Neuroblastomzellen die funktionelle Rolle von WT1 zu untersuchen, wurden SK-N-AS-Zellen anstelle von Kelly-Zellen verwendet. SK-N-AS-Zellen exprimieren bereits unter Normoxie WT1 (Abb. 6). An SK-N-AS-Zellen wurde mit Hilfe von Transwell-Migrationsassays in Kombination mit einem *WT1*-Knockdown mittels RNA-Interferenz untersucht, welchen Einfluss WT1 auf das Migrationsverhalten dieser Zellen hat. Die Zellen wurden zunächst, wie oben beschrieben, mit gegen *WT1* gerichtete siRNA für 24 h inkubiert, in die Transwellfilter ausgesät und für 24 h bei 21 % O<sub>2</sub> inkubiert. Im Vergleich zur Behandlung mit ungerichteter siRNA bewirkte der Knockdown von WT1 eine signifikante Reduktion der Anzahl an migrierten SK-N-AS Zellen.

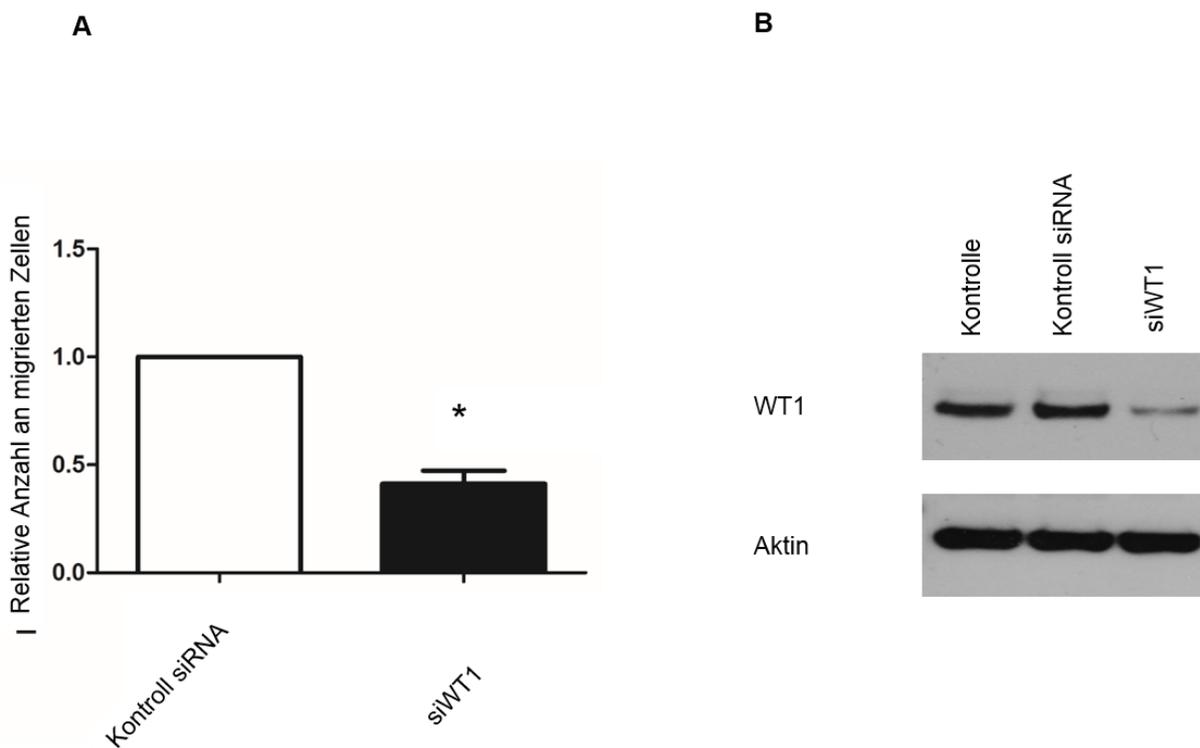


Abbildung 21: Knockdown von WT1 hemmt die Migration von SK-N-AS-Neuroblastomzellen

Nach Behandlung mit siRNA gegen *WT1* migrierten signifikant weniger SK-N-AS-Zellen durch die Transwellfilter im Vergleich zu Zellen, die mit Kontroll-siRNA behandelt wurden. Die migrierten Zellen wurden nach Fixierung und Färbung durch DAPI mit Hilfe von ImageJ mit modifizierter und standardisierter Partikelanalyse gezählt. Verglichen wurden jeweils mit siWT1 behandelte Zellen mit Zellen, die mit ungerichteter siRNA inkubiert wurden. \* $p < 0,05$ ; Gepaarter Student's t-Test.

## 5 Diskussion

Das Neuroblastom ist der häufigste extrakranielle, solide Tumor bei Kindern und macht 13 % aller Krebstodesfälle im Kindesalter aus (Louis & Shohet, 2015). Dass dieser Tumor einen solch großen Anteil an der Gesamtstatistik der Todesfälle hat erklärt, sich aus einer 5-Jahres-Überlebensrate von 55 % (Monclair et al., 2009).

Hypoxie stellt einen negativen Prognosefaktor für das Neuroblastom dar (Jogi et al., 2002; Pahlman & Mohlin, 2018) und fördert erwiesenermaßen die Tumormalignität (Semenza, 2012b). Auch WT1, das im adulten Gewebe normalerweise nicht exprimiert wird, findet sich in verschiedenen Tumoren wieder (Charlton & Pritchard-Jones, 2016; Hylander et al., 2006; Nakatsuka et al., 2006; Sera et al., 2008; X. Wang et al., 2013). Für eine Untergruppe von Neuroblastomen ohne *MYCN*-Amplifikation konnte WT1 als negativer prognostischer Faktor identifiziert werden (Masserot et al., 2016).

Ein Zusammenhang zwischen Hypoxie und WT1 Expression wurde bereits in einer früheren Arbeit für das ischämische Myokard beschrieben (K. D. Wagner, Wagner, Bondke, et al., 2002). In der vorliegenden Arbeit gelang es erstmalig zu zeigen, dass die Expression von WT1 auch in Tumorzellen (Kelly-Neuroblastomzellen) durch Hypoxie stimuliert wird. Darüber hinaus konnte erstmalig der dieser hypoxischen Regulation zu Grunde liegende molekulare Mechanismus entschlüsselt werden. Konkret konnte gezeigt werden, dass die hypoxische Aktivierung von WT1 über die Bindung von HIF-2 $\alpha$  an einen hypoxiesensitiven Enhancer im Intron 3 des *WT1*-Gens erfolgt.

### 5.1 Hypoxische WT1-Expression in Neuroblastomzelllinien

Vor dem Hintergrund, dass Hypoxie und WT1-Expression in Neuroblastomen eigenständige, negative prognostische Indikatoren darstellen (Cimmino et al., 2015; Jogi et al., 2002; Kletzel, Chou, Olszewski, Rademaker & Khan, 2015; Masserot et al., 2016; Pahlman & Mohlin, 2018; Pietras et al., 2009), wurden verschiedene Neuroblastomzelllinien auf einen Zusammenhang zwischen Sauerstoffgehalt und WT1-Expression überprüft (Abb. 6). Obwohl bei den untersuchten Zelllinien im Gegensatz zur Beobachtung von Masserot et al. (Masserot et al., 2016) keine negative Korrelation zwischen WT1-Expression und *MYCN*-Amplifikation festgestellt werden konnte, wiesen unterschiedliche Neuroblastomzelllinien unterschiedliche WT1-Niveaus auf Protein- und mRNA-Ebene auf (Abb. 6). Interessanterweise konnte eine

WT1-Expression in Kelly-Zellen nur in Hypoxie, nicht aber unter Normoxie nachgewiesen werden (Abb. 6). In Kelly-Neuroblastomzellen wurde von Martens et al. gezeigt, dass unter Hypoxie die TrkB-Rezeptor-Expression über HIF-1 $\alpha$  reguliert wird (Martens, Kirschner, Warnecke & Scholz, 2007) und dadurch möglicherweise ein maligner Phänotyp gefördert wird (Dewitt et al., 2014; Ho et al., 2002). Interessanterweise konnte in Kelly-Zellen außerdem eine HIF induzierte Erythropoietin-Expression, trotz fehlender Nierenabstammung dieser Zellen gezeigt werden (Stolze et al., 2002). Dies dokumentiert, dass sich in Tumorzellen gewebes- und zelltypspezifische Expressionsmechanismen grundsätzlich von gesundem Gewebe unterscheiden. Außerdem können diese Mechanismen selbst in scheinbar homogenen Tumorphpopulationen stark variieren und somit Abweichungen im Malignitätsgrad und möglichen Therapiezielpunkten ausmachen.

Aufgrund dieser Beobachtungen sollte zunächst überprüft werden, ob die hypoxische WT1-Expression abhängig von Hypoxie induzierbaren Faktoren ist und eine HIF-Isoform dafür vorrangig verantwortlich ist. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die hypoxische Induktion von WT1 in Kelly-Neuroblastomzellen durch Silencing von HIF-2 $\alpha$ , nicht aber von HIF-1 $\alpha$  unterdrückt wird (Abb.9). Diese Beobachtung wird durch Knockoutversuche mit CRISPR/Cas9-Technologie unterstützt. Wie in Abbildung 11 zu sehen ist, verringerte nur der CRISPR/Cas9 vermittelte Knockout von HIF-2 $\alpha$ , nicht aber von HIF-1 $\alpha$ , das mRNA- und Proteinniveau von WT1 in hypoxischen Kelly-Zellen signifikant. (siehe Abbildung 11). Um zu verifizieren, dass der genomische Knockout der HIFs auch funktionell wirksam war, wurden die Expressionsniveaus etablierter Zielgene der beiden Isoformen in den Klonen unter Hypoxie überprüft. Der Knockout von HIF-2 $\alpha$  führte zu einer Verringerung der mRNA von Erythropoietin (Stolze et al., 2002; Warnecke et al., 2004) bis fast an die Nachweisgrenze heran. Analog dazu bewirkte die Ausschaltung von HIF-1 $\alpha$  eine signifikante Verringerung der mRNA der Carboanhydrase 9 (van den Beucken et al., 2009).

