

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

DISSERTATION

**Der Tumorsuppressor Wt1 aktiviert die Transkription des Erythropoietinrezeptors  
in hämatopoietischen Vorläuferzellen**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Patricia Krause  
aus Parchim

Gutachter/in :            1. Prof. Dr. med. Ho. Scholz  
                                 2. Prof. Dr. med. E. Metzen  
                                 3. Prof. Dr. D. M. Katschinski

Datum der Promotion:    18.11.2011

*Meiner Familie*

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Holger Scholz, der mir die Bearbeitung dieses interessanten Themas ermöglichte und mich in das wissenschaftliche Arbeiten einführte. Ich danke ihm für seine stete Betreuung und Unterstützung und vor allem für sein Vertrauen.

Der AG Prof. Christof Dame möchte ich außerdem für die produktive Zusammenarbeit danken.

Prof. Dr. Pontus Persson danke ich für die Ermöglichung meiner Forschungstätigkeit an seinem Institut.

Frau Dr. Karin Kirschner danke ich ausdrücklich für die Einführung in die Laborarbeit, das Lehren vieler Methoden sowie die vielen bereichernden fachlichen und persönlichen Diskussionen. Ein ausführlicher Dank gilt Frau Grätsch und Frau Richter für die produktive Zusammenarbeit und für das außergewöhnlich herzliche Klima in der Arbeitsgruppe. Mein besonderer Dank geht darüber hinaus an Prof. Dr. Scholz, Dr. Karin Kirschner, Dr. T. Krause, Dr. Cornelia Noack und Dr. Stephanie Rudolph, die sich die Zeit genommen haben, die Entwürfe dieser Promotionsschrift zu lesen und kritisch mit mir zu diskutieren.

Und abschließend richte ich meinen herzlichen Dank an meine Familie: Ich danke meinen Eltern für ihre fortwährende Unterstützung im Erreichen all meiner Ziele. Friederike danke ich für die vielen wertvollen kleinen und großen Momente unter Schwestern. Meinem Mann, Thomas Krause, möchte ich neben seiner großen Bereitwilligkeit zur Lektüre und semantischen Kritik dieses Textes insbesondere für seine Liebe und Unterstützung außerhalb der Arbeits- und Forschungswelt und unser schönstes gemeinsames Projekt Elias danken.

## **Publikationen**

Im Rahmen der Dissertation sind die folgenden Veröffentlichungen entstanden:

### **Originalarbeit:**

Karin M. Kirschner, Patricia Hagen, Christine S. Hussels, Matthias Ballmaier, Holger Scholz & Christof Dame. *The Wilms' tumor suppressor Wt1 activates transcription of the erythropoietin receptor in hematopoietic progenitor cells*. The FASEB Journal 22, 2690-2701 (2008).

### **Publizierte Kongressbeiträge (Abstract):**

P. Hagen, K.M. Kirschner, K. Bartz, C. Dame & H. Scholz. *The Wilms' tumor transcription factor Wt1 activates the erythropoietin (EPO) system during hematopoiesis*. 84. Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft (06.-09.03.05, Göttingen, Deutschland)

# Inhaltsverzeichnis

## Danksagung

## Publikationen

<b>1. Einleitung</b>	1
1.1 Der Wilmstumor und das Wt1-Gen	1
1.2 Die Rolle von Wt1 während der Embryogenese	5
1.3 Wt1 und Hämatopoiese.	6
1.4 Regulation und Funktion des Erythropoietin-Rezeptors	9
1.5 Aufgabenstellung	12
<b>2. Material und Methoden</b>	15
2.1 Versuchstiere	15
2.2 Zellkulturexperimente	15
2.2.1 Kultivierung und Passage der Zellen	15
2.2.2 Plasmide	15
2.2.3 Transiente Zelltransfektion.	16
2.2.4 Zellyse und Luziferase-Assays	16
2.3 In vitro Progenitorzellassays und Benzidinfärbung	17
2.4 Isolierung hämatopoietischer Vorläuferzellen	18
2.5 Einfluss von Erythropoietin auf die Proliferation hämatopoietischer Vorläuferzellen der Maus	18
2.6 RNA-Extraktion	18
2.7 Reverse Transkription	19
2.8 Real-time PCR	19
2.9 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Immunoblot	19
2.10 Elektrophorese Mobilitätsshiftassay (EMSA)	20
2.10.1 Oligonukleotid-Annealing	20
2.10.2 Radioaktive Oligonukleotidmarkierung	21
2.10.3 Bindungsreaktionen	21
2.10.4 Gellauf und Detektion	21
2.11 Chromatinimmunpräzipitationsassay (ChIP)	22
2.12 Statistik	22

<b>3. Versuchsergebnisse</b>	30
3.1 Leberzellen aus Wt1-defizienten Mausembryonen (Wt1 <sup>-/-</sup> ) besitzen ein reduziertes erythroides Differenzierungspotential	30
3.2 <i>EpoR</i> -mRNA ist in CD117-positiven Progenitorzellen aus der fetalen Mausleber vermindert	32
3.3 Wt1-defiziente hämatopoietische Progenitorzellen zeigen eine verminderte Proliferation nach Stimulation mit rekombinantem Erythropoietin (rhEpo)	33
3.4 Wt1 und EpoR werden in CD117-positiven fetalen Leberzellen und hämatopoietischen Zelllinien koexprimiert	35
3.5 Transiente Expression von Wt1(-KTS) stimuliert die EpoR-mRNA-Expression in menschlichen Hepatomzellen (HepG2)	37
3.6 Wt1 bindet <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> an den <i>EpoR</i> -Promotor.	39
3.7 Das Wt1(-KTS)-Protein aktiviert den <i>EpoR</i> -Promotor	43
<b>4. Diskussion</b>	45
4.1 Bedeutung von Wt1 für die Hämatopoese	45
4.2 Wt1 in Leukämiezelllinien und Leukämien	45
4.3 Rolle von Erythropoietin in der Hämatopoese	48
4.4 Klinischer Einsatz von Epo / Rolle von Epo in der Kardio- und Neuroprotektion	49
4.5 Regulation des <i>EpoR</i> -Gens durch Wt1	51
<b>5. Zusammenfassung</b>	56
<b>6. Summary</b>	58
<b>7. Literaturverzeichnis</b>	60
<b>8. Abkürzungsverzeichnis</b>	79
<b>9. Lebenslauf</b>	85
<b>10. Eidesstattliche Erklärung</b>	86

## 1. Einleitung

### 1.1 Der Wilmstumor und das Wt1-Gen

Wilmstumoren (Nephroblastome) sind maligne Tumoren der Nieren. Sie stehen beispielhaft für embryonale Malignome, die infolge einer fehlgeleiteten Organentwicklung auftreten können. Nephroblastome werden zumeist um das fünfte Lebensjahr diagnostiziert und zählen mit einer Häufigkeit von 1:10.000 Geburten zu den häufigsten soliden Tumoren des Kindesalters (Matsunaga et al., 1981). Sie entwickeln sich wahrscheinlich aus postnatal persistierenden Foci pluripotenter Nierenzellen, den sogenannten nephrogenen Resten, die im gesunden Nierengewebe von Nephroblastompatienten gehäuft vorkommen. Anstatt zu normalem Nierenepithel zu differenzieren, proliferieren die nephrogenen Gewebereste und bilden somit den Ausgangspunkt für das maligne Tumorwachstum (für eine Übersicht siehe Haber et al. 1991). Mutationen eines auf dem kurzen Arm von Chromosom 11 (11p13) lokalisierten Gens sind für etwa 10% der Wilmstumoren verantwortlich. Das an dieser Stelle lokalisierte Wilmstumorgen, Wt1, wurde aufgrund genetischer Analysen von Patienten mit Wilmstumor-assoziierten Fehlbildungen als ein Tumorsuppressorgen identifiziert. Tumorsuppressorgene kodieren Proteine, die normalerweise das Wachstum maligner Tumoren unterdrücken. Nach der von Knudson (Knudson et al., 1975) formulierten sogenannten „two-hit hypothesis“ können Tumoren bei Inaktivierung *beider* Allele eines Tumorsuppressorgens entstehen. Die Weitergabe eines Monoallel-Gendefektes durch einen Elternteil bedeutet für die Nachkommenschaft ein erhöhtes Tumorrisiko und ist, vermutlich aufgrund einer während der kritischen Entwicklungsphase reduzierten Gendosis, gelegentlich mit urogenitalen Fehlbildungen verbunden (Haber et al., 1990; Huff et al., 1991).

Das Wt1-Gen umfasst ca. 50.000 Basenpaare und besteht aus zehn Exons. Es kodiert ein ca. 52 kDa Protein, das vier C-terminale Zinkfinger der Cys2His2-Klasse als DNA-Bindungsdomäne enthält. Der N-Terminus des Wt1-Proteins ist reich an Prolin- und Glutaminresten und besitzt trans-regulatorische Aktivität (Haber et al., 1991; Englert et al., 1995). Transkriptionsfaktoren binden an bestimmte DNA-Sequenzen in Zielgenen, sogenannte *cis-acting elements*, und steuern über eine Zu- bzw. Abnahme der Transkriptionsrate die Expression dieser Gene. Der Wt1-Transkriptionsfaktor bindet mit

## 1. Einleitung

seiner Zinkfingerdomäne, die Homologie zu derjenigen der *Early-Growth-Response* (EGR)-Gene 1 und 2 aufweist, an GC- und TC-reiche DNA-Sequenzen. Gene, die durch Wt1 reguliert werden, kodieren u.a. Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren, Zellzyklusregulatoren und Zelladhäsionsmoleküle.

**Tabelle 1: Wt1-Zielgene**

Gen	Referenz
<i>Wachstumsfaktorengene</i>	
IGF-II	Drummond et al., 1992; Duarte et al., 1998; Madden et al., 1991; Nichols et al., 1995; Ward et al., 1995
PDGF-A	Gashler et al., 1992; Wang et al., 1992, 1993a,b,1995a
CSF-1	Harrington et al., 1993
TGF- $\beta$	Dey et al., 1994
Amphiregulin	Lee et al., 1999
Inhibin- $\alpha$	Hsu et al., 1995
Midkine	Adachi et al., 1996
MIS	Nachtigal et al., 1998
CTGF	Stanhope-Baker & Williams, 2000
<i>Wachstumsfaktor-Rezeptorgene</i>	
InsulinR	Wang et al., 1993b; Webster et al., 1997
IGF-1R	Tajina et al., 1999; Werner et al., 1993, 1994, 1995
EGFR	Englert et al., 1995a,b; Wang et al., 1993b; Liu et al. 2001
RAR- $\alpha$	Goodyer et al., 1995
<i>Transkriptionsfaktorengene</i>	
FREAC-4	Ernstsson et al., 1996
EGR-1	Madden et al., 1991; Reddy et al., 1995a
Wt1	Hewitt et al., 1996; Hofmann et al., 1993; Malik et al., 1994; Rupprecht et al., 1994
c-Myb	McCann et al., 1995
c-Myc	Hewitt et al., 1995; Wang et al. 1993b
N-Myc	Zhang et al., 1999

## 1. Einleitung

### Fortsetzung Tabelle 1: Wt1-Zielgene

Pax2	Ryan et al., 1995
Dax-1	Kim et al., 1999
Sry	Hossain & Saunders, 2001
<i>Gene, die extrazelluläre bzw. sezernierte Protein kodieren</i>	
Syndekan-1	Cook et al., 1996
Thrombospondin 1	Dejong et al., 1999
NovH	Martinerie et al., 1996
E-cadherin	Hosono et al. 2000
<i>Andere</i>	
Gα <sub>i2</sub>	Kinane et al., 1996
ODC	Moshier et al., 1996
MDR-1	McCoy et al., 1999
Hsp70	Maheswaran et al., 1998
P21	Englert et al., 1997
Bcl-2	Hewitt et al., 1995; Mayo et al. 1999
Cu,Zn-SOD	Minc et al., 1999
RpAp46	Guan et al., 1998
HTERT	Oh et al., 1999
VDR	Maurer et al. 2000; Wagner et al. 2001

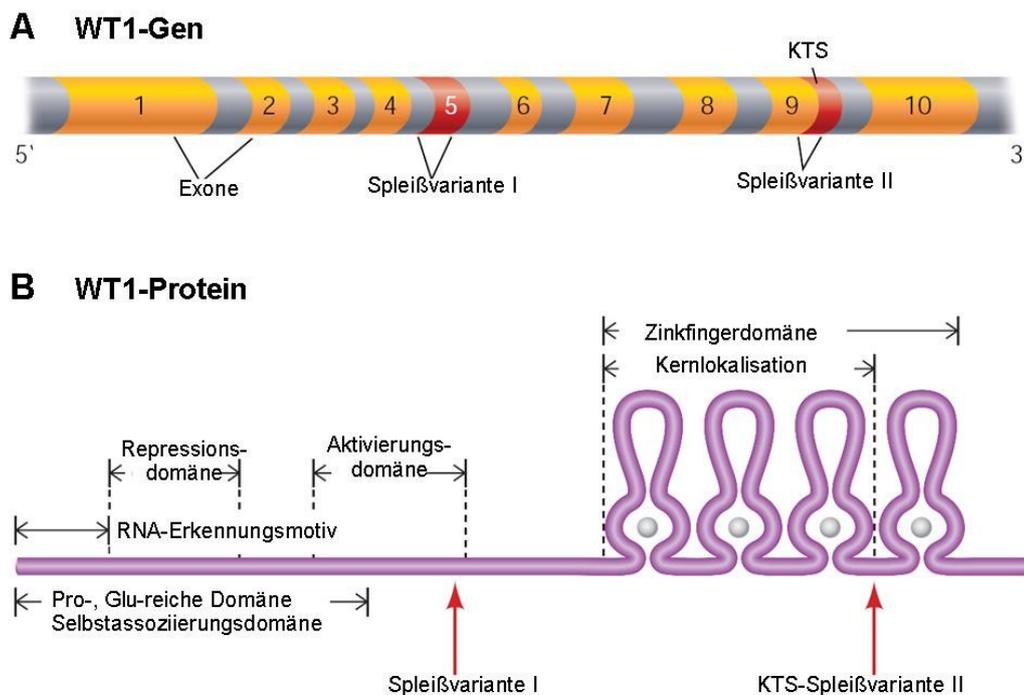
Ursprünglich wurde Wt1 als Bindungsprotein für die GC-reiche EGR-DNA-Erkennungssequenz und als transkriptionaler Repressor identifiziert. Diese Beobachtung, die analog auch für die Transkriptionsaktivität von Promotoren anderer wachstumsvermittelnder Gene wie z.B. dem *Insulin-Like-Growth-Factor (IGF)-2*-Gen gemacht werden konnte, führte zu der Vermutung, dass Wt1 durch Hemmung der Transkription von Wachstumsfaktoren und Wachstumsfaktorrezeptoren als Tumorsuppressor wirksam ist (Madden et al., 1991; Drummond et al., 1992; Gashler et al., 1992; Rauscher et al., 1993; Werner et al., 1994; Englert et al., 1995). Nachfolgende Untersuchungen haben allerdings ergeben, dass Wt1 in den meisten Fällen

## 1. Einleitung

transkriptionsaktivierende Eigenschaften besitzt. Welche Mechanismen im Einzelnen für den unterschiedlichen Einfluss von Wt1 auf die Genexpression verantwortlich sind, ist noch nicht abschließend geklärt. Wahrscheinlich spielen dabei Interaktionen von Wt1 mit anderen intrazellulären Proteinen eine wichtige Rolle. Beispielsweise konnte in transfizierten Zellen gezeigt werden, dass Wt1 mit p53, einem ubiquitär exprimierten anti-Onkoprotein, assoziiert ist. Die Interaktion dieser beiden Proteine beeinflusst wechselseitig deren Funktion (Maheswaran et al, 1993): Die Expression von p53 unterdrückt die transkriptionsaktivierenden Eigenschaften von Wt1, während Wt1 die p53-vermittelte Apoptose verhindert (Maheswaran et al., 1993; Maheswaran et al., 1995).