Für HIF sind bereits eine Vielzahl an Zielgenen bekannt und funktionell charakterisiert (Schodel et al., 2011). Dass *WT1* hypoxieinduziert ist und es sich bei *WT1* um ein mögliches HIF-Zielgen handelt, wurde in einer früheren Arbeit der AG Scholz bereits nachgewiesen (K. D. Wagner et al., 2003). Eine sauerstoffabhängige WT1 Expression in Neuroblastomzellen und der zu Grunde liegende Regulationsmechanismus wurde bislang jedoch noch nicht untersucht. Die Art und Weise, wie HIFs generell mit DNA

interagieren, sind gut bekannt (Ebert & Bunn, 1998) und für beide Hauptisoformen von HIF ähnlich (Mole et al., 2009). Die Zielgene variieren jedoch zwischen den beiden Isoformen und auch in verschiedenen Zelltypen erheblich (C. J. Hu, Wang, Chodosh, Keith & Simon, 2003; Warnecke et al., 2004). Aus den vorliegenden Versuchsergebnissen kann geschlossen werden, dass die hypoxische WT1-Expression zumindest teilweise durch HIF gesteuert wird und in Kelly-Zellen hauptsächlich über die HIF-2 $\alpha$ -Isoform vermittelt wird. Um festzustellen, über welchen molekularen Mechanismus die *WT1* Regulation durch HIF-2 $\alpha$  stattfindet und ob es sich um einen direkten oder indirekten Effekt handelt, waren weitere Experimente nötig.

## **5.2 HIF-2 $\alpha$ vermittelte hypoxische WT1 Expression in Kelly-Neuroblastomzellen**

HIFs sind heterodimere Transkriptionsfaktoren, die an regulatorische DNA-Sequenzen ihrer Zielgene binden. Die Regulation der *WT1* -Expression ist noch nicht vollständig geklärt. Es wurden einige Transkriptionsfaktoren identifiziert, die mit dem proximalen *WT1* Promotor interagieren (Cohen, Bossone, Zhu, McDonald & Sukhatme, 1997; Dehbi, Ghahremani, Lechner, Dressler & Pelletier, 1996; Dehbi & Pelletier, 1996; McConnell, Cunliffe, Chua, Ward & Eccles, 1997). Außerdem wurde eine Autoregulation des *WT1* Promotors im Sinne einer negativen Feedbackschleife durch das WT1-Protein selbst nachgewiesen (Rupprecht, Drummond, Madden, Rauscher & Sukhatme, 1994). Um den *WT1*-Genlocus genauer zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Arbeit der UCSC Genome Browser (<https://genome.ucsc.edu>) des ENCODE Projekts verwendet (Rosenbloom et al., 2010). Hierbei wurde vor allem nach genomischen Zuständen gesucht, die hinweisend auf mögliche Interaktionsstellen von Transkriptionsfaktoren mit regulatorischen Elementen, wie z.B. Enhancern, sind (Rosenbloom et al., 2010). Wie in Abbildung 12 zu sehen ist, sind solche Elemente beispielsweise DNaseI-Hypersensitivitätscluster, die offenes Chromatin markieren oder acetyliertes Histon H3K27, das oft ein Indiz für regulatorische Elemente ist. Außerdem wurden die Daten von ChIP-seq-Experimenten für eine Vielzahl von Transkriptionsfaktoren in den Browser eingepflegt. Dies erlaubt die Lokalisation von DNA-Elementen, für die eine Bindung durch andere Transkriptionsfaktoren bereits gezeigt wurde. Im Falle von WT1 gibt es eine auffällige Anhäufung dieser Marker, wie erwartet, in der Promotorregion, aber auch in Genabschnitten, die sich mehrere kb weiter in 3'-Richtung befinden (Abb. 12). Der Abgleich mit dem Standardbindungsmotiv für HIF 5'-RCGTG-3' (Mole et al., 2009) ergab, dass es sowohl im Promotor als auch

in den Introns 1 und 3 des *WT1*-Gens mögliche HIF-Bindungsstellen gibt, die auch mit anderen Markern für Transkriptionsfaktorbindung überlappen (Daten nicht gezeigt, zum Abgleich siehe UCSC Genome Browser). In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, dass ein 2,5 kb langer *WT1*-Promotorabschnitt nach Transfektion eines Reporterkonstrukts in Kelly-Neuroblastomzellen nicht durch Hypoxie induzierbar ist (Abb. 16). Erst die Ligation eines 256 bp großen Fragments, welches die putative HRE aus dem Intron 3 enthält, vor das Promoterkonstrukt vermittelt eine deutliche Hypoxiesensibilität (Abb. 16). Die Mutation des Bindungsmotivs innerhalb des DNA-Fragments verhindert diesen Effekt (Abb. 16). Die Induktion von Hypoxiesensibilität durch die putative HRE aus dem Intron 3 lässt sich auch auf heterologe Promotoren, wie z.B. den SV40-Promotor übertragen (Abb. 16). In weiteren Experimenten konnte unsere Gruppe auch mittels Chromatin-Immunpräzipitation eine Bindung von HIF-1 $\alpha$  und HIF-2 $\alpha$  an die putative HRE im Intron 3 des *WT1* Promotors nachweisen (siehe Abbildung 14). Für mögliche HREs aus dem Promotor und Intron 1 kam es zu keiner signifikanten Anreicherung von durch HIF gebundenem Chromatin, was gegen eine Bindung der beiden Transkriptionsfaktoren an diesen Stellen spricht (Krueger et al., 2019). Im Bereich dieses neuen regulatorischen Elements im 3. Intron des *WT1*-Gens wurde erst kürzlich ein hämatopoietischer Enhancer beschrieben (Felsenfeld & Groudine, 2003).

Größer angelegte ChIPseq-Analysen haben gezeigt, dass entgegen früherer Hypothesen Transkriptionsfaktoren häufig mehrere 10000 Basenpaare entfernt von Promotoren binden (Mole et al., 2009; Schodel et al., 2011). Insbesondere für die Hypoxie-induzierbaren Faktoren ist bekannt, dass HIF-1 $\alpha$  zu 60 % und HIF-2 $\alpha$  zu über 80 % an DNA-Elementen binden, die mehr als 2,5 kb vom Promotor des jeweiligen Gens entfernt liegen (Schorg et al., 2015). Dies wirft die Frage auf, wie solche Transkriptionsfaktorbindungen an distalen Elementen eine Genexpression induzieren bzw. einen Transkriptionsstart initiieren können. Um Interaktionen zwischen Promotorregionen und distalen regulatorischen Elementen zu untersuchen, benötigt man Methoden, die es erlauben, dreidimensionale Chromatininteraktionen nachzuweisen. Eine solche Methode wurde auch in Folgeexperimenten von unserer Gruppe gewählt: Chromosome Confirmation Capture, auch 3C genannt (Naumova, Smith, Zhan & Dekker, 2012). Die Ergebnisse dieser Experimente lassen die Schlussfolgerung zu, dass es innerhalb des *WT1*-Gens schon unter Normoxie zu einem Looping zwischen dem intronischen HRE und dem *WT1*-Promotor kommt

(Krueger et al., 2019). Dies passt zu anderen Befunden, wie einem neu entdeckten HRE des *PAG1* Gens (Schorg et al., 2015) oder der Präformation eines Loops zwischen Enhancer und Transkriptionsstart für TNF- $\alpha$  (Jin et al., 2013). Unter Hypoxie wird dann durch die Bindung von HIF-2 $\alpha$  an das HRE und Rekrutierung weiterer Kofaktoren die Transkription des *WT1*-Gens induziert. Einige dieser Kofaktoren sind für andere Zielgene von HIF bereits bekannt. Möglicherweise spielen der Kofaktor p300/CREB (Ebert & Bunn, 1998) oder ATF-1 (Kvietikova, Wenger, Marti & Gassmann, 1995) in diesem Zusammenhang eine Rolle. Für diese wurde gezeigt, dass sie im Falle von HIF-1 $\alpha$  den Zielgenlocus frei von Methylierungen halten können und somit die Chromatinstruktur öffnen und für den Transkriptionsfaktor zugänglich machen (Rossler et al., 2004).

Trotz dieser umfangreichen mechanistischen Aufklärung bleiben einige Fragen offen. Sowohl die Ergebnisse aus den Elektromobilitätsshiftassays (Abb. 15), als auch die Resultate aus ChIP Experimenten (Abb. 14) dokumentieren eine Bindung beider HIF Isoformen an das identifizierte HRE. Es stellt sich somit die Frage, weshalb trotz Bindung beider HIFs ausschließlich HIF-2, jedoch nicht HIF-1, die *WT1*-Expression in hypoxischen Kelly-Zellen vermittelt. Auch die Beobachtung, dass Hypoxie die *WT1*-Expression nur in wenigen Neuroblastomzelllinien stimuliert (Abb. 6), lässt sich anhand der Ergebnisse dieser Arbeit nicht ausreichend erklären. Die Induktion von HIF-2 $\alpha$  unter Hypoxie erfolgt in allen von uns untersuchten Neuroblastomzelllinien (Abb. 6). Dennoch kommt es nur in Kelly- und SK-N-BE(2)-Zellen zu einer nachweisbaren Stimulation der *WT1* Expression (Abb. 6). Es muss also darüber hinaus noch weitere Faktoren oder Mechanismen geben, die diese zell- und kontextspezifische HIF-2 $\alpha$  vermittelte Expression beeinflussen. Denkbar wären zum Beispiel zur Transkription benötigte Kofaktoren oder epigenetische Modifikationen, die in Kelly-Zellen gegeben sind und in anderen Zellen fehlen.

### **5.3 Funktionelle Aspekte von Hypoxie, HIF- und WT1-Expression in Neuroblastomen**

Die Feststellung, dass *WT1* gerade in Subpopulationen von Neuroblastompatienten ohne *MYCN*-Amplifikation ein Malignitätskriterium darstellt (Masserot et al., 2016), passt zur Analyse von R2-Daten. Wie in Abbildung 18 zu sehen ist, lässt sich die Patientenpopulation mit Tumoren ohne *MYCN*-Amplifikation anhand der *WT1*-Expression in zwei Gruppen mit unterschiedlichen Kaplan-Meier-Kurven einteilen.

Hohe *WT1*-Expression korreliert in dieser Stichprobe signifikant mit einer niedrigeren Gesamtüberlebensrate. Es lässt sich kein Vergleich mit Patienten aus derselben Studie mit *MYCN*-Amplifikation durchführen, da keine *MYCN*-positiven Neuroblastome eingeschlossen waren. Die Amplifikation des *MYCN*-Gens ist das am besten untersuchte und etablierte molekulare Malignitätskriterium für Neuroblastome und findet sich deswegen in den Diagnose- und Klassifikationskriterien des Neuroblastoms wieder (Thompson et al., 2016). Bei der Analyse von R2-Daten und unserer Experimente lässt sich kein direkter Zusammenhang zwischen dem Expressionsniveau von *WT1* und einer *MYCN*-Amplifikation herstellen. Sowohl *WT1*- als auch das *MYCN*-Gen kodieren für Transkriptionsfaktoren und spielen eine entscheidende Rolle an der Gabelung zwischen zellulärer Differenzierung und Proliferation (Knoepfler, Cheng & Eisenman, 2002; Martinez-Estrada et al., 2010). Die Datenlage legt die Vermutung nahe, dass es sich um zwei unabhängige Malignitätsfaktoren handelt, die aber möglicherweise über ähnliche Mechanismen einen malignen Phänotyp propagieren. Für *MYCN* gibt es eine Reihe von Studien, die seine Funktion in Neuroblastomen illustrieren und zeigen, wie es beispielsweise über *p53*-Repression oder Veränderungen im Zellzyklus einen malignen Phänotyp induziert (Übersicht in (Ruiz-Perez, Henley & Arsenian-Henriksson, 2017)). Zur Rolle und Funktion von *WT1* in Neuroblastomen liegen nur wenige gesicherte Erkenntnisse vor. In dieser Arbeit wird gezeigt, dass eine mittels RNA-Interferenz induzierte *WT1*-Repression die Migration von SK-NA-S-Neuroblastomzellen signifikant reduziert (Abb. 21). Um mögliche *WT1*-unabhängige Nebeneffekte einer Hypoxie zu vermeiden, wurden für diese Versuche SK-NA-S-Zellen anstelle von Kelly-Zellen verwendet. SK-NA-S-Zellen enthalten bereits unter Normoxie ein hohes Niveau an *WT1*-Protein (Abb. 6). Der Einfluss von *WT1* auf das Migrationsverhalten der Zellen passt zu Ergebnissen anderer Publikationen und lässt sich möglicherweise durch dessen zentrale Rolle innerhalb eines Mechanismus erklären, der auch für das Tumorwachstum von Bedeutung ist: Die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) (Martinez-Estrada et al., 2010). Martinez et al. (Martinez-Estrada et al., 2010) haben gezeigt, dass *WT1* ein direkter transkriptioneller Aktivator des *SNAI1* Gens ist. Dieses kodiert für ein Protein, das Schlüsselregulator eines Prozesses ist, der es epithelialen Zellen erlaubt, in einen migratorischen, mesenchymalen Zustand überzugehen. Unter anderem wird durch *SNAI1* der epitheliale Marker E-Cadherin herunterreguliert und andere mesenchymale Marker, wie z.B. Vimentin, werden hochreguliert. Dadurch können sich Zellen mit

ehemals epithelialen Eigenschaften aus dem Zellverband lösen, dedifferenzieren und nach Migration eventuell wieder z.B. zu einer Epithelzelle differenzieren. Es wurde gezeigt, dass WT1 essenziell für die Bildung kardiovaskulärer Progenitorzellen während der Organogenese ist. Da WT1 auch während der Myokardischämie im adulten Organismus erneut auftaucht (K. D. Wagner, Wagner, Bondke, et al., 2002), wurde die These aufgestellt, dass dieser Prozess auch während der Narbenheilung im ischämischen Myokard von Bedeutung ist.

EMT ist auch in der Krebsforschung viel diskutiert. Denn für die Metastierung des Primärtumors oder Entstehung sogenannter Tumorstammzellen, zentrale Malignitätsmechanismen solider Tumoren, ist die Transition der Tumorzellen von einem epithelialen zu einem migratorischen bzw. mesenchymalen Zelltyp erforderlich. WT1 ist nachweislich in einer Vielzahl von Tumoren hochreguliert (Qi et al., 2015) und auch in Neuroblastomen ein möglicher Malignitätsmarker (Masserot et al., 2016). WT1 könnte also über Aktivierung von SNAI1 und konsekutive Repression von E-Cadherin dazu beitragen, dass sich einzelne Tumorzellen aus ihrem Verband lösen und migratorische Eigenschaften annehmen. Dies würde vermutlich zu Metastasierung von Tumoren oder auch aggressivem Wachstum führen.

Die Rolle von HIF in Neuroblastomen hingegen ist bereits etwas besser untersucht und weniger spekulativ. Wir beobachteten, dass hypoxische Kelly-Zellen im Vergleich zu normoxischen Zellen ein signifikant höheres Migrationsverhalten in Transwellmigrationsassays aufweisen (Daten nicht gezeigt). In verschiedenen Arbeiten werden jedoch teilweise kontroverse Beobachtungen und Beurteilungen hinsichtlich der Rolle der HIFs in Neuroblastomen generell, und von HIF-2 $\alpha$  im Besonderen, gemacht. So konnten zum Beispiel Pietras et al. (Pietras et al., 2009) zeigen, dass HIF-2 $\alpha$  einen undifferenzierten Phänotyp in Neuroblastomzellen induziert (Pietras et al., 2009). Die WT1-Expression wurde in dieser Studie nicht untersucht. Daher ist es unklar, ob dieser Effekt möglicherweise über eine Aktivierung von WT1 zu erklären ist oder unabhängig davon ist. Jogi et al. konnten in Maus-Xenograft-Modellen einen HIF-abhängigen Wechsel zu einem eher undifferenzierten Tumorphänotyp unter Hypoxie nachweisen (Jogi et al., 2002). Dennoch gibt es auch widersprüchliche Befunde, die HIF-2 $\alpha$  die Funktion eines Onkogens absprechen (Mohlin et al., 2017). Neuroblastome sind durch eine Vielzahl von heterogenen, genetischen Alterationen gekennzeichnet (K. K. Matthay et al., 2016). Behandlungskonzepte basieren auf komplexer multimodaler Therapie und sind meist

auf den Einzelfall zugeschnitten. Dies verdeutlicht, dass man es im Falle des Neuroblastoms mit einer sehr heterogenen Tumorentität zu tun hat. Auch HIFs induzieren hunderte Zielgene und eine Vielzahl von Transkriptionskaskaden. Diese können je nach Zellkontext unterschiedliche Effekte induzieren. Diese vielen Variablen und die verbleibenden Unbekannten im Hinblick auf HIFs und Neuroblastome machen es schwer, den HIFs eine eindeutige Rolle in der Pathogenese von Neuroblastomen zuzuordnen.

#### **5.4 Die Bedeutung von HIF und WT1 in der Therapie von primären Neuroblastomen**

HIFs gelten nicht nur für die Behandlung von Neuroblastomen, sondern auch vieler anderer Tumoren als ein interessantes therapeutisches Ziel (Pahlman & Mohlin, 2018; Semenza, 2012b). Zielgene und zellspezifische Regulationsmechanismen der HIFs sind nach wie vor Gegenstand aktueller Forschung. Die HIF-Isoformen unterscheiden sich im Hinblick auf diese teilweise, zeigen aber überlappende Zielgene und in der Bindungssequenz keine Unterschiede (Schodel et al., 2011). Generell besteht aktuell Konsens, dass HIF-1 $\alpha$  eher eine Rolle im primären Wachstum von Tumoren hat und HIF-2 $\alpha$  verantwortlich für Metastasierung ist (Pahlman & Mohlin, 2018). Auch scheinen HIF-1 $\alpha$  und HIF-2 $\alpha$  in unterschiedlichen Tumorentitäten von unterschiedlicher Bedeutung zu sein. Daher gilt ein Isoform-spezifischer Therapieansatz im Hinblick auf die individuelle Tumorentität als vielversprechend.

Proonkogene Effekte der HIFs sind nicht zuletzt auch ihren Zielgenen geschuldet. Daher besteht grundsätzlich die Frage, ob nicht auch diese ein geeignetes Therapieziel darstellen, da die HIFs selbst essenziell für die Physiologie des Organismus sind.

VEGF ist Zielgen beider Isoformen und schon seit über 50 Jahren Gegenstand der Tumorforschung. Mit Bevacizumab wurde der erste monoklonale Antikörper entwickelt, der über Inhibition von VEGF die Tumolvaskularisation unterbindet und somit das Tumorstadium eindämmen soll (Hartwich et al., 2013). Bevacizumab und neuere Generationen von Angiogeneseinhibitoren werden erfolgreich als Ergänzung zu weiteren Chemotherapeutika in der Behandlung von Neuroblastomen eingesetzt (Hartwich et al., 2013). Als Monotherapie scheint die VEGF-Inhibition für Neuroblastome ungeeignet. Hartwich et al. glauben, dass dies an möglichen Resistenzmechanismen liegt, die unter anderem über HIF-1 $\alpha$  reguliert sein könnten.

Für HIF-1 $\alpha$  gibt es eine große Menge an Inhibitoren (Übersicht siehe (Y. Hu, Liu & Huang, 2013)). Die beste Form der Inhibition ist noch umstritten und die klinische Erprobung steht am Anfang. Interessanterweise ist auch WT1 ein transkriptioneller Aktivator von VEGF und KDR, dem Gen des VEGF-Rezeptors 2 (Kirschner, Sciesielski, Krueger & Scholz, 2017). Möglicherweise besteht darin ein weiterer Mechanismus, über den WT1 in Tumoren und insbesondere in Neuroblastomen malignes Wachstum fördert.