Die Komplexität der Wt1-Wirkung wird dadurch gesteigert, dass durch alternatives mRNA-Spleißen, die Verwendung alternativer Startcodons sowie durch RNA-Editing mehr als 24 verschiedene Proteinvarianten gebildet werden können (Übersicht bei Hohenstein et al, 2006). Die am besten untersuchten Wt1-Isoformen betreffen vier unterschiedliche Spleißvarianten. Zwei Spleißvarianten werden durch die An- bzw. Abwesenheit von Exon 5 bestimmt, welches für 17 Aminosäuren kodiert, die N-terminal zur Zinkfingerdomäne liegen (Abb. 1). Der durch Exon 5 kodierte Proteinbereich spielt für die Interaktion von Wt1 mit transkriptionalen Kofaktoren eine Rolle (Haber et al, 1991). Zwei weitere Spleißformen entstehen durch die mögliche Insertion von drei zusätzlichen Aminosäuren (Lys-Thr-Ser [KTS]) zwischen dem dritten und vierten Zinkfinger des Wt1-Moleküls (siehe Abb.1; Rauscher et al., 1990; Bickmore et al., 1992). Das KTS-Tripeptid reduziert die Affinität für DNA und bewirkt eine verstärkte RNA-Bindung von Wt1 (Haber et al., 1991; Englert et al., 1995). Während Wt1-Proteine, denen die KTS-Insertion fehlt, als Transkriptionsfaktoren wirksam sind (Englert et al., 1995; Kudoh et al. 1995; Englert et al., 1997; Lee und Haber, 2001), wird den Wt1(+KTS)-Formen eine bislang noch nicht geklärte Rolle beim prä-mRNA-Spleißen zugeschrieben (Larsson et al., 1995). Die verschiedenen Wt1-Spleißvarianten, die in normalen Wt1-exprimierenden Geweben in jeweils konstantem Verhältnis vorkommen, erfüllen teilweise unterschiedliche Funktionen während der Embryonalentwicklung (Hammes und Guo, 2001).

## 1. Einleitung



**Abbildung 1: Organisation des *WT1*-Genorts und Basisstruktur des *WT1*-Proteins.** Das *WT1*-Gen überspannt ca. 50 kBp des menschlichen Chromosoms 11p13 und besteht aus 10 Exons. Besonders interessant sind 2 alternative Spleissvorgänge: Das alternativ gespleisste Exon 5 kodiert 17 Aminosäuren, und der Gebrauch einer Donorstelle für alternatives Spleissen am Ende des Exon 9 führt zur Insertion von 3 Aminosäuren (Lysin-Threonin-Serin, KTS) zwischen den Zinkfingern 3 und 4 des *WT1* Proteins. Während *WT1* (-KTS) - Genprodukte als Transkriptionsregulatoren wirken, spielt die +KTS-Isoform wahrscheinlich eine noch nicht vollständig geklärte Rolle in der posttranskriptionalen mRNA-Prozessierung. Zusätzliche *WT1*-Moleküle entstehen durch alternative Translationsstartpunkte, RNA-Editing und posttranslationale Modifizierung (Abbildung adaptiert nach Scholz und Kirschner, 2005).

### 1.2 Die Rolle von *Wt1* während der Embryogenese

Zusätzlich zu seiner Funktion als Tumorsuppressor ist *Wt1* für die normale Embryonalentwicklung notwendig. Mäuse mit homozygot inaktiviertem *Wt1*-Gen (*Wt1*<sup>-/-</sup>) versterben intrauterin ab Tag E12 post conceptionem. Ursache für die frühe Letalität *Wt1*-defizienter Embryonen ist vermutlich ein partieller Defekt des Epikards, der eine Hypoplasie des Ventrikelmyokards sowie eine Hämorrhagie in den Perikardraum mit Herzinsuffizienz zur Folge hat (Kreidberg et al., 1993; Moore et al., 1999). Die Analyse von *Wt1*<sup>-/-</sup>-Embryonen zeigte, dass *Wt1* für die Entwicklung u. a. der Nieren und Gonaden (Kreidberg et al., 1993), des Mesothels (Kreidberg et al., 1993; Moore et

## 1. Einleitung

al., 1999), der Nebennieren (Moore und McInnes et al., 1999), der Milz (Herzer und Crocoll et al., 1999), des Gefäßsystems von Herz (Wagner et al., 2005) und Darm (Wilm und Ipenberg et al., 2005), der Retina (Wagner et al., 2002) und des Riechepithels (Wagner et al., 2005) erforderlich ist. Mit Ausnahme der neuronalen Vorläuferzellen ist diesen Geweben die Eigenschaft gemeinsam, zwischen einem undifferenzierten mesenchymalen und einem epithelialen Zustand wechseln zu können. Aufgrund des charakteristischen Expressionsmusters von Wt1 im intakten Embryo und wegen der typischen Anomalien Wt1-defizienter Embryonen wurde postuliert, dass Wt1 eine Vermittlerrolle beim mesenchymal-epithelialen Übergang spielt (Moore et al, 1999, Hohenstein et al, 2006). Interessanterweise ist das zelluläre Wt1-Expressionniveau in den meisten Geweben zu frühen Entwicklungszeitpunkten deutlich höher als postnatal bzw. als beim Erwachsenen (Pritchard-Jones et al., 1990; Haber et al., 1991; Ellisen et al., 2001; Lee und Haber et al., 2001). In Geweben, die normalerweise Wt1 exprimieren, wurden bei Wt1-defizienten Embryonen vermehrt apoptotische Zellen nachgewiesen (Kreidberg et al., 1993; Yamagami et al. 1996; Lee, Haber 2001; Wagner et al., 2002; Ito et al., 2006). Diese Befunde deuten darauf hin, dass Wt1 den programmierten Zelltod verhindert und/oder für die Proliferation von Vorläuferzellen in verschiedenen Geweben notwendig ist.

### 1.3 Wt1 und Hämatopoiese

Das hämatopoietische System von Vertebraten ist in der Lage, aus wenigen sich selbst erneuernden Stammzellen Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten zu bilden. Interaktionen zwischen spezifischen Zytokinen und ihren Rezeptoren vermitteln Signale zur Proliferation und Differenzierung der hämatopoietischen Vorläufer. Bei der Maus beginnt die Erythropoiese sieben Tage nach der Befruchtung in Blutinseln im Dottersack - sogenannte *primitive Blutbildung* (Haar et al. 1977; Wu et al. 1999, Palis et al., 1999 & 2001). Die Leber ist das Hauptorgan der Blutbildung von Tag E12 bis E16, und auch zum Zeitpunkt der Geburt gibt es hier noch vereinzelte hämatopoietische Foci (Clapp et al. 1995, Wu et al, 1995). Ab ca. E15 erfolgt die Hämatopoiese zunehmend in Milz und Knochenmark - sogenannte *definitive Blutbildung* (Wu et al., 1995).

Mittels *in vitro*-Kultivierung können unter Verwendung von Methylzellulose erythroide Vorläuferzellen, die sog. *burst-forming unit-erythroid* (BFU-E), gewonnen werden (Abb.

## 1. Einleitung

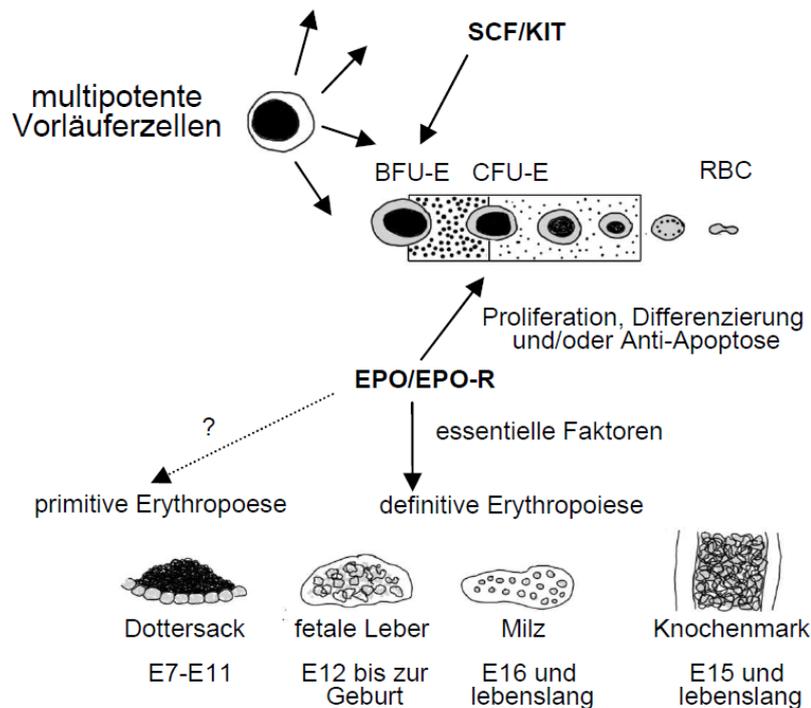
2). Diese reagieren auf den wichtigsten hämatopoietischen Wachstumsfaktor, Erythropoetin (Epo), mit der Ausbildung erythroider Kolonien, den sog. *colony-forming unit-erythroid* (CFU-E). CFU-E bestehen aus Zellen mit hohem Proliferationspotential, die in Anwesenheit geringer Mengen Epo zu Kolonien differenzieren, die Erythroblasten bilden (Gregory et al., 1976; Gregory and Eaves, 1977; Gregory and Eaves, 1978). Im Vergleich zu CFU-E handelt es sich bei den BFU-E um unreifere Zellen, die sich seltener teilen und neben Epo weitere Wachstumsfaktoren wie z.B. Stammzellfaktor (SCF), Interleukine (IL-3, IL-4) und Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierenden Faktor (GM-CSF) benötigen (Emerson et al., 1985). Epo fördert das Wachstum hämatopoietischer Vorläuferzellen, indem es deren programmierten Untergang (Apoptose) verhindert und gleichzeitig die Proliferation und Differenzierung stimuliert. Die Sensitivität der hämatopoietischen Vorläuferzellen gegenüber Epo ist zeitlich begrenzt: Nach dem sog. Stadium der basophilen Erythroblasten sinkt das Expressionsniveau der Epo-Rezeptoren (EpoR) und die Zellen sind für die nachfolgenden Reifungsprozesse von Epo weitgehend unabhängig (Koury und Bondurant, 1988).

Neuere Ergebnisse weisen auf eine Rolle von Wt1 bei der Hämatopoiese hin. Bei Nagetieren wurde Wt1 in verschiedenen blutbildenden Geweben, z. B. im Dottersack, in der Leber und im adulten Knochenmark sowie im peripheren Blut nachgewiesen (Fraizer et al., 1995).

Während der normalen Hämatopoiese des Menschen wird Wt1 hauptsächlich in unreifen CD34<sup>+</sup>-Zellen exprimiert (Baird et al., 1997; Ellisen et al., 2001; Fraizer et al., 1995; Maurer et al., 1997; Maurer et al., 1997; Menssen et al., 1997; Pritchard-Jones et al., 1997; Timens et al., 1997). Nach induzierter *in vitro*-Differenzierung hämatopoietischer (Tumor-)Zellen wurde eine Abnahme der Wt1-Expression festgestellt (Smith et al., 1998; Maurer et al., 1997; Phelan et al., 1994; Sekiya et al. 1994). Hämatopoietische Progenitorzellen, die aus den Lebern Wt1-defizienter Mausembryonen isoliert wurden, zeigten im Vergleich zu Vorläuferzellen aus Wildtyp-Embryonen ein signifikant vermindertes Potential zur Ausbildung von BFU-E, CFU-E und *colony-forming unit-granulocyte* Makrophagen-Erythroiden-Megakaryozyten (CFU-GEMM) (Alberta et al, 2003). Wt1 kommt nicht nur in normalen hämatopoietischen Progenitorzellen vor, sondern wird aufgrund seiner Expression in Leukämiezellen als ein mögliches Onkogen bei bestimmten Leukämieformen diskutiert (Algar et al. 1996;

## 1. Einleitung

Yamagami et al. 1996; Inoue et al., 1998; Svedberg et al., 1998; Tsuboi et al., 1999). Die Hemmung der Wt1-Expression mittels *antisense*-Oligonukleotiden verursachte eine verminderte Proliferation sowie eine gesteigerte Apoptose myeloischer Leukämiezellen (Algar et al., 1996). Da Wt1 in peripheren Blutzellen vieler Patienten mit chronischer Leukämie während der Blastenkrise sowie bei akuten Leukämien (Fraizer et al., 1995) vorkommt, gilt sein Nachweis als Indikator für klinische Rückfälle. In aktuellen klinischen Studien wird der Versuch unternommen, zytotoxische T-Lymphozyten für die gezielte Destruktion Wt1-exprimierender maligner Zellen zu verwenden (Gao et al., 2000; Ohminami et al. 2000; Oka et al., 2000).



**Abbildung 2 : Schema der murinen Erythropoese.** Der Stammzellfaktor SCF und sein Rezeptor KIT sind wichtig für die Proliferation und Differenzierung erythroider Vorläuferzellen vom Stadium der BFU-E zum Stadium der CFU-E. Erythropoietin (Epo) und sein Rezeptor (EpoR) sind essentiell für das Überleben und die irreversible Differenzierung später CFU-E-Vorläuferzellen, für die definitive Erythropoese in der fetalen Leber sowie die Kontrolle der primitiven Erythropoese im Dottersack. Die Abbildung wurde aus Wu H et al. 1995 übernommen und modifiziert.

Die molekularen Mechanismen, über die Wt1 die hämatopoietische Differenzierung reguliert, sind weitgehend unklar. Solche Mechanismen könnten in der direkten Interaktion des Wt1-Transkriptionsfaktors mit Zielgenen in hämatopoietischen

## 1. Einleitung

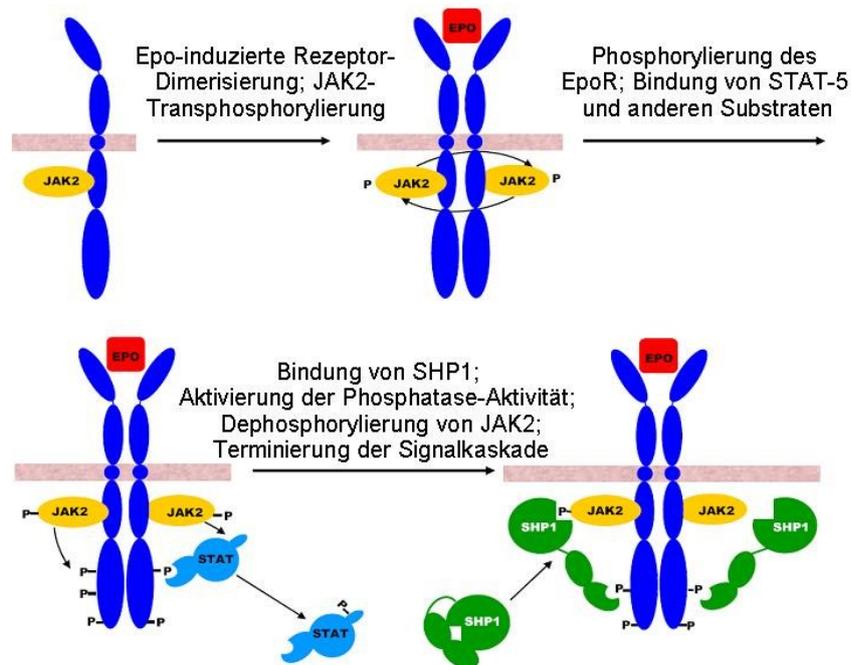
Vorläuferzellen und/oder, wie am Beispiel von *core binding factor* (CBF) und p53 gezeigt, in der Wechselwirkung von Wt1 mit anderen Proteinen ohne unmittelbaren DNA-Kontakt bestehen (Maheswaran et al, 1993; Wang et al, 2001). Neuere Untersuchungen haben ergeben, dass Wt1 die Transkription des Epo-Gens stimuliert und in verschiedenen hämatopoietischen sowie nicht- hämatopoietischen Geweben mit Epo koexprimiert ist (Dame et al., 2006). Es erscheint deshalb plausibel, dass die Rolle von Wt1 bei der Blutbildung zumindest teilweise auf eine Aktivierung der Epo-Synthese zurückzuführen ist. Darüber hinaus weisen frühe erythroide Vorläufer von *Wt1*<sup>-/-</sup>-Mäusen im Vergleich zu normalen (*Wt1*<sup>+/+</sup>-)Zellen eine signifikant reduzierte *in vitro*-Proliferationskapazität auf. Dieser Befund deutet auf einen zelleigenen Defekt hin, der durch die geringere Expression hämatopoietischer Wachstumsfaktorrezeptoren bei *Wt1*-Defizienz verursacht sein könnte (Ellisen et al., 2001). Interessanterweise besitzt das Epo-Rezeptorgen einen GC-reichen Promotor, dessen Basensequenz mehrere *Wt1*-Bindungsstellen enthält, und kommt deshalb als ein potentiell *Wt1*- Zielgen in Frage.