Für das klarzellige Nierenzellkarzinom (CCRCC) gibt es bereits ein Molekül, das sich in der Phase 2 der klinischen Erprobung befindet. Der HIF-Pathway scheint aber im Allgemeinen eine wichtige Rolle in der Pathogenese des CCRCC zu spielen. Beim sogenannten VHL-Syndrom kommt es bei den Patienten aufgrund einer Mutation im VHL-Gen und einer konsekutiven erhöhten HIF-Aktivität zu einer erhöhten Inzidenz von Hämangiomen und Nierenzellkarzinomen (Semenza, 2012a). PT2977 ist ein kleines Molekül, das durch Blockade der Dimerisierung von HIF-2 $\alpha$  mit seiner  $\beta$ -Untereinheit antagonistisch wirkt und vielversprechend für die Therapie des CCRCC zu sein scheint (Xu et al., 2019). Diese Arbeit, R2-Daten und andere Publikationen deuten darauf hin, dass HIF-2 $\alpha$  auch in Neuroblastomen eine wichtige Rolle in der Pathogenese zu spielen scheint. Die Erprobung an Subgruppen von Neuroblastomen könnte daher möglicherweise einen neuen Therapieansatz darstellen.

Um nun WT1 als mögliches Therapieziel zu diskutieren, muss natürlich seine Rolle als Onkogen vorausgesetzt sein. WT1 als Onkogen zu bezeichnen liegt nahe angesichts der Vielzahl an Tumoren, in denen sich eine erhöhte WT1-Expression zeigt (Dong et al., 2015; Hylander et al., 2006; Menssen et al., 2000; Miyoshi et al., 2002; Nakatsuka et al., 2006; Sera et al., 2008; Sotobori et al., 2006; X. Wang et al., 2013). Daher rückten das Gen und seine Produkte schon früh als mögliches Ziel für onkologische Therapien in den Fokus der Wissenschaft (Dao et al., 2013; Di Stasi, Jimenez, Minagawa, Al-Obaidi & Rezvani, 2015; Kletzel et al., 2015; Nishida & Sugiyama, 2016; Tatsumi et al., 2008; Van Driessche et al., 2012; Van Tendeloo et al., 2010). Dies gilt insbesondere auch, da gesunde, adulte Zellen kein WT1 exprimieren und so eine Unterdrückung des Gens potenziell wenig Nebenwirkungen an gesunden Zellen haben könnte.

WT1 basierte Immuntherapie, z.B. mit Hilfe genetisch veränderter T-Zellen (Van Driessche et al., 2012) und dendritischer Zellen (Nishida & Sugiyama, 2016; Van

Tendeloo et al., 2010), wird seit einiger Zeit in der Diagnostik und Therapie der akuten und chronischen myeloischen Leukämie erprobt (Di Stasi et al., 2015). Auch in der Therapie von Lungenkarzinomen und kolorektalen Karzinomen wird der Einsatz von gegen WT1 gerichteter Therapien erforscht (Kajihara et al., 2016; Lindstedt, Lindgren, Andersson & Engstrom, 2014). In Neuroblastomen wurde WT1 bereits mit einer schlechteren Prognose in Verbindung gebracht (Masserot et al., 2016) und als diagnostischer Marker für die Residualtumorlast diskutiert (Kletzel et al., 2015). Dies und die Tatsache, dass über 70 % aller Neuroblastome aus der Hochrisikogruppe positiv auf WT1 getestet wurden (Kletzel et al., 2015), lässt Raum für Spekulationen bezüglich einer möglichen gegen WT1 gerichteten Therapie bei Neuroblastomen. Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstützen dabei die Vermutung, dass WT1 möglicherweise eine Rolle im malignen Tumorwachstum der Neuroblastome spielt und daher Therapieziel sein könnte. In Transwellmigrationsassays konnte das Migrationsverhalten von SK-NA-S-Neuroblastomzellen durch Behandlung mit gegen WT1 gerichteter siRNA signifikant gegenüber mit ungerichteter siRNA behandelten Zellen reduziert werden. Migration ist neben u.a. Zellproliferation und erhöhter antiapoptotischer Aktivität eine Grundsäule des malignen Tumorprogresses (Paul, Mistriotis & Konstantopoulos, 2017) (siehe auch oben zu EMT). Sie bildet die Grundlage für die Aussaat und Metastasierung des Primärtumors und ist ein Hauptangriffspunkt von Tumortherapien. Auch aus R2-Datenanalysen geht hervor, dass WT1 in verschiedenen Subpopulationen von Neuroblastompatienten mit einer erhöhten Mortalität assoziiert ist. Gerade in Neuroblastomen ohne MYCN-Amplifikation zeigt sich dieser Zusammenhang (Abb. 18). Aber auch in den Diagnosestadien 1, 2, 3 und 4S scheint WT1 ein Indikator für erhöhte Mortalität zu sein (Abb. 19). In diesen prognostisch günstigeren Stadien könnte WT1 als zusätzlicher Marker zur Evaluation und Therapieentscheidung herangezogen werden. Im Rahmen einer individuellen Therapie könnte eine gegen WT1 gerichtete Therapie entweder ergänzend zur Standardtherapie, bei Therapieversagen oder als Alternative zum Einsatz kommen.

## **6 Ausblick**

Diese Arbeit zeigt zum ersten Mal den detaillierten Regulationsmechanismus der hypoxischen WT1-Expression in Kelly-Neuroblastomzellen. Funktionelle Implikationen der WT1-Expression unter Hypoxie werden theoretisch diskutiert und durch Transwellmigrationsassays an SK-NA-S-Neuroblastomzellen werden Auswirkungen auf das Migrationsverhalten exemplarisch verdeutlicht. Weitergehende Untersuchungen an Zell- oder Tiermodellen für Neuroblastome könnten Aufschluss über andere funktionelle Aspekte geben:

Apoptoseverhalten und Proliferation könnten ausblickend mittels Annexin V Färbung und TUNEL Assays, bzw. fluoreszenzbasierter DNA-Quantifizierungsmethoden bestimmt werden. Weiterhin wären größer angelegte ChIP-seq-Untersuchungen an primären Neuroblastomzellen von Interesse, um Downstreamtargets von WT1 in Neuroblastomen zu identifizieren. Damit könnte man funktionelle Beobachtungen möglicherweise erklären. Aus den Ergebnissen könnte man ein komplexeres Modell ableiten und die Grundlage für neue Therapieansatzpunkte schaffen.

## 8 Literaturverzeichnis

- (GPOH), G. f. P. O. u. H. (2019). Neuroblastom. Retrieved from <https://www.awmf.org/leitlinien/detail/ll/025-008.html>
- Aprelikova, O., Chandramouli, G. V., Wood, M., Vasselli, J. R., Riss, J., Maranchie, J. K., . . . Barrett, J. C. (2004). Regulation of HIF prolyl hydroxylases by hypoxia-inducible factors. *J Cell Biochem*, 92(3), 491-501. doi:10.1002/jcb.20067
- Armstrong, J. F., Pritchard-Jones, K., Bickmore, W. A., Hastie, N. D. & Bard, J. B. (1993). The expression of the Wilms' tumour gene, WT1, in the developing mammalian embryo. *Mech Dev*, 40(1-2), 85-97. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8382938>
- Asgharzadeh, S., Pique-Regi, R., Sposto, R., Wang, H., Yang, Y., Shimada, H., . . . Seeger, R. C. (2006). Prognostic significance of gene expression profiles of metastatic neuroblastomas lacking MYCN gene amplification. *J Natl Cancer Inst*, 98(17), 1193-1203. doi:10.1093/jnci/djj330
- Bandiera, R., Sacco, S., Vidal, V. P., Chaboissier, M. C. & Schedl, A. (2015). Steroidogenic organ development and homeostasis: A WT1-centric view. *Mol Cell Endocrinol*, 408, 145-155. doi:10.1016/j.mce.2015.01.009
- Barboux, S., Niaudet, P., Gubler, M. C., Grunfeld, J. P., Jaubert, F., Kuttann, F., . . . McElreavey, K. (1997). Donor splice-site mutations in WT1 are responsible for Frasier syndrome. *Nat Genet*, 17(4), 467-470. doi:10.1038/ng1297-467
- Berry, R. L., Ozdemir, D. D., Aronow, B., Lindstrom, N. O., Dudnakova, T., Thornburn, A., . . . Hohenstein, P. (2015). Deducing the stage of origin of Wilms' tumours from a developmental series of Wt1-mutant mice. *Dis Model Mech*, 8(8), 903-917. doi:10.1242/dmm.018523
- Bertout, J. A., Majmundar, A. J., Gordan, J. D., Lam, J. C., Ditsworth, D., Keith, B., . . . Simon, M. C. (2009). HIF2alpha inhibition promotes p53 pathway activity, tumor cell death, and radiation responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(34), 14391-14396. doi:10.1073/pnas.0907357106
- Bosse, K. R. & Maris, J. M. (2016). Advances in the translational genomics of neuroblastoma: From improving risk stratification and revealing novel biology to identifying actionable genomic alterations. *Cancer*, 122(1), 20-33. doi:10.1002/cncr.29706

- Boyle, A. P., Davis, S., Shulha, H. P., Meltzer, P., Margulies, E. H., Weng, Z., . . . Crawford, G. E. (2008). High-resolution mapping and characterization of open chromatin across the genome. *Cell*, *132*(2), 311-322.  
doi:10.1016/j.cell.2007.12.014
- Brodeur, G. M., Pritchard, J., Berthold, F., Carlsen, N. L., Castel, V., Castelberry, R. P., . . . et al. (1993). Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment. *J Clin Oncol*, *11*(8), 1466-1477.  
doi:10.1200/JCO.1993.11.8.1466
- Buckler, A. J., Pelletier, J., Haber, D. A., Glaser, T. & Housman, D. E. (1991). Isolation, characterization, and expression of the murine Wilms' tumor gene (WT1) during kidney development. *Mol Cell Biol*, *11*(3), 1707-1712. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1671709>
- Call, K. M., Glaser, T., Ito, C. Y., Buckler, A. J., Pelletier, J., Haber, D. A., . . . et al. (1990). Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus. *Cell*, *60*(3), 509-520. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2154335>
- Charlton, J. & Pritchard-Jones, K. (2016). WT1 Mutation in Childhood Cancer. *Methods Mol Biol*, *1467*, 1-14. doi:10.1007/978-1-4939-4023-3\_1
- Chau, Y. Y., Brownstein, D., Mjoseng, H., Lee, W. C., Buza-Vidas, N., Nerlov, C., . . . Hastie, N. (2011). Acute multiple organ failure in adult mice deleted for the developmental regulator Wt1. *PLoS Genet*, *7*(12), e1002404.  
doi:10.1371/journal.pgen.1002404
- Chen, D., Li, M., Luo, J. & Gu, W. (2003). Direct interactions between HIF-1 alpha and Mdm2 modulate p53 function. *J Biol Chem*, *278*(16), 13595-13598.  
doi:10.1074/jbc.C200694200
- Cimmino, F., Pezone, L., Avitabile, M., Acierno, G., Andolfo, I., Capasso, M. & Iolascon, A. (2015). Inhibition of hypoxia inducible factors combined with all-trans retinoic acid treatment enhances glial transdifferentiation of neuroblastoma cells. *Sci Rep*, *5*, 11158. doi:10.1038/srep11158
- Cohen, H. T., Bossone, S. A., Zhu, G., McDonald, G. A. & Sukhatme, V. P. (1997). Sp1 is a critical regulator of the Wilms' tumor-1 gene. *J Biol Chem*, *272*(5), 2901-2913. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9006935>
- Dao, T., Yan, S., Veomett, N., Pankov, D., Zhou, L., Korontsvit, T., . . . Scheinberg, D. A. (2013). Targeting the intracellular WT1 oncogene product with a