### 1.4 Regulation und Funktion des Erythropoietin-Rezeptors

Die Erythropoietinrezeptoren (EpoR) von Mensch und Maus bestehen aus 508 bzw. 507 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von ca. 60 kDa und gehören zur Klasse I der Zytokinrezeptorfamilie (Abb. 3, Lacombe et al. 1999). Die extrazelluläre N-terminale Domäne enthält zwei konservierte Zysteinpaare sowie ein WSXWS-Motiv (Mulcahy et al., 2001). Letzteres ist nahe der transmembranen Domäne lokalisiert und bildet einen wichtigen Teil der Ligandenbindungsstelle (Mulcahy et al, 2001). Des Weiteren besitzt der EpoR ein singuläres, hydrophobes Transmembransegment sowie eine zytosolische Domäne ohne eigene Enzymaktivität (D'Andrea und Zon, 1990). Jeweils zwei durch die Zellmembran verlaufende EpoR-Proteine bilden ein Homodimer, das ein einziges Epo-Molekül bindet (Abb.3, Wilson et al., 1999). Ligandenbindung bewirkt eine Konformationsänderung des Rezeptordimers, wobei die Aktivierung einer Janus-Tyrosinkinase-2 (JAK2) durch Transphosphorylierung erfolgt (Yoshimura et al., 1996; Philo et al., 1996; Farrell et al., 2004; Richmond et al., 2005). Durch Rekrutierung von Signalproteinen mit SRC-Homologie-2 (SH2)-Domänen erfolgt die Aktivierung

## 1. Einleitung

intrazellulärer Signalwege (Tauchi et al., 1995; Barber et al., 2001), u.a. von Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3-Kinase)/Akt, MAP-Kinase, Proteinkinase C und STAT5 (Klingmüller U, 1997; Yoshimura und Misawa, 1998; Constantinescu et al., 2001). Die JAK2-vermittelte STAT5-Phosphorylierung führt zur Bildung stabiler STAT-Dimere, welche daraufhin in den Zellkern transloziert werden (Mulcahy et al., 2001; Leyland-Jones et al., 2002). Dort binden die STAT-Dimere an eine spezifische Basensequenz in der Promoterregion der Zielgene und initiieren deren Transkription.



**Abbildung 3: Epo-Rezeptor vermittelte Signalaktivierung.** Näheres siehe Text. Die Abbildung wurde aus Wallach 2007 modifiziert nach Constantinescu et al. 1999 übernommen.

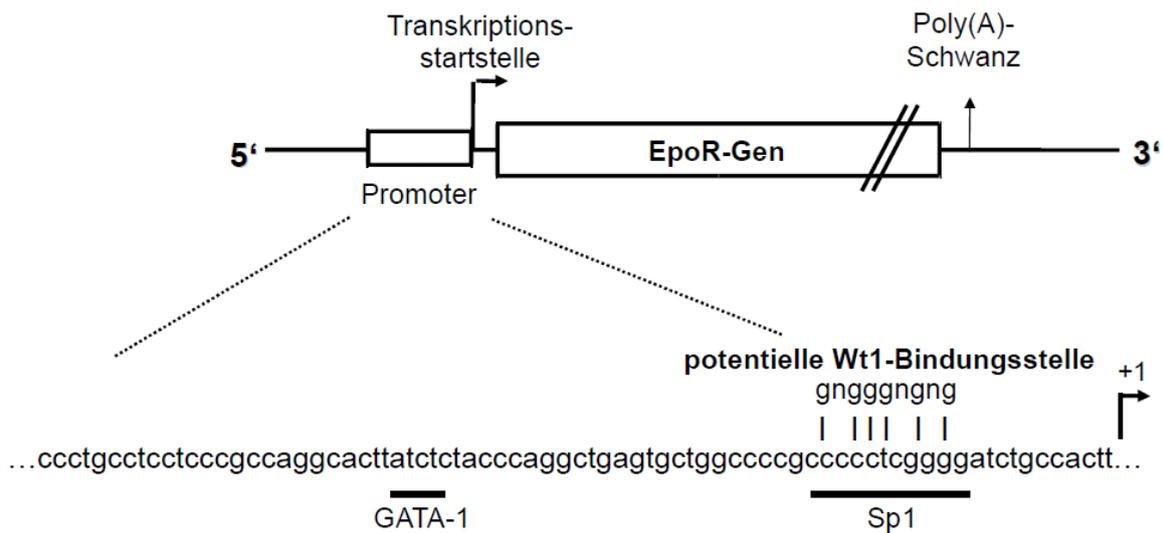
Die Wirkung von Epo am EpoR wird durch eine hämatopoietische Zellphosphatase (SHP1) beendet, die eine JAK-2-Dephosphorylierung vermittelt (Yi et al., 1995; Klingmüller et al., 1995). Hieraus erklärt sich, dass Mutationen im Bereich der SHP1-Bindungsstelle aufgrund einer ausbleibenden EpoR-Inaktivierung sich klinisch in einer Polyzythämie manifestieren können (Mulcahy et al. 2001; de la Chapelle et al., 1993). Normalerweise wird der inaktivierte Epo/EpoR-Komplex internalisiert und dem Abbau durch das Proteasom zugeführt. Ein Teil (ca. 60%) des intrazellulär aufgenommenen Epo entgeht der Degradation und wird erneut sezerniert (Gross und Lodish 2006).

## 1. Einleitung

Die Expression des EpoR erfolgt bereits in frühen Stadien der erythroiden Entwicklung und nimmt mit fortschreitender Differenzierung der BFU-E in CFU-E zu (Sawada et al., 1990; Sawyer et al., 1987). Weiterhin wird EpoR auch auf nicht-hämatopoietischen Zellen, u. a. auf Endothelzellen (Anagnostou et al., 1990 und 1994; Noguchi et al., 2004), neuronalen Zellen (Brines et al., 2000; Masuda et al., 1993; Dame et al., 2001), Nierenzellen, Herzmuskelzellen und Lungenzellen exprimiert (Lappin T. et al, 2003; Lappin et al., 2002; Suzuki et al. 2002). Folglich scheint die Bedeutung von Epo bzw. EpoR über eine Rolle in der Hämatopoiese hinauszureichen. Entsprechend verursachte die Inaktivierung der Gene für *Epo* und *EpoR* bei Mäusen neben Defekten der Erythropoiese (Wu et al., 1995) auch Entwicklungsstörungen in verschiedenen nicht-hämatopoietischen Geweben (Wu et al., 1995, Wu et al. 1999; Yu et al., 2002). Epo- bzw. EpoR-defiziente Mäuse (*Epo*<sup>-/-</sup>, *EpoR*<sup>-/-</sup>) sind um den 13. Embryonaltag (E13) letal und weisen bemerkenswerte Ähnlichkeiten zum Phänotyp von Mäusen mit *Wt1*-Gendefekt auf. Insbesondere zeigen beide Defektmutanten Störungen der Epikardentwicklung sowie eine ausgeprägte Hypoplasie des Ventrikelmyokards (Wu et al., 1999; Kreidberg et al., 1993).

Die Expression des EpoR kann sowohl auf transkriptionaler als auch auf post-transkriptionaler und post-translationaler Ebene reguliert werden (Migliaccio et al., 1993; Migliaccio et al., 1991). Das *EpoR*-Gen besteht aus acht Exons und enthält einen GC-reichen minimalen Promotor ohne TATA-Box und CAAT-Motiv (Kuramochi et al., 1990; Maouche et al., 1991; Penny et al., 1991; Noguchi et al., 1991). Als *cis*-regulatorische Elemente befinden sich im *EpoR*-Promotor sechs potentielle Bindungsstellen für GATA-Transkriptionsfaktoren sowie GC-reiche Motive für den Transkriptionsfaktor Sp1 (Abb. 4, Briggs et al., 1986; Zon et al., 1991; Chiba et al., 1991; Maouche et al., 1994; Dame et al., 2002; Wallach et al., 2009).

## 1. Einleitung



**Abbildung 4: Organisation des *EpoR*-Gens.** Im oberen Teil ist das *EpoR*-Gen mit seiner Promotorregion sowie Transkriptionsstartstelle und Poly-A-Schwanz dargestellt. Im unteren Teil der Abbildung ist ein Ausschnitt aus der Promotorregion mit potentiellen Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren Wt1, GATA-1 und Sp1 relativ zur Transkriptionsstartstelle (+1) vergrößert dargestellt.

Während Sp1 ubiquitär exprimiert wird und deshalb möglicherweise für ein basales Expressionsniveau von EpoR in verschiedenen Geweben verantwortlich ist (Chin et al., 1995; Zon et al., 1991), stimuliert das Zinkfingerprotein GATA-1 durch Bindung am minimalen Promotor die Transkription von *EpoR* spezifisch in hämatopoietischen Zellen und in Sertoli-Zellen des Hodens (Youssofian et al., 1990; Kuramochi et al., 1990; Winkelmann et al., 1990; Jones et al., 1990). In Übereinstimmung mit seiner *trans*-aktivierenden Wirkung auf den *EpoR*-Promotor hatte das gezielte Ausschalten von GATA-1 in Mäusen u. a. eine Störung der normalen Hämatopoiese zur Folge (Pevny et al., 1991).

### 1.5 Aufgabenstellung

Das *Wt1*-Gen kodiert ein Zinkfingerprotein, das als Tumorsuppressor wirkt und für die normale Embryonalentwicklung notwendig ist. Neben anderen Entwicklungsdefekten zeigen *Wt1*-defiziente Mausembryonen u.a. eine Störung der Nieren- und Gonadendifferenzierung sowie eine unvollständige Ausbildung mesothelialer Gewebe. Zur Rolle von *Wt1* bei der Hämatopoiese liegen teilweise widersprüchliche Befunde vor: In einer Arbeit wurde nachgewiesen, dass Zellen aus den Lebern *Wt1*-defizienter

## 1. Einleitung

Mausembryonen im Vergleich zu normalen fetalen Leberzellen ein vermindertes Potential zur Ausbildung hämatopoietischer Vorstufen (BFU-E, CFU-E, CFU-GEMM) besitzen (Alberta et al., 2003). In einer anderen Veröffentlichung wurde hingegen berichtet, dass *Wt1* für die Hämatopoese der Maus nicht erforderlich sei (King-Underwood et al., 2005). Eine Bedeutung von *Wt1* für die Blutbildung wird durch Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe unterstützt. Diese zeigen, dass *Wt1* die Transkription des hämatopoietischen Wachstumsfaktors Erythropoietin stimuliert.

Vor dem Hintergrund dieser Befunde bestand die Aufgabenstellung der Promotionsarbeit darin, die Bedeutung von *Wt1* bei der Hämatopoese der Maus näher zu untersuchen. Es sollte überprüft werden, ob hämatopoietische Vorläuferzellen aus *Wt1*-Knock-Out-Embryonen im Vergleich zu normalen Progenitorzellen eine verringerte Fähigkeit zur *in vitro*-Proliferation bzw. -Differenzierung aufweisen. Weiterhin sollten gegebenenfalls mögliche Ursachen für ein reduziertes hämatopoietisches Potential von *Wt1*<sup>-/-</sup>-Vorläuferzellen ermittelt werden. Insbesondere sollte überprüft werden, ob ein verändertes Expressionsniveau des Erythropoietinrezeptors für die Auswirkungen einer *Wt1*-Defizienz auf die Hämatopoese verantwortlich sein könnte.

Die Realisierung des Projekts erfolgte in folgenden Schritten:

1) Klärung der Frage, ob Vorläuferzellen aus der fetalen Mausleber ein vermindertes Potential zur Ausbildung hämatopoietischer Kolonien *in vitro* aufweisen.

Dazu wurde mittels Zellkulturen, Benzidinfärbungen und RT-PCR-Analysen *in vitro* die Kapazität zur erythroiden Differenzierung hämatopoietischer Vorläuferzellen aus fetalen Leberzellen (E11,5) der Maus (*Wt1*<sup>-/-</sup>, *Wt1*<sup>+/-</sup>, *Wt1*<sup>+/+</sup>) untersucht.

2) Überprüfung, ob sich isolierte hämatopoietische Progenitorzellen aus normalen und *Wt1*-defizienten Mausembryonen hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit gegenüber rekombinantem Epo (rhEpo) unterscheiden.

Dazu wurde die Proliferation hämatopoietischer Vorläuferzellen aus fetalen Mauslebern (E11,5) (*Wt1*<sup>-/-</sup>, *Wt1*<sup>+/-</sup>, *Wt1*<sup>+/+</sup>) in unterschiedlichen rhEpo-Konzentrationen bestimmt.

## 1. Einleitung

3) Klärung der Frage, ob Mausembryonen mit und ohne *Wt1*-Gendefekt in verschiedenen Geweben ein unterschiedliches Expressionsniveau des Erythropoietinrezeptors aufweisen.

Dazu wurde mittels RT-PCR die *EpoR*-Genexpression in isolierten CD117<sup>+</sup> embryonalen Leberzellen (E11,5) aus Wildtyp- (*Wt1*<sup>+/+</sup>) und mutierten Mauslebern (*Wt1*<sup>-/-</sup>, *Wt1*<sup>+/-</sup>) ermittelt.

4) Überprüfung der Arbeitshypothese, dass die Expression des Erythropoietinrezeptors durch *Wt1* stimuliert wird.

Dazu wurden HepG2-Zellen zunächst transient mit verschiedenen *Wt1*-Expressionsvektoren und Leervektor kotransfiziert und daraufhin mittels RT-PCR auf ihren *EpoR*-mRNA-Gehalt untersucht.

5) Klärung des molekularen Mechanismus, über den *Wt1* die Expression des *EpoR* aktiviert.

Dazu wurde mittels EMSA die Bindung verschiedener *Wt1*-Proteine (*Wt1*[-KTS], *Wt1*[+KTS]) an Oligonukleotide aus dem h*EpoR*-Promoter untersucht. In ChIP-Assay-Experimenten wurde in fetalen Mausleberzellen (E11,5) die Proteininteraktion von *Wt1* und dem murinen *EpoR*-Promoter bei erhaltener chromosomaler Konfiguration untersucht. Luciferase-Reporter-Gen-Assays in HEK293- und K562-Zellen wurden mit der Frage nach Aktivierung des humanen und murinen *EpoR*-Promoters durch *Wt1*-Proteine durchgeführt.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Versuchstiere

Die Zuchtpaare vom Mausstamm C57BL/6 mit heterozygoter *Wt1*-Mutationen (*Wt1*<sup>+/-</sup>) stammen ursprünglich aus dem Jackson Labor (Bar Harbor, ME) und wurden gemäß der geltenden Tierschutzverordnungen im laboreigenen Tierhaus verpaart (Genehmigungsnummer: G0155/05). Die Embryonen wurden zu einem festgesetzten Zeitpunkt (Vaginalpropf: E 0,5) gesammelt und mittels PCR protokollgemäß genotypisiert (Wagner et al., 2002).

### 2.2 Zellkulturexperimente

#### 2.2.1 Kultivierung und Passage der Zellen

Die Zellen wurden in einem Zellkulturinkubator bei 21% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> und 37 °C kultiviert. Durch regelmäßig in zweimonatigen Abständen durchgeführte PCR-Analysen der Zellkulturüberstände wurde auf Mykoplasmenkontamination getestet. Die Monolayerkulturen wurden vor Erreichen der Konfluenz je nach Wachstumsrate alle zwei bis drei Tage passagiert. Dazu wurden die Zellen nach zweimaligem Waschen in PBS bei 37 °C unter Verwendung von 1x Trypsin/EDTA von den Kulturschalen abgelöst und üblicherweise im Volumenverhältnis von 1:10 in frisches Medium ausgesät. Zellzahlbestimmungen wurden unter Verwendung einer Neubauer-Zählkammer und Trypanblaufärbung durchgeführt.