- therapeutic human antibody. *Sci Transl Med*, 5(176), 176ra133.  
doi:10.1126/scitranslmed.3005661
- Dehbi, M., Ghahremani, M., Lechner, M., Dressler, G. & Pelletier, J. (1996). The paired-box transcription factor, PAX2, positively modulates expression of the Wilms' tumor suppressor gene (WT1). *Oncogene*, 13(3), 447-453. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8760285>
- Dehbi, M. & Pelletier, J. (1996). PAX8-mediated activation of the wt1 tumor suppressor gene. *EMBO J*, 15(16), 4297-4306. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8861958>
- Dewitt, J., Ochoa, V., Urschitz, J., Elston, M., Moisyadi, S. & Nishi, R. (2014). Constitutively active TrkB confers an aggressive transformed phenotype to a neural crest-derived cell line. *Oncogene*, 33(8), 977-985.  
doi:10.1038/onc.2013.39
- Di Stasi, A., Jimenez, A. M., Minagawa, K., Al-Obaidi, M. & Rezvani, K. (2015). Review of the Results of WT1 Peptide Vaccination Strategies for Myelodysplastic Syndromes and Acute Myeloid Leukemia from Nine Different Studies. *Front Immunol*, 6, 36. doi:10.3389/fimmu.2015.00036
- Dong, L., Pietsch, S. & Englert, C. (2015). Towards an understanding of kidney diseases associated with WT1 mutations. *Kidney Int*, 88(4), 684-690.  
doi:10.1038/ki.2015.198
- Doudna, J. A. & Charpentier, E. (2014). Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 346(6213), 1258096.  
doi:10.1126/science.1258096
- Ebert, B. L. & Bunn, H. F. (1998). Regulation of transcription by hypoxia requires a multiprotein complex that includes hypoxia-inducible factor 1, an adjacent transcription factor, and p300/CREB binding protein. *Mol Cell Biol*, 18(7), 4089-4096. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9632793>
- Fandrey, J., Gorr, T. A. & Gassmann, M. (2006). Regulating cellular oxygen sensing by hydroxylation. *Cardiovasc Res*, 71(4), 642-651.  
doi:10.1016/j.cardiores.2006.05.005
- Felsenfeld, G. & Groudine, M. (2003). Controlling the double helix. *Nature*, 421(6921), 448-453. doi:10.1038/nature01411

- Gaj, T., Gersbach, C. A. & Barbas, C. F., 3rd. (2013). ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol*, 31(7), 397-405. doi:10.1016/j.tibtech.2013.04.004
- Gao, P., Zhang, H., Dinavahi, R., Li, F., Xiang, Y., Raman, V., . . . Dang, C. V. (2007). HIF-dependent antitumorigenic effect of antioxidants in vivo. *Cancer Cell*, 12(3), 230-238. doi:10.1016/j.ccr.2007.08.004
- Gao, Y., Toska, E., Denmon, D., Roberts, S. G. & Medler, K. F. (2014). WT1 regulates the development of the posterior taste field. *Development*, 141(11), 2271-2278. doi:10.1242/dev.105676
- Garner, E. F. & Beierle, E. A. (2015). Cancer Stem Cells and Their Interaction with the Tumor Microenvironment in Neuroblastoma. *Cancers (Basel)*, 8(1). doi:10.3390/cancers8010005
- Gessler, M., Poustka, A., Cavenee, W., Neve, R. L., Orkin, S. H. & Bruns, G. A. (1990). Homozygous deletion in Wilms tumours of a zinc-finger gene identified by chromosome jumping. *Nature*, 343(6260), 774-778. doi:10.1038/343774a0
- Haber, D. A., Sohn, R. L., Buckler, A. J., Pelletier, J., Call, K. M. & Housman, D. E. (1991). Alternative splicing and genomic structure of the Wilms tumor gene WT1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(21), 9618-9622. doi:10.1073/pnas.88.21.9618
- Hammes, A., Guo, J. K., Lutsch, G., Leheste, J. R., Landrock, D., Ziegler, U., . . . Schedl, A. (2001). Two splice variants of the Wilms' tumor 1 gene have distinct functions during sex determination and nephron formation. *Cell*, 106(3), 319-329. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11509181>
- Hartwich, J., Orr, W. S., Ng, C. Y., Spence, Y., Morton, C. & Davidoff, A. M. (2013). HIF-1alpha activation mediates resistance to anti-angiogenic therapy in neuroblastoma xenografts. *J Pediatr Surg*, 48(1), 39-46. doi:10.1016/j.jpedsurg.2012.10.016
- Hartwig, S., Ho, J., Pandey, P., Macisaac, K., Taglienti, M., Xiang, M., . . . Kreidberg, J. A. (2010). Genomic characterization of Wilms' tumor suppressor 1 targets in nephron progenitor cells during kidney development. *Development*, 137(7), 1189-1203. doi:10.1242/dev.045732
- Hastie, N. D. (2017). Wilms' tumour 1 (WT1) in development, homeostasis and disease. *Development*, 144(16), 2862-2872. doi:10.1242/dev.153163

- Herzer, U., Crocoll, A., Barton, D., Howells, N. & Englert, C. (1999). The Wilms tumor suppressor gene wt1 is required for development of the spleen. *Curr Biol*, 9(15), 837-840. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10469569>
- Ho, R., Eggert, A., Hishiki, T., Minturn, J. E., Ikegaki, N., Foster, P., . . . Brodeur, G. M. (2002). Resistance to chemotherapy mediated by TrkB in neuroblastomas. *Cancer Res*, 62(22), 6462-6466. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12438236>
- Holmquist-Mengelbier, L., Fredlund, E., Lofstedt, T., Noguera, R., Navarro, S., Nilsson, H., . . . Pahlman, S. (2006). Recruitment of HIF-1alpha and HIF-2alpha to common target genes is differentially regulated in neuroblastoma: HIF-2alpha promotes an aggressive phenotype. *Cancer Cell*, 10(5), 413-423. doi:10.1016/j.ccr.2006.08.026
- Hossain, A. & Saunders, G. F. (2001). The human sex-determining gene SRY is a direct target of WT1. *J Biol Chem*, 276(20), 16817-16823. doi:10.1074/jbc.M009056200
- Hu, C. J., Wang, L. Y., Chodosh, L. A., Keith, B. & Simon, M. C. (2003). Differential roles of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and HIF-2alpha in hypoxic gene regulation. *Mol Cell Biol*, 23(24), 9361-9374. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14645546>
- Hu, Y., Liu, J. & Huang, H. (2013). Recent agents targeting HIF-1alpha for cancer therapy. *J Cell Biochem*, 114(3), 498-509. doi:10.1002/jcb.24390
- Huang, L. E., Gu, J., Schau, M. & Bunn, H. F. (1998). Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O2-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(14), 7987-7992. doi:10.1073/pnas.95.14.7987
- Hylander, B., Repasky, E., Shrikant, P., Intengan, M., Beck, A., Driscoll, D., . . . Odunsi, K. (2006). Expression of Wilms tumor gene (WT1) in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol*, 101(1), 12-17. doi:10.1016/j.ygyno.2005.09.052
- Jin, F., Li, Y., Dixon, J. R., Selvaraj, S., Ye, Z., Lee, A. Y., . . . Ren, B. (2013). A high-resolution map of the three-dimensional chromatin interactome in human cells. *Nature*, 503(7475), 290-294. doi:10.1038/nature12644
- Jogi, A., Ora, I., Nilsson, H., Lindeheim, A., Makino, Y., Poellinger, L., . . . Pahlman, S. (2002). Hypoxia alters gene expression in human neuroblastoma cells

- toward an immature and neural crest-like phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(10), 7021-7026. doi:10.1073/pnas.102660199
- Kaelin, W. G., Jr. & Ratcliffe, P. J. (2008). Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Mol Cell*, 30(4), 393-402. doi:10.1016/j.molcel.2008.04.009
- Kajihara, M., Takakura, K., Kanai, T., Ito, Z., Saito, K., Takami, S., . . . Koido, S. (2016). Dendritic cell-based cancer immunotherapy for colorectal cancer. *World J Gastroenterol*, 22(17), 4275-4286. doi:10.3748/wjg.v22.i17.4275
- Kann, M., Bae, E., Lenz, M. O., Li, L., Trannguyen, B., Schumacher, V. A., . . . Kreidberg, J. A. (2015). WT1 targets Gas1 to maintain nephron progenitor cells by modulating FGF signals. *Development*, 142(7), 1254-1266. doi:10.1242/dev.119735
- Keith B, J. R., Simon MC. (2012). HIF1 $\alpha$  and HIF2 $\alpha$ : sibling rivalry in hypoxic tumour growth and progression. *Nat Rev Cancer.*, 12 (1), 9-22.
- Kirschner, K. M., Sciesielski, L. K., Krueger, K. & Scholz, H. (2017). 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*, 292(49), 20281-20291. doi:10.1074/jbc.M117.816751
- Kizaka-Kondoh, S., Inoue, M., Harada, H. & Hiraoka, M. (2003). Tumor hypoxia: a target for selective cancer therapy. *Cancer Sci*, 94(12), 1021-1028. doi:10.1111/j.1349-7006.2003.tb01395.x
- Kletzel, M., Chou, P. M., Olszewski, M., Rademaker, A. W. & Khan, S. (2015). Expression of Wilms tumor gene in high risk neuroblastoma: complementary marker to tyrosine hydroxylase for detection of minimal residual disease. *Transl Pediatr*, 4(3), 219-225. doi:10.3978/j.issn.2224-4336.2015.07.01
- Knoepfler, P. S., Cheng, P. F. & Eisenman, R. N. (2002). N-myc is essential during neurogenesis for the rapid expansion of progenitor cell populations and the inhibition of neuronal differentiation. *Genes Dev*, 16(20), 2699-2712. doi:10.1101/gad.1021202
- Knudson, A. G., Jr. & Strong, L. C. (1972). Mutation and cancer: a model for Wilms' tumor of the kidney. *J Natl Cancer Inst*, 48(2), 313-324. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4347033>
- Kocak, H., Ackermann, S., Hero, B., Kahlert, Y., Oberthuer, A., Juraeva, D., . . . Fischer, M. (2013). Hox-C9 activates the intrinsic pathway of apoptosis and is