#### 2.2.2 Plasmide

Eine 309 Basenpaar lange Sequenz des humanen EpoR-Promotors wurde mittels PCR und den PCR-Primern der Tabelle 6 kloniert. Die amplifizierte DNA wurde in die SacI- und HindIII-Restriktionsstellen des pGL2-Reporter-Vektors eingefügt. Die *Wt1*-Expressionskonstrukte (*Wt1*-cDNA-[+/-KTS] in pCB6<sup>+</sup>-Vektor) wurden freundlicherweise von Daniel A. Haber (Haber et al., 1991) zu Verfügung gestellt. Gemäß einem PCR-

## 2. Material und Methoden

basiertem Protokoll wurden gezielte Mutationen in die putativen Wt1-Bindungselemente des *EpoR*-Promotors eingefügt. Hierfür wurden die PCR-Primer der Tabelle 6 mit den Wildtyp-Promotor-Plasmiden als DNA-Matrize genutzt. Die mutierte *EpoR*-Promotorsequenz wurde in den pGL2-basic-Reporter-Vektor eingefügt und die korrekte DNA-Identität aller Plasmide mittels Dideoxy-Sequenzierung bestätigt

### 2.2.3 Transiente Zelltransfektion

24 Stunden vor Transfektion wurden die Zellen mit vorgewärmtem (37 °C) PBS gewaschen, mittels 1%iger Trypsin-EDTA-Lösung von den Kulturschalen gelöst und in frisches Medium ausgesät. Es wurden folgende Zellmengen verwendet: K562,  $6 \times 10^4$ /cm<sup>2</sup> in 24-Lochplatten; HEK293,  $6 \times 10^4$ /cm<sup>2</sup> in 24-Loch-Platten; HepG2-Zellen,  $2,5 \times 10^6$  /cm<sup>2</sup> in 6-Lochschaalen. Die Zellen wurden frühestens 15 h nach Passage transfiziert, nachdem unmittelbar zuvor das Kulturmedium erneuert worden war. Die Bedingungen für die mittels kationischer Liposomenkomplexe (Geneporter 2) erfolgenden Transfektion wurden für die einzelnen Zelllinien jeweils nach Herstellerangaben optimiert. Dabei erwiesen sich folgende DNA-Mengen als optimal: K562 und HEK293 Zellen in 24-Loch-Platten: 100 ng Firefly-Promotorreportervektor, 125 ng Wt1 - Expressionsvektor bzw. pCB6<sup>+</sup> - Plasmid, 50 ng Renillaluziferasevektor. HepG2-Zellen in 6-Lochschaalen: 1,5 µg DNA. Die Transfektionsansätze wurden 15 min lang bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend vorsichtig auf die Kulturen pipettiert. Nach 36 Stunden wurden die transfizierten Zellen zur Bestimmung der Luziferaseaktivitäten lysiert.

### 2.2.4 Zellyse und Luziferase-Assays

Die Lyse der transfizierten Zellen erfolgte nach zweimaligem Waschen in PBS mit 900 µl Dual-Reporter-Lysepuffer pro 6-Lochschaalen bzw. 200 µl Dual-Reporter-Lysepuffer pro Well. Nach 10-minütigem Abzentrifugieren (16000g, 4°C) wurden die Firefly-Luziferaseaktivitäten als Maß für die Aktivität der jeweiligen Promotorsequenzen in den Lysatüberständen gemessen. Dazu wurde jeweils 20 µl Lysat mit 100 µl Luciferasesubstrat versetzt und die Lichtemission anschließend sofort im Luminometer

## 2. Material und Methoden

bestimmt. Danach erfolgte in gleicher Weise die Bestimmung der Renilla-Luziferaseaktivitäten zur Abschätzung der Transfektionseffizienzen. Mögliche Unterschiede in den Transfektionseffizienzen wurden durch Normierung der relativen Firefly-Luziferaseeinheiten (RLU) auf die entsprechenden Renilla-Luziferaseaktivitäten berücksichtigt. Pro Versuchsbedingung wurden jeweils 5 Experimente in Doppelansätzen durchgeführt.

### 2.3 *In vitro* Progenitorzellassays und Benzidinfärbung

Mausembyronen (E 11,5) wurden den getöteten Muttertieren *in utero* unter sterilen Bedingungen entnommen und auf Eis in 5 ml Iscove's Medium mit 2% fetalem Kälberserum überführt. Mit sterilen Scheren und Pinzetten wurden die einzelnen Embryonen freipräpariert und deren Lebern isoliert. Anschließend wurde das Lebergewebe mit einem Skalpell zerkleinert und durch drei- bis viermaliges Aufziehen in 1 ml Medium über eine 21G-Nadel homogenisiert. Die Leberzellen wurden in ein steriles 14 ml Reaktionsgefäß gegeben und 3-5 min lang auf Eis inkubiert, um verbliebene größere Gewebeteile zu sedimentieren. Der Überstand mit der Zellsuspension wurde in ein neues steriles Reaktionsgefäß transferiert, mit Medium aufgefüllt und 10 min lang bei 400g zentrifugiert. Nach zweimaligem Waschen in Iscove's Medium mit 2% fetalem Kälberserum wurden  $1 \times 10^5$  Zellen pro 35 mm Platte in Methocult-Medium (Stem Cell Technologies) ausgesät. Die Kultur der Zellen erfolgte bei 37°C, 21% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>. Nach 48 Stunden wurden die gebildeten Kolonien unter einer Mikroskop gezählt. Die Versuchsauswertung erfolgte hinsichtlich der Anzahl der gewachsenen Kolonien aus *Wt1*<sup>+/+</sup>-, *Wt1*<sup>+/-</sup>- und *Wt1*<sup>-/-</sup>- Embryonen.

Zum Nachweis erythroider Progenitorzellen wurden die Lebern von *Wt1*<sup>+/+</sup>-, *Wt1*<sup>+/-</sup>- und *Wt1*<sup>-/-</sup>-Embryonen in der oben beschriebenen Weise dissoziiert. Der Hämoglobinnachweis erfolgte durch Benzidinfärbung nach Lyse der Erythrozyten mit Wasserstoffperoxid (Orkin, Harosi und Leder, 1975). Die hämoglobinpositiven Zellen wurden in der Neubauerkammer gezählt.

## 2. Material und Methoden

### 2.4 Isolierung hämatopoietischer Vorläuferzellen

Hämatopoietische Vorläuferzellen wurden aus fetalen Mauslebern (E11,5; *Wt1*<sup>+/+</sup>, *Wt1*<sup>+/-</sup> und *Wt1*<sup>-/-</sup>) mittels Magnetzellseparation nach Herstellerangaben isoliert. Es wurden mit einem gegen CD117 (c-kit) gerichteten Antikörper konjugierte MicroBeads verwendet. Zur magnetischen Trennung CD117-positiver und CD117-negativer Zellen wurden MACS MS-Säulen in das Magnetfeld eines MACS Separators gebracht. Durch dreimaliges Waschen in je 500 µl Waschpuffer werden die CD117-negativen Zellen entfernt. Die Elution der CD117-positiven Zellen erfolgte in einem Volumen von 1 ml Elutionspuffer.

### 2.5 Einfluss von Erythropoietin auf die Proliferation hämatopoietischer Vorläuferzellen der Maus

Um den Einfluss von Erythropoietin (Epo) auf die Proliferation CD117-positiver Vorläuferzellen (*Wt1*<sup>+/+</sup>, *Wt1*<sup>+/-</sup> und *Wt1*<sup>-/-</sup>) zu untersuchen, wurden diese in eine 96-Lochplatte zu je 7500 Zellen pro Well ausgesät. Die Zellen wurden 3 Tage lang in Iscove's Medium in Gegenwart von 25 ng/ml SCF und variablen Konzentrationen von Epo ( $10^{-5}$  bis 6 IU/ml) inkubiert. Anschließend wurden die vitalen Zellen insgesamt vier Mal ausgezählt und jeweils die Mittelwerte der ermittelten Zellzahlen berechnet. Die Experimente wurden drei Mal unter Verwendung von insgesamt sechs Embryonen (jeweils *Wt1*<sup>+/+</sup>, *Wt1*<sup>+/-</sup> und *Wt1*<sup>-/-</sup>) durchgeführt.

### 2.6 RNA-Extraktion

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus Geweben und Zellen erfolgte unter Verwendung von jeweils 1 ml TRIzol Reagenz nach Herstellerangaben. Die RNA wurde in ultraPURE-Wasser resuspendiert und bei Wellenlängen von 260 nm bzw. 280 nm im UV-Spektrometer (Beckmann DU640 Spektrophotometer) quantifiziert.

## 2. Material und Methoden

### 2.7 Reverse Transkription

Die cDNA-Synthese erfolgte mit jeweils 2 µg Gesamt-RNA pro Reaktionsansatz. Die Reaktionen wurden unter Verwendung von Oligo(dT)<sub>12-18</sub>-Primer und Superscript-II-Reverse-Transkriptase nach Herstellerangaben (Invitrogen) durchgeführt. Die erfolgreiche Umschreibung wurde mittels konventioneller PCR durch Amplifikation eines reich exprimierten Gens z.B. GAPDH oder β-Aktin überprüft.

### 2.8 Real-time PCR

Für die real-time PCR wurden üblicherweise folgende Reaktionsansätze (20 µl) verwendet: 2 µl cDNA (1:5 verdünnt), 10 µl 2x SYBR-Green-PCR-Mix, 0,2 µl Primer-Mix (10 µM), 7,8 µl ultraPURE H<sub>2</sub>O. Die PCR erfolgte nach folgendem Zyklusschema in einem GeneAmp5700-Sequence-Detection-System: DNA-Denaturierung bei 95 °C, Primerannealing und Extension bei 60 °C, Fluoreszenzdetektion bei 77 °C. Die Identität der PCR-Produkte wurde nach dem Lauf mittels Agarose-Gelelektrophorese anhand der Produktgröße überprüft. Weiterhin wurden die Schmelzkurven der Amplikons analysiert. Die Auswertung der PCR erfolgte nach der „Schwellenzyklus“ (threshold cycle, Ct)-Methode. Die Ct-Werte wurden jeweils in der Mitte der exponentiellen Amplifikationsphase bestimmt. Die Normalisierung der Resultate für die interessierenden Gene erfolgte gegen GAPDH. Bei den Dreifachbestimmungen wurden ausschließlich diejenigen Proben berücksichtigt, deren Ct-Werte für GAPDH um weniger als 0,5 Zyklen differierten. Außerdem wurden lediglich Experimente ausgewertet, deren Negativkontrollen (H<sub>2</sub>O) einen Ct-Wert von über 40 aufwiesen. Die Primer-Sequenzen für die PCR-Amplifikationen sind in Tabelle 6 dargestellt.

### 2.9 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Immunoblot

Die Zellen aus subkonfluenten Kulturen wurden nach einmaligem Waschen in 10 ml eisgekühltem PBS von den Kulturschalen geschabt, in ein 15 ml Falcon-Gefäß überführt und anschließend 5 min lang bei 2000 rpm (4°C) zentrifugiert. Je nach Größe der Zellpellets wurden 0,5 - 2ml Extraktionspuffer zugegeben und ca. 20 min lang auf Eis inkubiert. Die Suspension wurde für 2 x 15 s mit Ultraschall auf Eis behandelt.

## 2. Material und Methoden

Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 3000 rpm (4°C, 5 min). Der Überstand wurde als Gesamtzell-Proteinisolat in 100 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mittels Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 280 nm sowie zusätzlich mittels Farbreaktion nach der Methode von Lowry (BIORAD Protein Assay). Für die Westernblotanalysen wurden üblicherweise 7,5 %-ige Polyacrylamidgele verwendet, die mit 20 µg Protein pro Spur beladen wurden. Die Molekulargewichtsbestimmung der Proteine erfolgte anhand eines Proteinstandards, der durch den Sekundärantikörper detektiert wurde. Als Laufpuffer wurde 1% SDS-Puffer verwendet. Der Proteintransfer auf PVDF-Membranen wurde mit einem halbtrockenen Blottingsystem (Biorad Typ Mini Protean 2-Cell) unter Verwendung von 1x Blottingpuffer Semidry als Transferpuffer durchgeführt. Die angelegte elektrische Spannung betrug 15 V, der Transfer dauerte normalerweise 45 min. Um die Effizienz des Transfers zu überprüfen, wurde das Gel anschließend mit Coomassie-Lösung gefärbt. Zum Blockieren unspezifischer Bindungen wurde die Membran mit den Proteinen 1 h lang bei Raumtemperatur mit 5 % Trockenmilchpulver in TBS/Tween unter vorsichtigem Schwenken inkubiert. Die Membranen wurden über Nacht mit dem 1:200 in 2,5 % Milchpulver (in TBS/Tween) verdünnten Primärantikörper bei 4 °C inkubiert. Anschließend erfolgte das Waschen der Membran 3x 15 min lang mit TBS/Tween. Der mit Peroxidase konjugierte Sekundärantikörper wurde 1:10.000 in 2,5 % Milchpulver (in TBS/Tween) verdünnt und die Membran darin 1 h lang bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen (3x15 min) erfolgte der Antikörpernachweis mittels eines Chemiluminiszenzverfahrens und Exposition auf Röntgenfilm.

### **2.10 Elektrophorese Mobilitätsshiftassay (EMSA)**

#### **2.10.1 Oligonukleotid-Annealing**

Komplementäre Einzelstrangoligonukleotide wurden in äquimolaren Konzentrationen (10 µM) kombiniert und 3 min lang in kochendem Wasserbad erhitzt. Nach mindestens 3-stündiger Abkühlung im Wasserbad bis auf Raumtemperatur wurden die doppelsträngigen Oligonukleotide mit TE-Puffer auf eine Konzentration von 2 µM

## 2. Material und Methoden

verdünnt. Die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 7 angegeben.

### 2.10.2 Radioaktive Oligonukleotidmarkierung

Die endständige Markierung der Oligonukleotide mit  $^{32}\text{P}$  erfolgte nach folgendem

Pipettierschema:

- 1  $\mu\text{l}$  doppelsträngiges Oligonukleotid (2  $\mu\text{M}$ )
- 2  $\mu\text{l}$  Polynukleotidkinase-Puffer
- 3  $\mu\text{l}$  [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP (3.000 Ci/mmol, 10 mCi/mL)
- 13  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$
- 1  $\mu\text{l}$  T4

Die Reaktionsansätze wurden jeweils 1 h lang bei 37°C inkubiert und anschließend über G50-Säulen (Amersham) gereinigt. Dazu wurde zunächst das Probenvolumen durch Zugabe von  $\text{H}_2\text{O}$  auf 50  $\mu\text{l}$  eingestellt. Die Elution der markierten Oligonukleotide erfolgte durch 2-minütiges Zentrifugieren der Säulen bei 2150 rpm (~735 g). Zur Überprüfung der Markierungseffizienz wurde jeweils 1  $\mu\text{l}$  der Oligonukleotide in 1,5 ml Szintillationsflüssigkeit aufgenommen und im Szintillationszähler gemessen. Üblicherweise ergaben sich spezifische Aktivitäten von  $5 \times 10^7$  cpm/pmol DNA.

### 2.10.3 Bindungsreaktionen

Pro Reaktionsansatz wurde 3  $\mu\text{l}$  5x Reaktionspuffer (s. Tabelle 2), 1  $\mu\text{l}$  Heringsperma-DNA (10 mg/ml), 20  $\mu\text{g}$  rekombinantes Wt1-Protein verwendet. Das Probenvolumen wurde durch Zugabe von Aqua bidest. auf 14  $\mu\text{L}$  eingestellt. Anschließend wurde jeweils 1  $\mu\text{l}$  der markierten Oligonukleotide (100.000 cpm) zugegeben. Die Reaktionsansätze wurden 30 min lang auf Eis inkubiert.

### 2.10.4 Gellauf und Detektion

Nach einmaligem Spülen der Geltaschen mit Laufpuffer (0,5x TBE) wurden die Proben auf ein 4 %iges nicht-denaturierendes Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Der Gellauf

## 2. Material und Methoden

erfolgte über einen Zeitraum von 2,5-3,5 h bei einer Temperatur von 4 °C und einer Spannung von 200 V. Nach Trocknung (80°C, 2 h, BioRad, Geltdrockner) erfolgte die Autoradiografie unter Verwendung von Verstärkerfolien bei -80 °C.

### 2.11 Chromatinimmunpräzitationsassay (ChIP)

Der ChIP-Assay wurde mittels ChIP-Assay-Kit mit humanen K562-Zellen und frisch präparierten Zellen fetaler Mauslebern (E11,5) durchgeführt. Protein-DNA-Crosslinking erfolgte durch Inkubation der K562-Zellen bzw. der fetalen Leberzellen mit Formaldehyd in einer Konzentration von 1,2 bzw. 0,4%. Für die Immunpräzitation wurden jeweils 4 µg Antikörper gegen azetyliertes Histon 3, Wt1, Sp1, GATA-1, GATA-4, STAT5 und RNA-Polymerase benutzt. Inkubation ohne Antikörper diente als Negativkontrolle. Zur PCR-Amplifikation der gereinigten DNA-Fragmente (33 Zyklen bei 60°C Annealingtemperatur) wurden 3 µl DNA mit jeweils 0,2 µM des jeweiligen Primers, PCR-Puffer, dNTPs und AmpliTaq-Polymerase gemischt. Für die PCR-Amplifikation einer 309 Basenpaar langen Sequenz im humanen *EpoR*-Promotor (NCBI X53081) wurden folgende Primer genutzt: 5'-CTGGGAAGAGATGCTGATTC- (Vorwärtsprimer) und 5'-CGCCTCTAAGTGGCAGATCC-3' (Rückwärtsprimer). Zur Analyse der ChIP-Experimente in Mausleberzellen wurden nachfolgende Primerpaare zur Amplifikation einer 330 Basenpaar langen Sequenz des Maus-*EpoR*-Promotors (NCBI X53081) verwendet: 5'-TGACCACATTAGCAAAGCCA-3'(Vorwärtsprimer) und 5'-CCCTGAGTTTGTCCATGATG -3' (Rückwärtsprimer). Eine 253 Basenpaar lange Sequenz innerhalb des Thrombopoetinrezeptorpromotors der Maus (*TpoR*) (NCBI Z22657.1) wurde mittels nachfolgender Oligonukleotide amplifiziert: 5'-AGAGACAGGGACAGGACGT- 3' (Vorwärtsprimer), 5'-AGGGTCTCCCTTTGCCTGT-3' (Rückwärtsprimer). Die PCR-Produkte wurden auf 1,5% Agarose-Gel elektrophorisiert.

### 2.12 Statistik

Um statistische Signifikanzen nachzuweisen, wurden ANOVA mit dem Bonferroni-Test als post-hoc-Analyse sowie der Student's *t*-test durchgeführt. P-Werte kleiner als 0,05

## 2. Material und Methoden

wurden als statistisch signifikant gewertet.

**Tabelle 2: Feinchemikalien, Verbrauchsmaterialien und Geräte**

<u>Feinchemikalien</u>	<u>Hersteller</u>
TRIzol® LS Reagent	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Wasser ultraPURE™	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Oligo(dT) [0,5 µg/µL]	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
dNTPs [je 10 mM]	Roth, Karlsruhe
Superscript II Reverse Transkriptase mit 5x Erststrangpuffer und 0,1 M DTT	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
AmpliTaqPolymerase mit 10x PCR-Puffer	Applied Biosystems, Mannheim
Primer [je 100 µM]	Biomers, Ulm
Ethidiumbromid [0,5 µg/mL in H <sub>2</sub> O]	Merck, Darmstadt
Universal Agarose	peQlab, Erlangen
GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
100 bp DNA Marker	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
DMEM [4,5 g/L Glucose]	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
RPMI 1640 [2 g/L Glucose, 0,3 g/L L-Glutamin]	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
100x L-Glutamin [200 mM in 0,9 % NaCl]	PAA Laboratories GmbH, Cölbe

## 2. Material und Methoden

### Fortsetzung Tabelle 2: Feinchemikalien, Verbrauchsmaterialien und Geräte

100 x Antibiotika-Mix [10.000 U/mL Penicillin G, 10 mg/mL Streptomycin in 0,9 % NaCl]	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
2,2' Dipyridyl [200 mM in EtOH]	Sigma, Steinheim
Dulbecco's PBS [0,2 g/L KCl; 0,2 g/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 8 g/l NaCl; 1,15 g/l Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ]	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
10 x Trypsin/EDTA [5 g/L Trypsin, 2 g/L EDTA in 0,9 % NaCl; pH 7,5]	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
FKS	Biochrom KG, Berlin
Accutase™	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Trypanblaulösung [0,4 % (w/v) in PBS]	Sigma, Steinheim
Genporter2	PEQLAB, Erlangen
CoCl <sub>2</sub> , steril [100 mM in H <sub>2</sub> O]	Sigma, Steinheim
MACS-Komponenten	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
2 ml CD117 MicroBeads, mouse: MicroBeads konjugiert an monoklonalen anti-Maus-CD117-AK (Isotyp: rat IgG2b)	
Phosphate buffered Saline	Roth, Karlsruhe
Flüssiger N <sub>2</sub>	Roth, Karlsruhe
SDS-Puffer nach Laemmli	Roth, Karlsruhe
Acrylamid/Bisacrylamid-Mix	Roth, Karlsruhe
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat	Sigma, Steinheim
TEMED	Roth, Karlsruhe

## 2. Material und Methoden

### Fortsetzung Tabelle 2: Feinchemikalien, Verbrauchsmaterialien und Geräte

Farbproteinmarker Precision Plus	Biorad, München
Protein Dual Color Standard	
Antikörper-reaktiver Proteingrößenmarker	Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, Kalifornien
5%/2,5% Milchsuspension	Roth, Karlsruhe
Primär-AK: PAK<hTrkB-Rezeptor>IgG-Maus	Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, Kalifornien
Sekundär-AK: PAK<mIgG>IgG-Kaninchen-POD	Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, Kalifornien
TBS/Tween: 0,05% Tween 20	Sigma, Steinheim
BIT 9500	Stemcell Technologies Inc., Vancouver
rhEpo	Epoetin beta, Roche, Grenzach-Wyhlen
AmpliTaq-Polymerase	Applied Biosystems, Roche
azetyliertes Histon 3 (polyklonaler Kaninchen-Antikörper, #06-599, Upstate)	Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, Kalifornien
WT1 (polyklonaler Kaninchen-Antikörper, C-19)	Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, Kalifornien
Sp1 (PEP-2)	Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, Kalifornien
GATA-1 (monoklonaler Ratten-Antikörper, N-6)	Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, Kalifornien
GATA-4 (polyklonaler Ziegen-Antikörper, C-20)	Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, Kalifornien
STAT5 (H-134)	Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, Kalifornien

## 2. Material und Methoden

### Fortsetzung Tabelle 2: Feinchemikalien, Verbrauchsmaterialien und Geräte

RNA-Polymerase II  
(N-20) Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, Kalifornien

#### Geräte und Verbrauchsmaterialien

#### Hersteller

Kühlzentrifuge 5415 R, Festwinkelrotor	Eppendorf AG, Hamburg
GeneAmp PCR System 2400	Applied Biosystems, Mannheim
UNO-Thermoblock	Biometra, Göttingen
Spannungsquelle Power Pac 200 bzw. 3000	Biorad, München
White/UV Transilluminator, UVP	Henderson, USA
Elektrophoresekammern (Wide)	
Mini-Sub Cell GT	Biorad, München
Inkubator CB150 (Normoxie)	Binder, Tuttlingen
Umkehrmikroskop mit Phasenkontrast: Axiovert 35	Zeiss, Jena
Zellkulturschalen und –röhrchen	TPP, Trasadingen
Neubauer-Zählkammer improved, Paul Marienfeld GmbH&Co.KG	Lauda-Königshofen
Zentrifuge Universal 30 F mit Ausschwingrotor	Hettich, Tuttlingen
Gefrierblock Nalgene™, Cryo 1 °C	Nalgene, Rochester, USA
Beckman DU 640 Spektralphotometer	Dynatech Laboratories Inc., Dorchester, UK
Luminometer Microlite TLX 1	
Geneamp 5700	Applied Biosystems, Mannheim
0,2 mL Thermostrips mit Ultra Clear Cap Strips	ABgene, Hamburg
Luminometer, Microlite TLX1	Dynatec Laboratories Inc., Dorchester, UK
Magnetzellseparation	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
ChIP-Assay-Kit (#17-295)	Upstate, Lake Placid, New York
GeneAmp5700 Sequence	Perkin Elmer, Applied Biosystems,

## 2. Material und Methoden

Detection System	Foster City
Thermal cycler UNO-II	Biometra, Göttingen, Deutschland
MACS Column, MACS Separator, MiniMACS, Miltenyi Biotec GmbH, USA	
Octo MACS, Varion MACS oder SuperMACS	
Gelsystem	Biorad, München
PVDF-Membran Immobilon P (Millipore)	Millipore GmbH Schwalbach
Filterpapiere	Whatman, Dassel
Röntgenfilme	Amersham, London

**Tabelle 3: Lösungen und Puffer**

Lösungen und Puffer	Anwendung
0,5x TBE [10,8 g/L Tris; 5,5 g/L Borsäure; 0,004 % (v/v) 0,5 M EDTA]	Agarose-Gelelektrophorese
5x DNA-Ladepuffer [30 % (v/v) Glycerin, 25 % (v/v) Bromphenolblau [0,25 % (w/v)]]	Agarose-Gelelektrophorese
PBS <sup>-/-</sup> [8 g/L NaCl; 0,2 g/L KCl; 1,44 g/L Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O; 0,24 g/L KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; pH 7,4]	Zellkultur
Benzidinlösung ( 0,2% Benzidindihydrochlorid in 0,5M AcOH) von SIGMA	Hämoglobinnachweis
Perhydrol (30%)	Hämoglobinnachweis
2 x SYBR Green PCR Mix, Roche Diagnostics, Mannheim	RT-PCR
BIT Isocove´s (20% BIT, 80% Isocove´s, 1% Glutamin, ca. 40 µg/ml LDL[80 µg/10 ml], 100 µM Mercaptoethanol [1 µl/ 10 ml], 100 ng/ml Stammzellfaktor [TPO, SF, Flt3])	Stammzellgewinnung
PBS (pH 7,2), BSA (0,5%), EDTA (2mM) bei 4-8°C	Puffer zur Isolierung
MACS-Komponenten 2 ml CD117 MicroBeads, mouse: MicroBeads konjugiert an monoklonalen anti-Maus-CD117-AK (Isotyp: rat IgG2b)	Stammzellgewinnung
137 mM NaCl, 20 mM Hepes/pH 7,2, 2 mM Mg Cl <sub>2</sub> , 1mM EDTA in H <sub>2</sub> O, DTT auf 0,5 mM und PMSF in DMSO auf 1 mM frisch zugegeben	Stammzellgewinnung
137 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl/pH 7,4, 1 mM Mg Cl <sub>2</sub> , 1% (v/v) in H <sub>2</sub> O, DTT auf 0,5 mM und PMSF in DMSO auf 1 mM frisch zugegeben	Stammzellgewinnung
Blotting-Puffer: Methanol, H <sub>2</sub> O	Westernblot
Coomassie Brilliant Blue-Färbelösung: (200 ml Methanol, 50 ml 99%ige Essigsäure, 250 ml H <sub>2</sub> O, 8 Farbtabletten)	Westernblot

## 2. Material und Methoden

### Fortsetzung Tabelle 3: Lösungen und Puffer

Entfärber: Essigsäure, Methanol	Westernblot
Reaktionspuffer (10mM Tris-HCl [pH: 7,5], 50 mM KCl, 1 mM MgCl <sub>2</sub> , 1 mM EDTA, 5 mM DTT, 5% Glycerol, 0,0 mg/ml Hering-Sperma-DNA	EMSA
ChIP Dilution Buffer: 0,01% SDS, 1,1% Triton X-100, 1,2 mM EDTA, 16,7 mM Tris-HCl, pH 8,1, 167 mM NaCl	ChIP-Assay
SDS Lysis Buffer: 1% SDS, 10 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 8,1	ChIP-Assay
Nuclei Swelling Buffer: 5 mM PIPES pH 8,0, 85 mM KCl, 0,5% NP-40	ChIP-Assay
Low Salt Wash: 0,1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, pH 8,1, 150 mM NaCl	ChIP-Assay
High Salt Wash: 0,1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, pH 8,1, 500 mM NaCl	ChIP-Assay
LiCl Wash: 0,25 LiCl, 1% NP-40, 1% Sodium Desoxycholate, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 8,1	ChIP-Assay

### Tabelle 4: Zelllinien

Zelllinie	Abstammung	Bezugssquelle	Kulturmedium
HEK293: ACC 305	humane embryonale Niere	DSMZ	DMEM
HEL: ACC11	humane Erythroleukämiezellen	DSMZ	RPMI 1640
MEL ACC 501	murine Erythroleukämiezellen	DSMZ	DMEM
UT-7: ACC137	humane akute myeloide Leukämiezellen	DSMZ	alpha-MEM
REH: ACC 22	humane prä-B-Zell- Leukämie-Zelllinie	DSMZ	RPMI 1640
HepG2: ACC 180	humane hepatozelluläre Karzinomzellen	DSMZ	RPMI 1640
SH-SY5Y: ACC 209	humane Neuroblastomzelllinie	DSMZ	DMEM

## 2. Material und Methoden

**Tabelle 5: Plasmide**

Plasmid	Eigenschaften
pGI2-P117	humanes Epo-Promoterkonstrukt in pGI2b-Vektor
pGL2b-mEpoR Prom	murines EpoR-Promoterkonstrukt
pGI2 basic-hEpoR Prom	humanes EpoR-Promoterkonstrukt
pEpoR25	humanes EpoR-Promoterkonstrukt
pEpoR32	humanes EpoR-Promoterkonstrukt
pEpoR35	humanes EpoR-Promoterkonstrukt
pEpoR45	humanes EpoR-Pomoterkonstrukt
pEpoRprom3M3	mutiertes humanes EpoR-Pomoterkonstrukt in pEpoR35
pEpoR35 Mut 4F	mutiertes humanes EpoR-Pomoterkonstrukt in pEpoR35
pEpoR35 3M3 Mut 3F	mutiertes humanes EpoR-Pomoterkonstruk in pEpoR35
C130	Wt1(-KTS)-Expressionsvektor
C132	Wt1(+KTS)-Expressionsvektor
pCB6 <sup>+</sup>	Basisexpressionsvektor
pGI2basic	Luziferase-Basisvektor

**Tabelle 6: DNA-Sequenzen der verwendeten Oligonukleotidprimer**

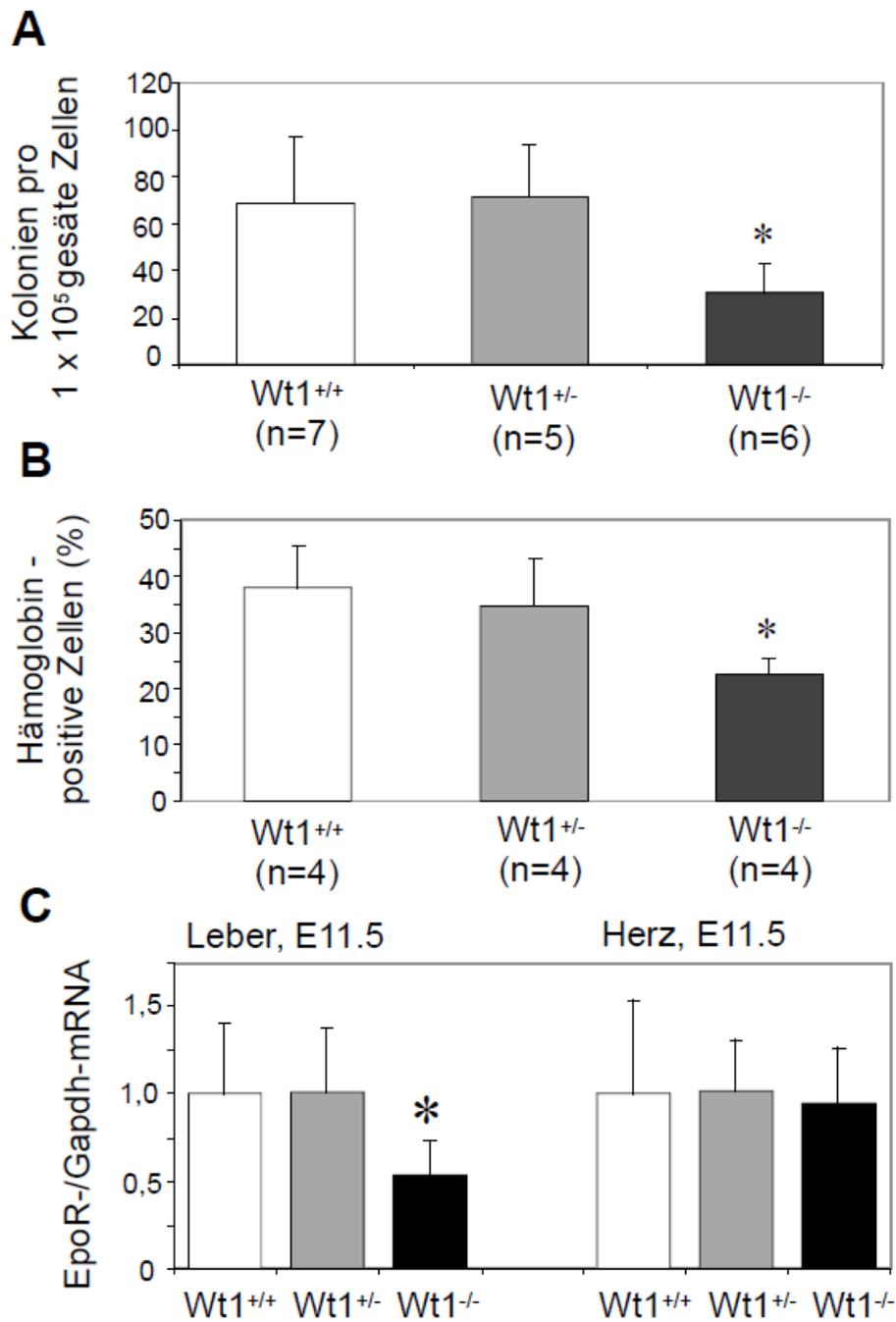
	NCBI-Nr.	mRNA	Einzelstrangsequenz	Verwendungszweck
Nr. 1	M34986	hEPOR-F	ACCGTGTCATCCACATCAAT	Klonierung
		hEPOR-R	GCCTTCAAACCTCGCTCTCTG	Klonierung
Nr. 2	BC046282	mEpoRPromF1	CTGGTTTAGGCAGTGGCTGT	Klonierung
		mEpoRPromF1	CACCTCTCCTTCCCTTTCCT	Klonierung
Nr. 3	NM001101	hAktin-F	AGAAAATCTGGCACCACACC	RT-PCR
		hAktin-R	GACTTCGAGCAAGAGATGGC	RT-PCR
Nr. 4	BC046282	mEpoR-F	GGACACCTACTTGGTATTGG	RT-PCR
		mEpoR-R	GACGTTGTAGGCTGGAGTCC	RT-PCR
Nr. 5	M34986	hEpoR-2c-F	GGGCTCTGAAGCAGAAGATCTGGC	RT-PCR
		hEpoR-2c-R	TAGGTATCCTGGGCATGCTCACTG	RT-PCR
Nr. 6	BC083149	mGAPDH-F	ACGACCCCTTCATTGACCTCA	RT-PCR
		mGAPDH-R	CACTTGAAGGGTGGAGCCAAA	RT-PCR
Nr. 7	NM002046	hGAPDH-F2	GACAGTCAGCCGATCTTCTT	RT-PCR
		hGAPDH-R2	CTGAGAACGGGAAGCTTGTC	RT-PCR
Nr. 8	M34986	hEPORoligo3M3+	GAGTGCTGGCAACGCAAACCTCGGGG	EMSA, Klonierung
		hEPORoligo3M3-	CTCACGACCGTTGCGTTTGAGCCCC	EMSA, Klonierung
Nr. 9	M34986	hEPORoligo3M3+ (Mutation A)	GAGTGCTGGCAACGCCCCCTCGGG G	EMSA
Nr.10	M34986	hEPORoligo3M3+ (Mutation B)	CCCCGAGTTTGCGGGGCCAGCACTC	EMSA
Nr.11	M34986	hEPORoligo3M3+ (Mutation C)	GAGTGCTGGCAACGCAAACCTCGGGG	EMSA