- associated with spontaneous regression in neuroblastoma. *Cell Death Dis*, 4, e586. doi:10.1038/cddis.2013.84
- Kreidberg, J. A., Sariola, H., Loring, J. M., Maeda, M., Pelletier, J., Housman, D. & Jaenisch, R. (1993). WT-1 is required for early kidney development. *Cell*, 74(4), 679-691. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8395349>
- Krueger, K., Catanese, L., Sciesielski, L. K., Kirschner, K. M. & Scholz, H. (2019). Deletion of an intronic HIF-2alpha binding site suppresses hypoxia-induced WT1 expression. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech*, 1862(1), 71-83. doi:10.1016/j.bbagr.2018.11.003
- Kvietikova, I., Wenger, R. H., Marti, H. H. & Gassmann, M. (1995). The transcription factors ATF-1 and CREB-1 bind constitutively to the hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) DNA recognition site. *Nucleic Acids Res*, 23(22), 4542-4550. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8524640>
- Lando, D., Peet, D. J., Whelan, D. A., Gorman, J. J. & Whitelaw, M. L. (2002). Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch. *Science*, 295(5556), 858-861. doi:10.1126/science.1068592
- Lefebvre, J., Clarkson, M., Massa, F., Bradford, S. T., Charlet, A., Buske, F., . . . Schedl, A. (2015). Alternatively spliced isoforms of WT1 control podocyte-specific gene expression. *Kidney Int*, 88(2), 321-331. doi:10.1038/ki.2015.140
- Liao, D., Corle, C., Seagroves, T. N. & Johnson, R. S. (2007). Hypoxia-inducible factor-1alpha is a key regulator of metastasis in a transgenic model of cancer initiation and progression. *Cancer Res*, 67(2), 563-572. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-2701
- Lindstedt, I., Lindgren, M. A., Andersson, E. & Engstrom, W. (2014). The WT1 gene-- its role in tumorigenesis and prospects for immunotherapeutic advances. *In Vivo*, 28(5), 675-681. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25189877>
- Liu, Z. J., Semenza, G. L. & Zhang, H. F. (2015). Hypoxia-inducible factor 1 and breast cancer metastasis. *J Zhejiang Univ Sci B*, 16(1), 32-43. doi:10.1631/jzus.B1400221
- Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta C(T))</sup> Method. *Methods*, 25(4), 402-408. doi:10.1006/meth.2001.1262

- Loboda, A., Jozkowicz, A. & Dulak, J. (2010). HIF-1 and HIF-2 transcription factors-- similar but not identical. *Mol Cells*, 29(5), 435-442. doi:10.1007/s10059-010-0067-2
- Louis, C. U. & Shohet, J. M. (2015). Neuroblastoma: molecular pathogenesis and therapy. *Annu Rev Med*, 66, 49-63. doi:10.1146/annurev-med-011514-023121
- Makarova, K. S., Haft, D. H., Barrangou, R., Brouns, S. J., Charpentier, E., Horvath, P., . . . Koonin, E. V. (2011). Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol*, 9(6), 467-477. doi:10.1038/nrmicro2577
- Maris, J. M., Hogarty, M. D., Bagatell, R. & Cohn, S. L. (2007). Neuroblastoma. *Lancet*, 369(9579), 2106-2120. doi:10.1016/S0140-6736(07)60983-0
- Martens, L. K., Kirschner, K. M., Warnecke, C. & Scholz, H. (2007). Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) is a transcriptional activator of the TrkB neurotrophin receptor gene. *J Biol Chem*, 282(19), 14379-14388. doi:10.1074/jbc.M609857200
- Martinez-Estrada, O. M., Lettice, L. A., Essafi, A., Guadix, J. A., Slight, J., Velecela, V., . . . Hastie, N. D. (2010). Wt1 is required for cardiovascular progenitor cell formation through transcriptional control of Snail and E-cadherin. *Nat Genet*, 42(1), 89-93. doi:10.1038/ng.494
- Masserot, C., Liu, Q., Nguyen, E., Gattolliat, C. H., Valteau-Couanet, D., Benard, J., . . . Segal-Bendirdjian, E. (2016). WT1 expression is inversely correlated with MYCN amplification or expression and associated with poor survival in non-MYCN-amplified neuroblastoma. *Mol Oncol*, 10(2), 240-252. doi:10.1016/j.molonc.2015.09.010
- Matthay, K. K., Maris, J. M., Schleiermacher, G., Nakagawara, A., Mackall, C. L., Diller, L. & Weiss, W. A. (2016). Neuroblastoma. *Nature Reviews Disease Primers*, 2, 16078. doi:10.1038/nrdp.2016.78
- Matthay, K. K., Maris, J. M., Schleiermacher, G., Nakagawara, A., Mackall, C. L., Diller, L. & Weiss, W. A. (2016). Neuroblastoma. *Nat Rev Dis Primers*, 2, 16078. doi:10.1038/nrdp.2016.78
- McConnell, M. J., Cunliffe, H. E., Chua, L. J., Ward, T. A. & Eccles, M. R. (1997). Differential regulation of the human Wilms tumour suppressor gene (WT1) promoter by two isoforms of PAX2. *Oncogene*, 14(22), 2689-2700. doi:10.1038/sj.onc.1201114

- Menssen, H. D., Bertelmann, E., Bartelt, S., Schmidt, R. A., Pecher, G., Schramm, K. & Thiel, E. (2000). Wilms' tumor gene (WT1) expression in lung cancer, colon cancer and glioblastoma cell lines compared to freshly isolated tumor specimens. *J Cancer Res Clin Oncol*, 126(4), 226-232. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10782896>
- Miwa, H., Beran, M. & Saunders, G. F. (1992). Expression of the Wilms' tumor gene (WT1) in human leukemias. *Leukemia*, 6(5), 405-409. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1317488>
- Miyamoto, Y., Taniguchi, H., Hamel, F., Silversides, D. W. & Viger, R. S. (2008). A GATA4/WT1 cooperation regulates transcription of genes required for mammalian sex determination and differentiation. *BMC Mol Biol*, 9, 44. doi:10.1186/1471-2199-9-44
- Miyoshi, Y., Ando, A., Egawa, C., Taguchi, T., Tamaki, Y., Tamaki, H., . . . Noguchi, S. (2002). High expression of Wilms' tumor suppressor gene predicts poor prognosis in breast cancer patients. *Clin Cancer Res*, 8(5), 1167-1171. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12006533>
- Mohlin, S., von Stedingk, K., Pietras, A. & Pahlman, S. (2017). No reason to reconsider HIF-2 as an oncogene in neuroblastoma and other cancer forms. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114(51), E10856-E10858. doi:10.1073/pnas.1716644115
- Mole, D. R., Blancher, C., Copley, R. R., Pollard, P. J., Gleadle, J. M., Ragoussis, J. & Ratcliffe, P. J. (2009). Genome-wide association of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-2alpha DNA binding with expression profiling of hypoxia-inducible transcripts. *J Biol Chem*, 284(25), 16767-16775. doi:10.1074/jbc.M901790200
- Molenaar, J. J., Koster, J., Zwijnenburg, D. A., van Sluis, P., Valentijn, L. J., van der Ploeg, I., . . . Versteeg, R. (2012). Sequencing of neuroblastoma identifies chromothripsis and defects in neuritogenesis genes. *Nature*, 483(7391), 589-593. doi:10.1038/nature10910
- Monclair, T., Brodeur, G. M., Ambros, P. F., Brisse, H. J., Cecchetto, G., Holmes, K., . . . Force, I. T. (2009). The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) staging system: an INRG Task Force report. *J Clin Oncol*, 27(2), 298-303. doi:10.1200/JCO.2008.16.6876

- Moore, A. W., McInnes, L., Kreidberg, J., Hastie, N. D. & Schedl, A. (1999). YAC complementation shows a requirement for Wt1 in the development of epicardium, adrenal gland and throughout nephrogenesis. *Development*, 126(9), 1845-1857. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10101119>
- Moore, A. W., Schedl, A., McInnes, L., Doyle, M., Hecksher-Sorensen, J. & Hastie, N. D. (1998). YAC transgenic analysis reveals Wilms' tumour 1 gene activity in the proliferating coelomic epithelium, developing diaphragm and limb. *Mech Dev*, 79(1-2), 169-184. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10349631>
- Nakatsuka, S., Oji, Y., Horiuchi, T., Kanda, T., Kitagawa, M., Takeuchi, T., . . . Aozasa, K. (2006). Immunohistochemical detection of WT1 protein in a variety of cancer cells. *Mod Pathol*, 19(6), 804-814. doi:10.1038/modpathol.3800588
- Naumova, N., Smith, E. M., Zhan, Y. & Dekker, J. (2012). Analysis of long-range chromatin interactions using Chromosome Conformation Capture. *Methods*, 58(3), 192-203. doi:10.1016/j.ymeth.2012.07.022
- Nichols, K. E., Re, G. G., Yan, Y. X., Garvin, A. J. & Haber, D. A. (1995). WT1 induces expression of insulin-like growth factor 2 in Wilms' tumor cells. *Cancer Res*, 55(20), 4540-4543. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7553624>
- Nishida, S. & Sugiyama, H. (2016). Immunotherapy Targeting WT1: Designing a Protocol for WT1 Peptide-Based Cancer Vaccine. *Methods Mol Biol*, 1467, 221-232. doi:10.1007/978-1-4939-4023-3\_19
- Pahlman, S. & Mohlin, S. (2018). Hypoxia and hypoxia-inducible factors in neuroblastoma. *Cell Tissue Res*, 372(2), 269-275. doi:10.1007/s00441-017-2701-1
- Paul, C. D., Mistriotis, P. & Konstantopoulos, K. (2017). Cancer cell motility: lessons from migration in confined spaces. *Nat Rev Cancer*, 17(2), 131-140. doi:10.1038/nrc.2016.123
- Pelletier, J., Schalling, M., Buckler, A. J., Rogers, A., Haber, D. A. & Housman, D. (1991). Expression of the Wilms' tumor gene WT1 in the murine urogenital system. *Genes Dev*, 5(8), 1345-1356. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1651275>