### 3.Versuchsergebnisse

#### 3.1 Leberzellen aus *Wt1*-defizienten Mausembryonen (*Wt1*<sup>-/-</sup>) besitzen ein reduziertes erythroides Differenzierungspotenzial

Zunächst wurde ermittelt, ob ein normales *Wt1*-Expressionsniveau für die erythroide Differenzierung hämatopoietischer Vorläuferzellen notwendig ist. Zur Charakterisierung ihrer Differenzierungseigenschaften wurden Leberzellen von Mausembryonen (E11,5) des Wildtyps (*Wt1*<sup>+/+</sup>) sowie mit heterozygotem (*Wt1*<sup>+/-</sup>) und homozygotem (*Wt1*<sup>-/-</sup>) *Wt1*-Gendefekt isoliert und in Gegenwart von Erythropoietin (3 U/ml) über einen Zeitraum von 48 Stunden in Methylzellulose enthaltendem Medium kultiviert. Hierbei ergaben sich signifikante Unterschiede im Wachstum erythroider Kolonien: Wildtypzellen (*Wt1*<sup>+/+</sup>) bildeten durchschnittlich 69±24 Kolonien pro 10<sup>5</sup> Zellen aus, bei Verwendung *Wt1*-defizienter Zellen betrug die Zahl erythroider Kolonien 31±10 pro 10<sup>5</sup> Zellen (\**P*<0,01, Student's *t*-Test, Abb. 5A). Zwischen den Zellen von Wildtypen (*Wt1*<sup>+/+</sup>) und heterozygoten Mäusen (*Wt1*<sup>+/-</sup>) wurden keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Kolonienbildung festgestellt (*P*>0,05, Abb. 5A). In einer alternativen Vorgehensweise zur Bestimmung der erythroiden Differenzierung erfolgte der Nachweis von Hämoglobin mittels Benzidinfärbung in frisch isolierten fötalen Leberzellen der Maus. Es ergab sich im Vergleich zu Wildtypen (*Wt1*<sup>+/+</sup>) und heterozygoten (*Wt1*<sup>+/-</sup>) Versuchstieren eine signifikant (\**P*<0,05) geringere Zahl hämoglobinpositiver Zellen in *Wt1*-defizienten Mausleberzellen (Abb. 5B). Die Expression des Erythropoietinrezeptors (*EpoR*) wurde mittels real-time RT-PCR analysiert. Interessanterweise wurde in Lebergewebe von *Wt1*-defizienten Mausembryonen (E11,5) ein signifikant geringeres *EpoR*-mRNA-Niveau als in den entsprechenden Organen von *Wt1*<sup>+/+</sup>- und *Wt1*<sup>+/-</sup>- Embryonen festgestellt (Abb. 5C). In den Herzen von *Wt1*<sup>+/+</sup>-, *Wt1*<sup>+/-</sup>- und *Wt1*<sup>-/-</sup>- Embryonen wurden hingegen keine signifikanten Unterschiede bezüglich des *EpoR*-mRNA-Gehaltes gemessen (Abb. 5C). In Ermangelung eines spezifischen Antikörpers (Elliott et al., 2006; Brown et al., 2007; Kirkeby et al., 2007) konnte die Expression von *EpoR* auf Proteinebene nicht untersucht werden.

### 3. Versuchsergebnisse

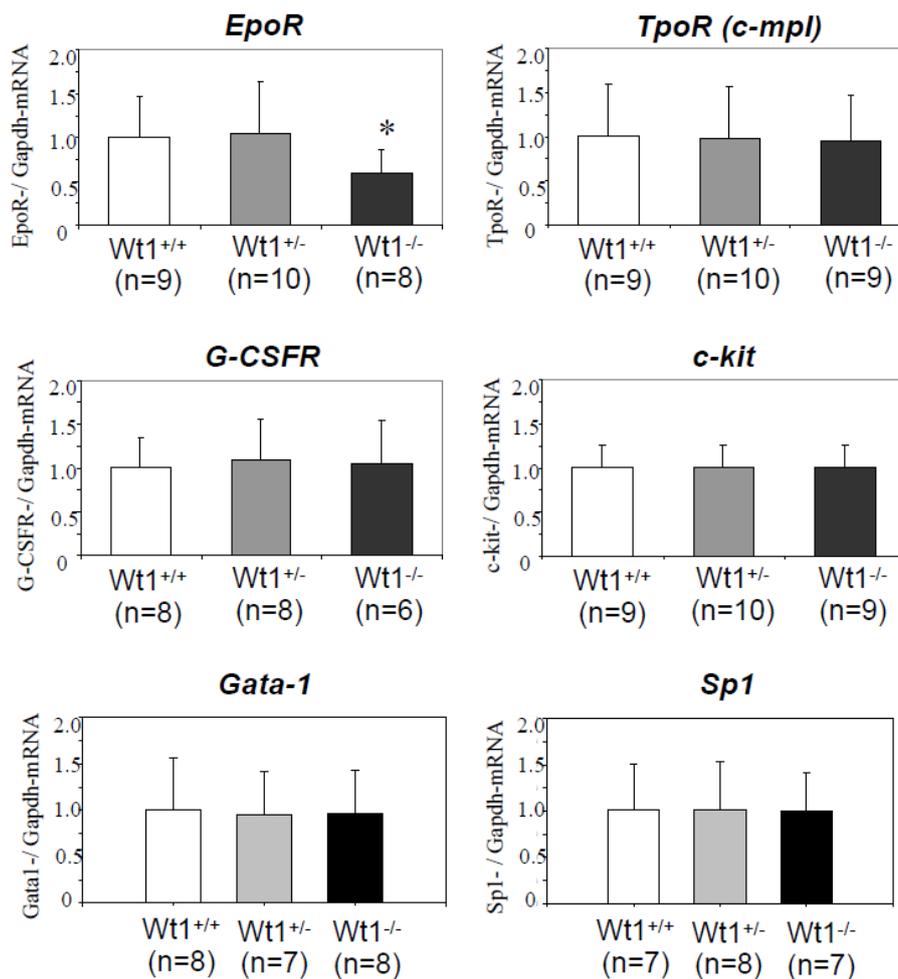


**Abbildung 5: Hämatopoiesepotenzial und *EpoR*-mRNA in Leberzellen aus *Wt1*<sup>+/+</sup>, *Wt1*<sup>+/-</sup> und *Wt1*<sup>-/-</sup> - Mausembryonen.** A) Kolonienbildende Kapazität fötaler Leberzellen der Maus. Die frisch gewonnenen fötalen Leberzellen (E 11.5) wuchsen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in Methocult GF M3434, welches rekombinantes humanes Epo (3 IU/ml) enthielt. Die Bildung erythroider Kolonien war in *Wt1*<sup>-/-</sup>-Zellen verglichen mit *Wt1*<sup>+/+</sup>- und *Wt1*<sup>+/-</sup>-Zellen signifikant reduziert. \*P<0,01; Student's *t*-Test. B) Hämoglobingehalt der frisch isolierten Leberzellen von Mausembryonen am Tag E11,5. Die Zellen wurden mittels Benzidin gefärbt, um das intrazelluläre Hämoglobin zu visualisieren. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung. \*P<0,01; Student's *t*-Test. C) *EpoR*-mRNA-Expression in aus Mausembryonen gewonnenen Lebern und Herzen. Zehn Lebern und sieben Herzen wurden an Tag E11,5 gesammelt. Die *EpoR*-Transkripte wurden mittels real-time RT-PCR gemessen und an Gapdh-mRNA-Werten normalisiert. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung. \*P<0,005; Student's *t*-Test.

#### **3.2 *EpoR*-mRNA ist in CD117-positiven Progenitorzellen aus der fetalen Mausleber vermindert**

In der fötalen Mausleber kommt der *EpoR* sowohl auf hämatopoietischen als auch auf nicht-hämatopoietischen Zellen vor. Zur Selektion hämatopoietischer Vorläuferzellen wurde eine Magnetzellseparation nach dem Oberflächenmarker CD117 (c-kit) durchgeführt. *EpoR*-mRNA sowie die Transkripte weiterer hämatopoietischer Wachstumsfaktorrezeptoren (Thrombopoietinrezeptor, *TpoR*, c-mpl; Granulozyten-Kolonien stimulierender Faktor Rezeptor, *G-CSFR*) wurden in CD117<sup>+</sup>-Leberzellen von *Wt1*<sup>+/+</sup>-, *Wt1*<sup>+/-</sup>- und *Wt1*<sup>-/-</sup>-Mausembryonen mittels real-time RT-PCR analysiert. Im Vergleich zu *Wt1*<sup>+/+</sup>- und *Wt1*<sup>+/-</sup>-Vorläuferzellen, die keine messbaren Unterschiede aufwiesen, war das *EpoR*-mRNA-Niveau in *Wt1*-defizienten CD117<sup>+</sup>-Zellen signifikant um 36±16% vermindert (Abb. 6). Um auszuschließen, dass die verminderte *EpoR*-mRNA Folge einer generellen Hemmung der Genexpression bei *Wt1*-Defizienz war, wurden zusätzlich die Transkripte für *TpoR* und *G-CSFR* analysiert. Hierbei ergaben sich keine signifikanten Unterschiede im *TpoR*- bzw. *G-CSFR*-mRNA-Niveau zwischen *Wt1*<sup>+/+</sup>-, *Wt1*<sup>+/-</sup>- und *Wt1*<sup>-/-</sup>-CD117<sup>+</sup>-Zellen. Wie zu erwarten, war auch der mRNA-Gehalt des selektierten c-kit (CD117) nicht signifikant verschieden (Abb. 6). Weiterhin wurden keine signifikanten Unterschiede im mRNA-Niveau von *Gata-1* und *Sp1*, zweier für die *EpoR*- Expression wichtiger Transkriptionsfaktoren (Zon et al., 1991; Chiba et al., 1991; Chin et al., 1995), zwischen *Wt1*<sup>+/+</sup>-, *Wt1*<sup>+/-</sup>- und *Wt1*<sup>-/-</sup>-Zellen festgestellt (Abb. 6).

### 3. Versuchsergebnisse



**Abbildung 6: Genexpression in CD117-positiven hämatopoietischen Vorläuferzellen aus  $Wt1^{+/+}$ ,  $Wt1^{+/-}$  und  $Wt1^{-/-}$ -Mausembryonen.** Real-time RT-PCR-Analyse der Genexpression frisch isolierter CD117<sup>+</sup>-Zellen aus Lebern  $Wt1^{+/+}$ -,  $Wt1^{+/-}$ - und  $Wt1^{-/-}$ -Mausembryonen am Tag E11,5. Die Transkripte wurden an *Gapdh*-mRNA-Werten normalisiert und in  $Wt1^{+/+}$ -Embryonen als 1 definiert. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung. \* $P < 0,01$ , Student's *t*-Test. Die *EpoR*-Transkripte waren in  $Wt1^{-/-}$ -Embryonen im Vergleich zu  $Wt1^{+/-}$ - und  $Wt1^{+/+}$ -Embryonen um  $\sim 40\%$  reduziert. Kontrastierend dazu zeigten die Rezeptoren für Thrombopoietin (*c-mpl*), Granulozyten-Kolonien stimulierender Faktor (*G-CSFR*) und Stammzellfaktor (*c-kit*) in allen Gruppen ein ähnliches Expressionsniveau. Ebenfalls fand sich kein Unterschied in der Expression von *Gata-1* und *Sp1*, zwei Aktivatoren des *EpoR*-Gens (Zon et al., 1991; Chiba et al., 1991; Chin et al., 1995) zwischen  $Wt1^{+/+}$ -,  $Wt1^{+/-}$ - und  $Wt1^{-/-}$ -hämatopoietischen Vorläuferzellen.

### 3.3 $Wt1$ -defiziente hämatopoietische Progenitorzellen zeigen eine verminderte Proliferation nach Stimulation mit rekombinantem Erythropoietin (rhEpo)

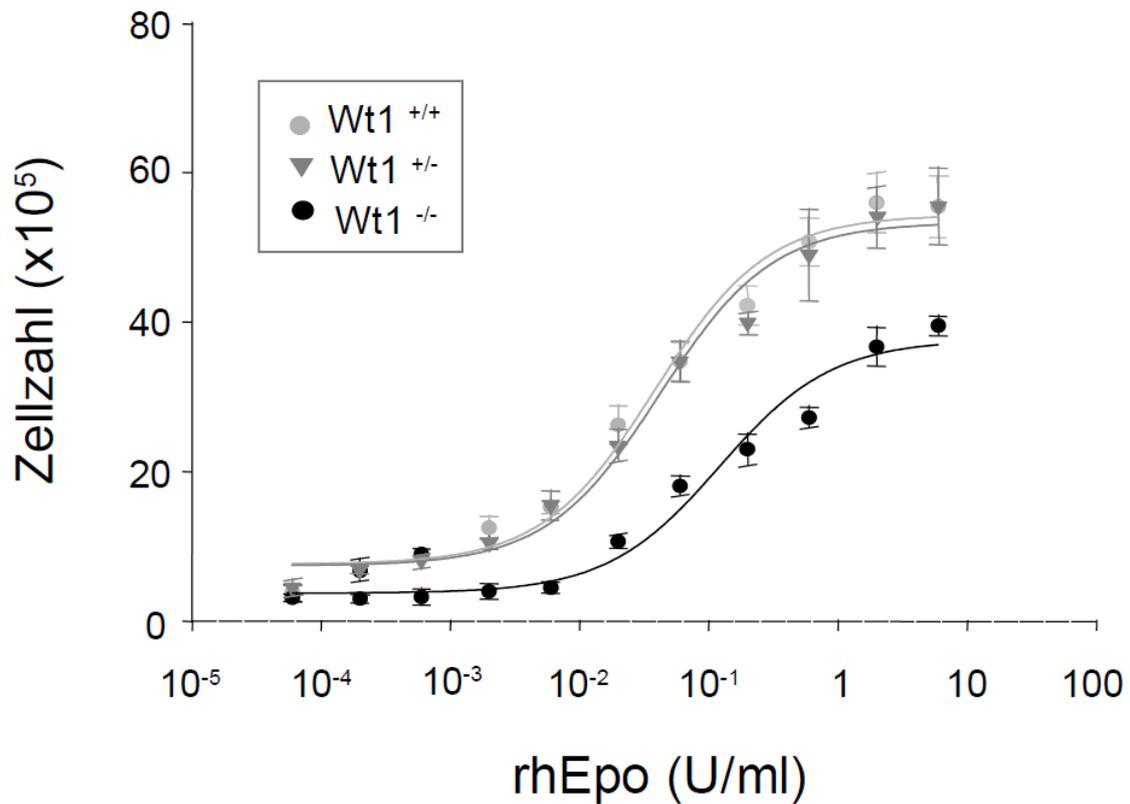
Im nächsten Versuchsabschnitt wurden mögliche funktionelle Konsequenzen einer verminderten *EpoR*-Expression in  $Wt1$ -defizienten Progenitorzellen untersucht. Dazu wurden CD117-positiv (*c-kit*) hämatopoietische Vorläuferzellen aus den Lebern von

### 3. Versuchsergebnisse

Wildtypen ( $Wt1^{+/+}$ ) sowie von  $Wt1$ -heterozygoten ( $Wt1^{+/-}$ ) und homozygoten ( $Wt1^{-/-}$ ) Embryonen (E11,5) mittels Magnetseparation isoliert, in Kulturschalen ausgesät ( $10^5$  Zellen pro Kammer) und zwei Tage lang in Gegenwart von rekombinantem humanem Epo ( $10^{-5}$  bis 6 IU/ml) kultiviert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Zellzahlen in einer Neubauer-Zählkammer.

Rekombinantes humanes Epo bewirkte dosisabhängig eine Zunahme der Zellzahl, wobei die charakteristische s-förmige Dosis-Wirkungskurve für  $Wt1$ -defiziente Progenitorzellen nach rechts, d.h. zu höheren rhEpo-Konzentrationen, verschoben war (Abb. 7). Die EC50-Werte einer halbmaximal wirksamen Epo-Konzentration betragen 38, 43 und 122 mU/ml für CD117<sup>+</sup>-Zellen aus  $Wt1^{+/-}$ ,  $Wt1^{+/-}$  und  $Wt1^{-/-}$ -Embryonen. Auch bei Inkubation mit maximal wirksamer rhEpo-Dosis (1-6 U/ml) blieb die Zahl  $Wt1$ -defizienter hämatopoietischer Progenitorzellen im Vergleich zu normalen ( $Wt1^{+/+}$ ) bzw. heterozygoten ( $Wt1^{+/-}$ ) Zellen signifikant erniedrigt (Abb. 7). In Abwesenheit von rhEpo war unabhängig vom genetischen Status der Zellen keine Proliferation nachweisbar (Daten nicht gezeigt).

### 3. Versuchsergebnisse



**Abbildung 7: Einfluss von rekombinantem humanem Erythropoietin (rhEpo) auf die Proliferation hämatopoietischer Progenitorzellen aus *Wt1*<sup>+/+</sup>, *Wt1*<sup>+/-</sup> und *Wt1*<sup>-/-</sup>-Mausembryonen (E11,5).** Die Zellen wurden in einer Dichte von 1x10<sup>5</sup> pro Kulturschale gesät und in der Anwesenheit von rhEpo (10<sup>-5</sup> bis 6,0 IU/ml Medium) kultiviert. Nach zwei Tagen wurden die Zellen gezählt. Die Messpunkte repräsentieren die Mittelwerte ± Standardabweichung von vier verschiedenen Kulturen und der jeweiligen rhEpo-Konzentration. Die Dosis-Wirkung-Kurve stellt eine Anpassung gemäß der Methode der kleinsten Quadrate dar. In *Wt1*<sup>-/-</sup> CD117<sup>+</sup>-Zellen ist eine Verschiebung der Kurve zu höheren rhEpo-Konzentrationen erkennbar, was auf eine reduzierte Proliferationskapazität der hämatopoietischen Vorläuferzellen in Abwesenheit von *Wt1* hinweist.

#### 3.4 *Wt1* und *EpoR* werden in CD117-positiven fetalen Leberzellen und hämatopoietischen Zelllinien koexprimiert

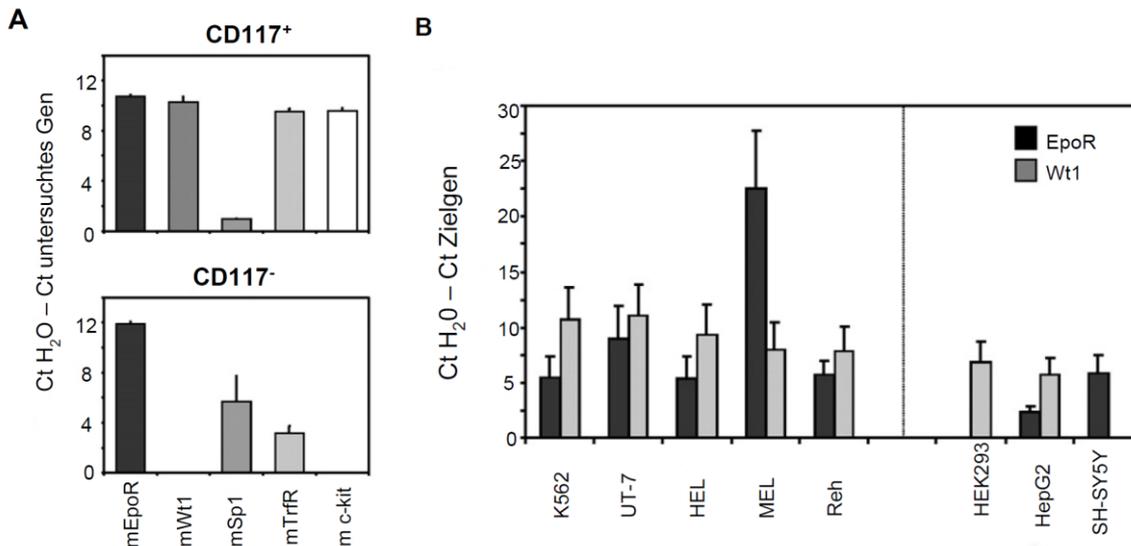
Eine Regulation des *EpoR*-Gens durch *Wt1* setzt voraus, dass beide Moleküle auf zellulärer Ebene koexprimiert werden. Um das Vorkommen von *EpoR* und *Wt1* in hämatopoietischen und nicht-hämatopoietischen Zellen zu ermitteln, wurden CD117-positive und CD117-negative Zellen aus Lebergewebe von normalen Mausembryonen (E11,5) isoliert. Der mRNA-Nachweis erfolgte durch real-time RT-PCR. Die Expression des Selektionsmarkers *c-kit* in CD117<sup>+</sup>- nicht jedoch in CD117<sup>-</sup>-Zellen dokumentiert die Zuverlässigkeit des verwendeten Separationsverfahrens (Abb. 8A). Während *Wt1*-

### 3. Versuchsergebnisse

mRNA ausschließlich in CD117<sup>+</sup>-Zellen nachweisbar war, wurden *EpoR*-Transkripte sowohl in CD117<sup>+</sup>- als auch in CD117<sup>-</sup>-Zellen detektiert (Abb. 8A). Der hämatopoietische Ursprung CD117-positiver Zellen wird aus der Anreicherung von Transferrinrezeptor (TrfR) -mRNA im Vergleich zu CD117<sup>-</sup>-Zellen ersichtlich (Abb. 8A). Das mRNA-Niveau des ubiquitär vorkommenden Transkriptionsfaktors Sp1, der als wichtiger Stimulus für die EpoR Expression identifiziert wurde (Chin et al., 1995), war in CD117-negativen Zellen signifikant höher als in CD117-positiven Zellen (Abb. 8A).

Zusätzlich zu primären fetalen Leberzellen wurde die Expression von *Wt1* und *EpoR* auch in verschiedenen hämatopoietischen und nicht-hämatopoietischen Zelllinien untersucht. Mittels real-time RT-PCR konnten *Wt1*- und *EpoR*-Transkripte gemeinsam in allen Zelllinien hämatopoietischen Ursprungs nachgewiesen werden (Abb. 8B). Die untersuchten Zelllinien umfassten humane (Erythro)leukämiezellen (K562, UT-7, HEL, Reh) sowie eine Erythroleukämieinie aus der Maus (MEL). Im Gegensatz dazu waren in der humanen embryonalen Nierenzelllinie HEK293 und in der Neuroblastomlinie SH-SY5Y entweder ausschließlich *Wt1*- oder *EpoR*-Transkripte nachweisbar (Abb. 8B). Diese Resultate dokumentieren, dass *Wt1* und *EpoR* in CD117<sup>+</sup>-Zellen aus der fetalen Mausleber sowie in verschiedenen Zelllinien hämatopoietischen Ursprungs koexprimiert werden.

### 3. Versuchsergebnisse



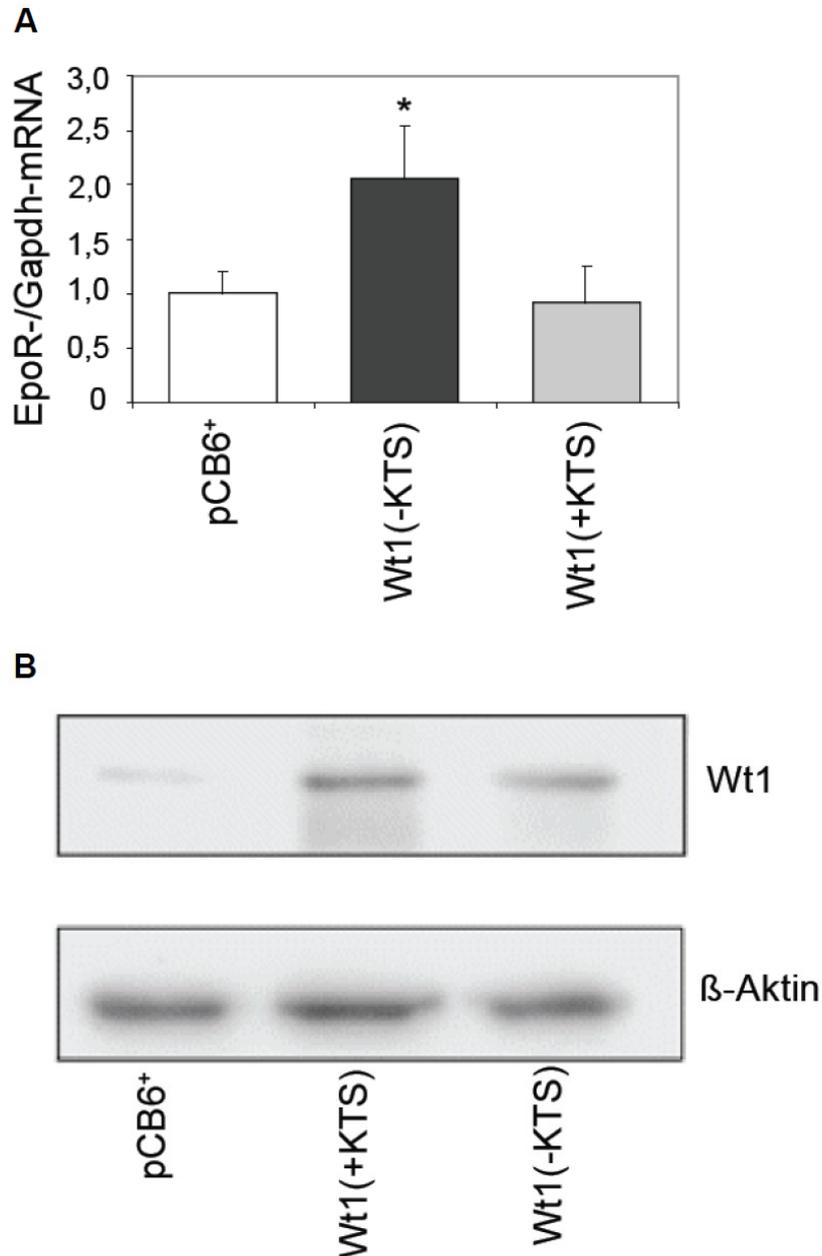
**Abbildung 8: Genexpression in fötalen Leberzellen der Maus (A) und in verschiedenen hämatopoietischen bzw. nicht-hämatopoietischen Zelllinien (B).** CD117<sup>+</sup>- und CD117<sup>-</sup>-Zellen wurden magnetisch aus Lebern dreier Wildtyp-Embryonen der Maus an Tag E11,5 sortiert. A) In CD117<sup>+</sup>-Zellen nicht aber in CD117<sup>-</sup>-Zellen wurden *Wt1*-Transkripte detektiert. Umgekehrt waren *Sp1*-mRNA-Werte in CD117<sup>-</sup>-Zellen signifikant höher als in CD117<sup>+</sup>-Zellen. Die Wirksamkeit, hämatopoietische Vorläuferzellen zu selektieren wird durch die höheren Werte an Transferrinrezeptor-mRNA (*Trf-R*) in CD117<sup>+</sup>-Zellen im Vergleich zu CD117<sup>-</sup>-Zellen dokumentiert. B) Obwohl *Wt1*- und *EpoR*-mRNA in allen hämatopoietischen Zelllinien, inklusive humaner Erythroleukämie- (K562, HEL, UT-7), Leukämie- (Reh) und Erythroleukämiezellen aus Nagetieren (MEL) detektierbar war, exprimierten in den untersuchten nicht-hämatopoietischen Zellen nur HepG2-Zellen ebenfalls beide Gene.

### 3.5 Transiente Expression von *Wt1*(-KTS) stimuliert die *EpoR*-mRNA-Expression in menschlichen Hepatomzellen (HepG2)

Um zu überprüfen, ob *Wt1* die Expression des *EpoR*-Gens *in vitro* stimuliert, wurden humane Hepatomzellen (HepG2) mit verschiedenen *Wt1*-Expressionskonstrukten transient transfiziert. HepG2-Zellen wurden aufgrund ihrer im Vergleich zu hämatopoietischen Zelllinien deutlich besseren Transfizierbarkeit gewählt. Tatsächlich konnte durch Transfektion mit *Wt1*-Expressionskonstrukten das endogene *Wt1*-Niveau in verschiedenen Zelllinien hämatopoietischen Ursprungs nicht gesteigert werden (Daten nicht gezeigt). HepG2-Zellen, die verschiedentlich auch als Modell für die Regulation der hepatischen Epo-Produktion verwendet wurden (Goldberg et al., 1987), eignen sich auch aufgrund der Koexpression von *Wt1* und *EpoR* für die Transfektionsversuche (Abb. 8B). Transfektion mit der *Wt1*(-KTS)-Form, die als Transkriptionsfaktor wirksam ist (Charlieu et al., 1995), bewirkte im Vergleich zur

### 3. Versuchsergebnisse

Transfektion mit „Leervektor“ (pCB6<sup>+</sup>) innerhalb von 48 Stunden eine Verdopplung der endogenen EpoR-mRNA in HepG2-Zellen (Abb. 9). Hingegen resultierte die Transfektion von Wt1(+KTS), einer Proteinvariante, die vermutlich bei der posttranskriptionalen Genregulation eine Rolle spielt (Larsson et al., 1995), keine signifikante Veränderung der EpoR-mRNA (Abb. 9).

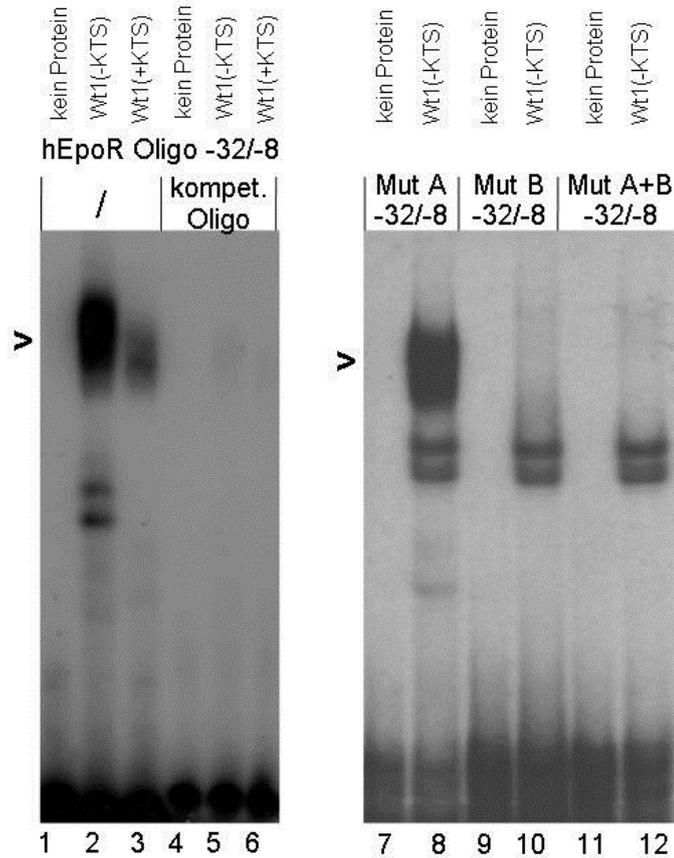


**Abbildung 9: EpoR-mRNA (A) und Wt1-Protein (B) in transient transfizierten HepG2-Zellen.** A) *EpoR*- und *GAPDH*-Transkripte wurden mittels real-time RT-PCR 48 Stunden nach transienter Transfektion von HepG2-Zellen mit Expressionsplasmiden für Wt1(-KTS), Wt1(+KTS) und leerem Vektor (pCB6<sup>+</sup>) bestimmt. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte ± Standarddeviation von vier unabhängigen Experimenten. \*P < 0,005; ANOVA. B) Die Westernblot-Analyse bestätigt die Expression von Wt1.