- Pietras, A., Hansford, L. M., Johnsson, A. S., Bridges, E., Sjolund, J., Gisselsson, D., . . . Pahlman, S. (2009). HIF-2alpha maintains an undifferentiated state in neural crest-like human neuroblastoma tumor-initiating cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *106*(39), 16805-16810. doi:10.1073/pnas.0904606106
- Pritchard-Jones, K., Fleming, S., Davidson, D., Bickmore, W., Porteous, D., Gosden, C., . . . et al. (1990). The candidate Wilms' tumour gene is involved in genitourinary development. *Nature*, *346*(6280), 194-197. doi:10.1038/346194a0
- Pugh, C. W. & Ratcliffe, P. J. (2017). New horizons in hypoxia signaling pathways. *Exp Cell Res*, *356*(2), 116-121. doi:10.1016/j.yexcr.2017.03.008
- Pugh, T. J., Morozova, O., Attiyeh, E. F., Asgharzadeh, S., Wei, J. S., Auclair, D., . . . Maris, J. M. (2013). The genetic landscape of high-risk neuroblastoma. *Nat Genet*, *45*(3), 279-284. doi:10.1038/ng.2529
- Qi, X. W., Zhang, F., Wu, H., Liu, J. L., Zong, B. G., Xu, C. & Jiang, J. (2015). Wilms' tumor 1 (WT1) expression and prognosis in solid cancer patients: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep*, *5*, 8924. doi:10.1038/srep08924
- Qi, X. W., Zhang, F., Yang, X. H., Fan, L. J., Zhang, Y., Liang, Y., . . . Jiang, J. (2012). High Wilms' tumor 1 mRNA expression correlates with basal-like and ERBB2 molecular subtypes and poor prognosis of breast cancer. *Oncol Rep*, *28*(4), 1231-1236. doi:10.3892/or.2012.1906
- Ran, F. A., Hsu, P. D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D. A. & Zhang, F. (2013). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc*, *8*(11), 2281-2308. doi:10.1038/nprot.2013.143
- Ratcliffe, P. J. (2007). HIF-1 and HIF-2: working alone or together in hypoxia? *J Clin Invest*, *117*(4), 862-865. doi:10.1172/JCI31750
- Ratcliffe, P. J. (2013). Oxygen sensing and hypoxia signalling pathways in animals: the implications of physiology for cancer. *J Physiol*, *591*(8), 2027-2042. doi:10.1113/jphysiol.2013.251470
- Rauscher, J., Beschoner, R., Gierke, M., Bisdas, S., Braun, C., Ebner, F. H. & Schittenhelm, J. (2014). WT1 expression increases with malignancy and indicates unfavourable outcome in astrocytoma. *J Clin Pathol*, *67*(7), 556-561. doi:10.1136/jclinpath-2013-202114
- Ravi, R., Mookerjee, B., Bhujwala, Z. M., Sutter, C. H., Artemov, D., Zeng, Q., . . . Bedi, A. (2000). Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced

- degradation of hypoxia-inducible factor 1alpha. *Genes Dev*, 14(1), 34-44.  
Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10640274>
- Rosenbloom, K. R., Dreszer, T. R., Pheasant, M., Barber, G. P., Meyer, L. R., Pohl, A., . . . Kent, W. J. (2010). ENCODE whole-genome data in the UCSC Genome Browser. *Nucleic Acids Res*, 38(Database issue), D620-625.  
doi:10.1093/nar/gkp961
- Rossler, J., Stolze, I., Frede, S., Freitag, P., Schweigerer, L., Havers, W. & Fandrey, J. (2004). Hypoxia-induced erythropoietin expression in human neuroblastoma requires a methylation free HIF-1 binding site. *J Cell Biochem*, 93(1), 153-161.  
doi:10.1002/jcb.20133
- Ruiz-Perez, M. V., Henley, A. B. & Arsenian-Henriksson, M. (2017). The MYCN Protein in Health and Disease. *Genes (Basel)*, 8(4).  
doi:10.3390/genes8040113
- Rupprecht, H. D., Drummond, I. A., Madden, S. L., Rauscher, F. J., 3rd & Sukhatme, V. P. (1994). The Wilms' tumor suppressor gene WT1 is negatively autoregulated. *J Biol Chem*, 269(8), 6198-6206. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8119964>
- Schito, L. & Semenza, G. L. (2016). Hypoxia-Inducible Factors: Master Regulators of Cancer Progression. *Trends Cancer*, 2(12), 758-770.  
doi:10.1016/j.trecan.2016.10.016
- Schodel, J., Oikonomopoulos, S., Ragoussis, J., Pugh, C. W., Ratcliffe, P. J. & Mole, D. R. (2011). High-resolution genome-wide mapping of HIF-binding sites by ChIP-seq. *Blood*, 117(23), e207-217. doi:10.1182/blood-2010-10-314427
- Scholz, H. & Kirschner, K. M. (2005). A role for the Wilms' tumor protein WT1 in organ development. *Physiology (Bethesda)*, 20, 54-59.  
doi:10.1152/physiol.00048.2004
- Schorg, A., Santambrogio, S., Platt, J. L., Schodel, J., Lindenmeyer, M. T., Cohen, C. D., . . . Hoogewijs, D. (2015). Destruction of a distal hypoxia response element abolishes trans-activation of the PAG1 gene mediated by HIF-independent chromatin looping. *Nucleic Acids Res*, 43(12), 5810-5823.  
doi:10.1093/nar/gkv506
- Semenza, G. L. (2012a). Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell*, 148(3), 399-408. doi:10.1016/j.cell.2012.01.021

- Semenza, G. L. (2012b). Hypoxia-inducible factors: mediators of cancer progression and targets for cancer therapy. *Trends Pharmacol Sci*, 33(4), 207-214. doi:10.1016/j.tips.2012.01.005
- Semenza, G. L. (2014). Oxygen sensing, hypoxia-inducible factors, and disease pathophysiology. *Annu Rev Pathol*, 9, 47-71. doi:10.1146/annurev-pathol-012513-104720
- Semenza, G. L. & Wang, G. L. (1992). A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol*, 12(12), 5447-5454. doi:10.1128/mcb.12.12.5447
- Sera, T., Hiasa, Y., Mashiba, T., Tokumoto, Y., Hirooka, M., Konishi, I., . . . Onji, M. (2008). Wilms' tumour 1 gene expression is increased in hepatocellular carcinoma and associated with poor prognosis. *Eur J Cancer*, 44(4), 600-608. doi:10.1016/j.ejca.2008.01.008
- Sotobori, T., Ueda, T., Oji, Y., Naka, N., Araki, N., Myoui, A., . . . Yoshikawa, H. (2006). Prognostic significance of Wilms tumor gene (WT1) mRNA expression in soft tissue sarcoma. *Cancer*, 106(10), 2233-2240. doi:10.1002/cncr.21861
- Stark, K., Vainio, S., Vassileva, G. & McMahon, A. P. (1994). Epithelial transformation of metanephric mesenchyme in the developing kidney regulated by Wnt-4. *Nature*, 372(6507), 679-683. doi:10.1038/372679a0
- Stoll, R., Lee, B. M., Debler, E. W., Laity, J. H., Wilson, I. A., Dyson, H. J. & Wright, P. E. (2007). Structure of the Wilms tumor suppressor protein zinc finger domain bound to DNA. *J Mol Biol*, 372(5), 1227-1245. doi:10.1016/j.jmb.2007.07.017
- Stolze, I., Berchner-Pfannschmidt, U., Freitag, P., Wotzlaw, C., Rossler, J., Frede, S., . . . Fandrey, J. (2002). Hypoxia-inducible erythropoietin gene expression in human neuroblastoma cells. *Blood*, 100(7), 2623-2628. doi:10.1182/blood-2001-12-0169
- Stoscheck, C. M. (1990). Quantitation of protein. *Methods Enzymol*, 182, 50-68. doi:10.1016/0076-6879(90)82008-p
- Tatsumi, N., Oji, Y., Tsuji, N., Tsuda, A., Higashio, M., Aoyagi, S., . . . Sugiyama, H. (2008). Wilms' tumor gene WT1-shRNA as a potent apoptosis-inducing agent for solid tumors. *Int J Oncol*, 32(3), 701-711. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18292948>

- Thompson, D., Vo, K. T., London, W. B., Fischer, M., Ambros, P. F., Nakagawara, A., . . . DuBois, S. G. (2016). Identification of patient subgroups with markedly disparate rates of MYCN amplification in neuroblastoma: A report from the International Neuroblastoma Risk Group project. *Cancer*, *122*(6), 935-945. doi:10.1002/cncr.29848
- Toska, E. & Roberts, S. G. (2014). Mechanisms of transcriptional regulation by WT1 (Wilms' tumour 1). *Biochem J*, *461*(1), 15-32. doi:10.1042/BJ20131587
- van den Beucken, T., Koritzinsky, M., Niessen, H., Dubois, L., Savelkoul, K., Mujcic, H., . . . Wouters, B. G. (2009). Hypoxia-induced expression of carbonic anhydrase 9 is dependent on the unfolded protein response. *J Biol Chem*, *284*(36), 24204-24212. doi:10.1074/jbc.M109.006510
- Van Driessche, A., Berneman, Z. N. & Van Tendeloo, V. F. (2012). Active specific immunotherapy targeting the Wilms' tumor protein 1 (WT1) for patients with hematological malignancies and solid tumors: lessons from early clinical trials. *Oncologist*, *17*(2), 250-259. doi:10.1634/theoncologist.2011-0240
- Van Tendeloo, V. F., Van de Velde, A., Van Driessche, A., Cools, N., Anguille, S., Ladell, K., . . . Berneman, Z. N. (2010). Induction of complete and molecular remissions in acute myeloid leukemia by Wilms' tumor 1 antigen-targeted dendritic cell vaccination. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *107*(31), 13824-13829. doi:10.1073/pnas.1008051107
- Vaupel, P. (2004). The role of hypoxia-induced factors in tumor progression. *Oncologist*, *9 Suppl 5*, 10-17. doi:10.1634/theoncologist.9-90005-10
- Wagner, K. D., Wagner, N., Bondke, A., Nafz, B., Flemming, B., Theres, H. & Scholz, H. (2002). The Wilms' tumor suppressor Wt1 is expressed in the coronary vasculature after myocardial infarction. *FASEB J*, *16*(9), 1117-1119. doi:10.1096/fj.01-0986fje
- Wagner, K. D., Wagner, N., Vidal, V. P., Schley, G., Wilhelm, D., Schedl, A., . . . Scholz, H. (2002). The Wilms' tumor gene Wt1 is required for normal development of the retina. *EMBO J*, *21*(6), 1398-1405. doi:10.1093/emboj/21.6.1398
- Wagner, K. D., Wagner, N., Wellmann, S., Schley, G., Bondke, A., Theres, H. & Scholz, H. (2003). Oxygen-regulated expression of the Wilms' tumor suppressor Wt1 involves hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *FASEB J*, *17*(10), 1364-1366. doi:10.1096/fj.02-1065fje

- Wagner, N., Wagner, K. D., Hammes, A., Kirschner, K. M., Vidal, V. P., Schedl, A. & Scholz, H. (2005). A splice variant of the Wilms' tumour suppressor Wt1 is required for normal development of the olfactory system. *Development*, 132(6), 1327-1336. doi:10.1242/dev.01682
- Wagner, N., Wagner, K. D., Theres, H., Englert, C., Schedl, A. & Scholz, H. (2005). Coronary vessel development requires activation of the TrkB neurotrophin receptor by the Wilms' tumor transcription factor Wt1. *Genes Dev*, 19(21), 2631-2642. doi:10.1101/gad.346405
- Wang, G. L., Jiang, B. H., Rue, E. A. & Semenza, G. L. (1995). Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(12), 5510-5514. doi:10.1073/pnas.92.12.5510
- Wang, G. L. & Semenza, G. L. (1995). Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem*, 270(3), 1230-1237. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7836384>
- Wang, X., Gao, P., Lin, F., Long, M., Weng, Y., Ouyang, Y., . . . Dong, K. (2013). Wilms' tumour suppressor gene 1 (WT1) is involved in the carcinogenesis of Lung cancer through interaction with PI3K/Akt pathway. *Cancer Cell Int*, 13(1), 114. doi:10.1186/1475-2867-13-114
- Warnecke, C., Zaborowska, Z., Kurreck, J., Erdmann, V. A., Frei, U., Wiesener, M. & Eckardt, K. U. (2004). Differentiating the functional role of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-2alpha (EPAS-1) by the use of RNA interference: erythropoietin is a HIF-2alpha target gene in Hep3B and Kelly cells. *FASEB J*, 18(12), 1462-1464. doi:10.1096/fj.04-1640fje
- Wenger, R. H., Stiehl, D. P. & Camenisch, G. (2005). Integration of oxygen signaling at the consensus HRE. *Sci STKE*, 2005(306), re12. doi:10.1126/stke.3062005re12
- Xu, R., Wang, K., Rizzi, J. P., Huang, H., Grina, J. A., Schlachter, S. T., . . . Wallace, E. M. (2019). 3-[(1S,2S,3R)-2,3-Difluoro-1-hydroxy-7-methylsulfonylindan-4-yl]oxy-5-fluorobenzo nitrile (PT2977), a Hypoxia-Inducible Factor 2alpha (HIF-2alpha) Inhibitor for the Treatment of Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *J Med Chem*, 62(15), 6876-6893. doi:10.1021/acs.jmedchem.9b00719

- Yatabe, N., Kyo, S., Maida, Y., Nishi, H., Nakamura, M., Kanaya, T., . . . Inoue, M. (2004). HIF-1-mediated activation of telomerase in cervical cancer cells. *Oncogene*, 23(20), 3708-3715. doi:10.1038/sj.onc.1207460
- Zhang, H., Pu, J., Qi, T., Qi, M., Yang, C., Li, S., . . . Tong, Q. (2014). MicroRNA-145 inhibits the growth, invasion, metastasis and angiogenesis of neuroblastoma cells through targeting hypoxia-inducible factor 2 alpha. *Oncogene*, 33(3), 387-397. doi:10.1038/onc.2012.574
- Zhang, X., Xing, G., Fraizer, G. C. & Saunders, G. F. (1997). Transactivation of an intronic hematopoietic-specific enhancer of the human Wilms' tumor 1 gene by GATA-1 and c-Myb. *J Biol Chem*, 272(46), 29272-29280. doi:10.1074/jbc.272.46.29272
- Zhong, H., Chiles, K., Feldser, D., Laughner, E., Hanrahan, C., Georgescu, M. M., . . . Semenza, G. L. (2000). Modulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics. *Cancer Res*, 60(6), 1541-1545. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10749120>

## Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Lorenzo Catanese, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Sauerstoffabhängige Regulation des Wilms-Tumor Gens WT1 in Neuroblastomzellen“ 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.“

09.04.2021

Datum

Unterschrift

## Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Lorenzo Catanese hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Krueger, K., Catanese, L., Sciesielski, L.K., Kirschner, K.M., Scholz, H.:  
Deletion of an intronic HIF-2 $\alpha$  binding site suppresses hypoxia-induced WT1 expression.  
BBA-Gene Regul Mech. 2019;1862(1):71-83.  
Pubmed: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30468780?dopt=Citation>  
DOI: 10.1016/j.bbagr.2018.11.003

Beitrag im Einzelnen:

Herr Catanese war als Doktorand der Arbeitsgruppe über mehrere Jahre an der Planung, Durchführung und Auswertung der Experimente beteiligt. Insbesondere Abbildungen 1, 2 und 3 der Originalarbeit sind hauptsächlich auf seine Tätigkeiten im Labor zurückzuführen. Auch an den Experimenten, die den Abbildungen 4 und 6 zugrunde liegen war er aktiv beteiligt. Am Verfassen des Manuskripts, insbesondere des Methodenteils, hat Herr Catanese in verschiedenen Entwurfsstadien

bis zur Publikationsreife mitgewirkt.

Publikation 2: Krueger K, Catanese L, Scholz H: Intermittent hypoxia: friend and foe. Acta Physiol (Oxf). 226(2):e13276, 2019.

Beitrag im Einzelnen (bitte detailliert ausführen):

Herr Catanese hat zur inhaltlichen Konzeption des Editorials beigetragen und diverse Manuskriptentwürfe kritisch überarbeite.

---

Unterschrift, Datum und Stempel des erstbetreuenden Hochschullehrers

---

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

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







## Publikationsliste

### Journalbeitrag

Krueger, K., Catanese, L., Sciesielski, L.K., Kirschner, K.M., Scholz, H.:  
Deletion of an intronic HIF-2 $\alpha$  binding site suppresses hypoxia-induced WT1  
expression.

BBA-Gene Regul Mech. 2019;1862(1):71-83.

Pubmed: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30468780?dopt=Citation>

DOI: 10.1016/j.bbagr.2018.11.003

### Journalbeitrag

Krueger, K., Catanese, L., Scholz, H.:

Intermittent hypoxia: Friend and foe.

Acta Physiol. 2019;226(2): e13276.

Pubmed: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30892796?dopt=Citation>

DOI: 10.1111/apha.13276

## **Danksagung**

Die vorliegende Dissertation und die zugrunde liegende wissenschaftliche Arbeit wurde im Labor von Prof. Dr. Holger Scholz in der Abteilung Zelluläre Entwicklungsphysiologie und Pathophysiologie am Institut für Vegetative Physiologie der Charité - Universitätsmedizin Berlin durchgeführt.

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. Scholz herzlich für die Erarbeitung des Themas und die wissenschaftliche Betreuung bedanken. Lieber Holger, ich möchte dir danken, dass Du mich gefordert und gefördert hast, dass Du immer ein offenes Ohr für meine Anliegen hattest und dass ich mich in Deiner Arbeitsgruppe durch die freundliche und familiäre Gemeinschaft immer wohl gefühlt habe.

Insbesondere möchte ich mich auch bei Frau Dr. Katharina Krueger bedanken für die Zusammenarbeit, die ausgezeichnete Betreuung und das Teilen von Erfahrungen im Labor und die kritische Diskussion unserer Ideen, die schließlich in der gemeinsamen Publikation Früchte tragen konnte.

Ich möchte mich bei Frau Dr. Anja Bondke Persson bedanken für die herzliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Scholz, für die wissenschaftliche Unterstützung und das Mentoring, insbesondere bei Fragen der Nachwuchsförderung und Karriereplanung.

Bei Frau Dr. Karin Kirschner und Frau Dr. Lina Lina Sciesielski möchte ich mich für die vielen lehrreichen Gespräche über fachspezifische Themen und über das Leben als lehrende und forschende Person bedanken.

Bei Frau Ulrike Neumann möchte ich mich für die ausgezeichnete technische Unterstützung bei praktischen Laborarbeiten bedanken, aber auch für den freundschaftlichen Laboralltag. Liebe Ulrike, vielen Dank für all die lustigen und schönen Gespräche selbst beim Pipettenspitzenstecken.

Ganz besonders danke ich dem Berlin Institute of Health für die Unterstützung der Promotion im Rahmen eines einjährigen Promotionsstipendiums.

Ich danke meinen Eltern, die ich über alles liebe und die immer über Ihre wissenschaftlichen Tätigkeiten hinaus meine großen Vorbilder gewesen sind und sein werden.

Vielen Dank an meine Geschwister für ihre Unterstützung in allen Lebenslagen.

Für Claudia und Miquel.