#### **3.6 Wt1 bindet *in vitro* und *in vivo* an den *EpoR*-Promotor**

Die Zunahme der *EpoR*-Transkripte in HepG2-Zellen nach Transfektion mit der Wt1(-KTS)-, nicht jedoch mit der WT1(+KTS)-Variante, deutet auf einen transkriptionalen Wirkungsmechanismus hin. Um zu überprüfen, ob das Wt1-Protein an den proximalen *EpoR*-Promotor bindet, wurden Elektrophoresemobilitätsshiftassays (EMSAs) durchgeführt. Aufgrund der hohen Sequenzhomologie mit bekannten Wt1-Bindungsstellen in anderen Genen wurden verschiedene doppelsträngige DNA-Oligonukleotide, die den Bereich der Nukleotide von -119 bis -8 relativ zum Transkriptionsstartpunkt abdeckten, für die Untersuchungen gewählt. Für die Bindungsreaktion wurden die Oligonukleotide endständig mit  $^{32}\text{P}$  markiert und mit rekombinantem Wt1(-KTS) bzw. WT1(+KTS) unter geeigneten Bedingungen inkubiert. In den Untersuchungen wurde ein aus 25 Basenpaaren bestehendes Oligonukleotid (Oligo-32/-8) identifiziert, das eine höhere Bindungsaffinität für das Wt1(-KTS)- als für das Wt1(+KTS)-Protein aufwies (Abb. 10, Spuren 2 und 3). In Abwesenheit von Wt1-Protein wurde keine spezifische Retardierungsbande beobachtet (Abb. 10, Spur 1). Die Bindung von Wt1-Protein an Oligo -32/-8 wurde durch Inkubation mit einem Oligonukleotid aus dem humanen Epo-Promotor kompetitiv abgeschwächt (Abb. 10, Spuren 4-6). Innerhalb der Wt1-bindenden Sequenz (Oligo-32/-8) wurden zwei Motive näher charakterisiert. Das Einbringen einer Doppelbasenpaarmutation in die Positionen -22/-21 (Mutation A) hatte keinen erkennbaren Einfluss auf die Bindung von Wt1(-KTS)-Protein (Abb. 10. Spuren 7 und 8). Hingegen verursachte eine Mutation der Positionen -17 bis -15 (Mutation B) ebenso wie die Kombination beider Mutationen (Mutation A/B) einen Verlust der Affinität für Wt1(-KTS) (Abb. 10. Spuren 9-12).

### 3. Versuchsergebnisse



**Abbildung 10: Elektrophoresemobilitätshifftassay (EMSA) zum Nachweis einer Interaktion von Wt1-Protein mit dem *EpoR*-Promotor.** Der dargestellte EMSA zeigt die Bindung des rekombinanten Wt1(-KTS)-Proteins an das 25-Basenpaar lange Oligonukleotid (Oligo -32/-8) des humanen *EpoR*-Promotors (Spur 2) Der Pfeil (>) deutet auf die spezifische Wt1-Bindung. Das Wt1(+KTS)-Protein, welches eher eine Rolle in der Prozessierung der RNA als in der transkriptionalen Regulation übernimmt (Larsson et al., 1995) zeigt eine deutlich reduzierte Interaktion mit Oligo -32/-8 (Spur 3). Die Inkubation des Wt1(-KTS)- oder Wt1(+KTS)-Proteins mit einem Oligonukleotid des *Epo*-Gen-Promotors bestätigt die Spezifität der Wt1-Bindung an den humanen *EpoR*-Promotor (Spur 5 und 6). Mutationen (Mutante B und Mutante A/B) in das Oligonukleotid -32/-8 führten zur Aufhebung der Bindung des Wt1-Proteins (Spur 10 und 12), während die Affinität für Wt1(-KTS) in Mutante A bestehen bleibt (Spur 8).

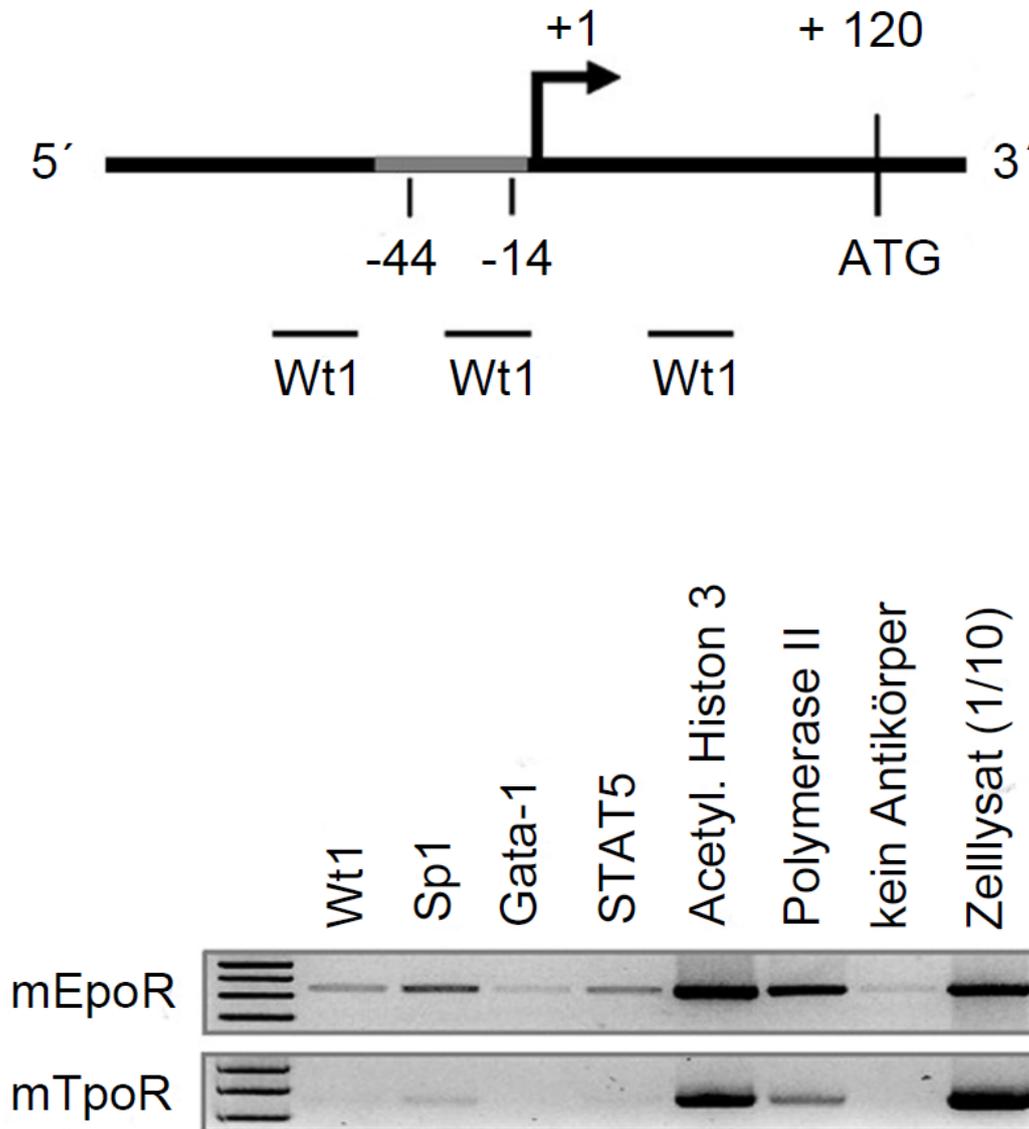
### 3. Versuchsergebnisse

**Tabelle 7: Sequenzen der Oligonukleotide für den EMSA**

Oligo -32/-8	5'-GAGTGCTGGCCCCGCCCCCTCGGGG-3'
Oligo -32/-8 (Mutation A)	5'-GAGTGCTGGC <u>AA</u> CGCCCCCTCGGGG-3'
Oligo -32/-8 (Mutation B)	5'- CCCCAGAG <u>TTT</u> GCGGGGCCAGCACTC-3'
Oligo -32/-8 (Mutation C)	5'-GAGTGCTGGC <u>AA</u> CGC <u>AAA</u> CTCGGGG-3'

Mittels Chromatinimmunpräzipitationsassay (ChIP) wurde überprüft, ob das Wt1-Protein auch bei erhaltenem chromosomalen Kontext an den proximalen *EpoR*-Promotor bindet. Die Versuche wurden mit frisch isolierten Zellen aus der fetalen Mausleber (E11,5) durchgeführt, die zu diesem Entwicklungszeitpunkt den Hauptort der Hämatopoiese darstellt. Das in Abb. 11 gezeigte repräsentative Agarose-Gel dokumentiert, dass Wt1 an den proximalen *EpoR*-Promotor bindet. Als Positivkontrolle erfolgte der Nachweis einer Bindung von acetyliertem Histon 3 sowie RNA Polymerase II. Eine Bindung an den *EpoR*-Promotor wurde auch für die Faktoren Sp1, Gata-1 und STAT5 nachgewiesen (Abb. 11). Hingegen besaßen weder Wt1 noch Gata-1 und STAT5 eine nachweisliche Aktivität für den Thrombopoietinrezeptor-Promotor (*TpoR*). Der letzte Befund befindet sich in Übereinstimmung mit dem normalen *TpoR*-mRNA-Niveau in CD117<sup>+</sup>-Progenitorzellen aus Wt1-defizienten Mausembryonen (Abb. 6).

### 3. Versuchsergebnisse



**Abbildung 11: Chromatinimmunpräzipitationsassay (ChIP) zum Nachweis der Bindung des Wt1-Proteins an den proximalen *EpoR*-Promotor.** Oben: Schematische Darstellung der untranslatierten *EpoR* 5'-Region. Der Pfeil markiert die Transkriptionsstartstelle (+1), ATG das Startkodon. Die Lage der Nukleotide ist relativ zur Transkriptionsstartstelle entsprechend der Referenzsequenz (NCBI X53081) angegeben. Die ChIP-Analyse der Proteininteraktion mit dem *EpoR*-Gen wurde in frisch präparierten fetalen Mauseberzellen (E11,5) durchgeführt. Kontrolleexperimente wurden durch Amplifikation einer Sequenz im Thrombopoietinrezeptor -Promotor (mTpoR) der Maus durchgeführt. Die Abbildung zeigt die mittels PCR amplifizierten Produkte der Immunkomplexe, welche in einem 1,5%igen Agarose-Gel elektrophoresiert und mit Ethidium-Bromid gefärbt wurden. Zur besseren Visualisierung wurde das Gel fotografiert und als Negativ des Originals dargestellt. Zusätzlich interagierten auch Wt1, Sp1, GATA-1 und STAT5 *in vivo* mit dem *EpoR*-Promotor.

#### 3.7 Das Wt1(-KTS)-Protein aktiviert den *EpoR*-Promotor

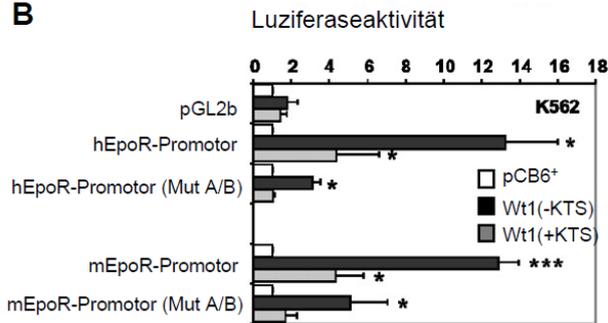
Um zu überprüfen, ob Wt1 den *EpoR*-Promotor transaktiviert, wurden Luziferase-Reporterassays in humanen embryonalen Nierenzellen (HEK293) und Erythroleukämiezellen (K562) durchgeführt. Für die Experimente wurden sowohl ein humanes *EpoR*-Promotorreporterkonstrukt (-309 bis +4 Nukleotide relativ zum Transkriptionsstart) als auch ein Konstrukt mit der murinen *EpoR*-Promotorsequenz (-180 bis +17 Nukleotide relativ zum Transkriptionsstart) verwendet. Als „Negativkontrolle“ wurde der pGL2basic-Reportervektor transfiziert. Im Vergleich zur Kotransfektion von „leerem“ Expressionsplasmid (pCB6<sup>+</sup>) verursachte das Wt1(-KTS)-Protein sowohl in K562- als auch in HEK293-Zellen eine signifikante Zunahme der Aktivität beider *EpoR*- Promotorkonstrukte. Ein Anstieg der Reporteraktivität wurde in K562-Zellen, nicht jedoch in HEK293-Zellen, auch nach Kotransfektion von Wt1(+KTS) beobachtet (Abb. 12). Um zu ermitteln, welche Bereiche der *EpoR*-Promotorsequenz für eine Stimulation durch WT1(-KTS) nötig sind, wurden dieselben Basenpaarmutationen in die *EpoR*-Promotorkonstrukte eingefügt (Mutation A/B), die bereits zuvor in den EMSAs verwendet wurden. Die Mutation des humanen *EpoR*-Promotorkonstruktes hatte einen Verlust der Induzierbarkeit durch Wt1(-KTS) in HEK293-Zellen zur Folge (Abb. 12C). Die Aktivität des mutierten Konstruktes wurde durch Kotransfektion von Wt1(-KTS) in K562-Zellen statistisch signifikant verstärkt (Abb. 12B). Ebenso wurden die mutierten *EpoR*-Promotorkonstrukte der Maus durch Kotransfektion von Wt1(-KTS) in K562- und HEK293-Zellen signifikant stimuliert. Allerdings war bei den mutierten Konstrukten die Zunahme der Reporteraktivität nach Kotransfektion von Wt1(-KTS) deutlich geringer als bei Verwendung der nicht-mutierten Konstrukte (Abb. 12). Zusammengefasst dokumentieren diese Ergebnisse, dass Wt1 an den proximalen Promotor des *EpoR*-Gens bindet und diesen transaktiviert.

### 3. Versuchsergebnisse

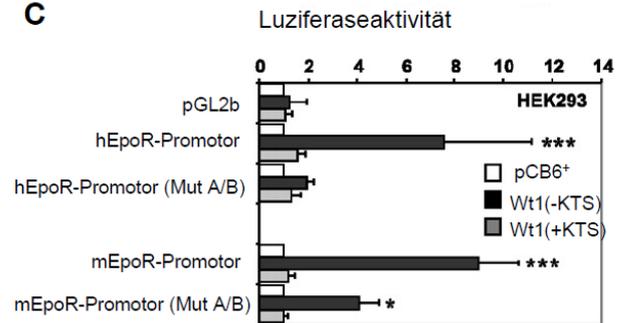
**A**

hEpoR TTATCTCTACCCAGGCTG – AGTGCTGGCCCCGCCCCCTCG-GGGATCTGCCAC  
 mEpoR TTATCTGTCCCCAGCCTGCAAAGCTGGCCCCGCCCCCTGGAAGGAGCTGCCAC  
 Mut A/B GCAAAGCTGGCCAAGCAAAGCTGGAAG

**B**



**C**



**Abbildung 12: Aktivierung des *EpoR*-Promotors durch Wt1(-KTS).** A) Sequenz des humanen und murinen *EpoR*-Promotor-Fragments, welches die CG-reiche Wt1-Bindungsstelle, die in EMSA- und CHIP-Versuchen identifiziert wurde, enthält (s. Abb. 6, 7). B, C) Reporterkonstrukte, die die humane oder murine *EpoR*-Promotorsequenz enthalten, wurden zusammen mit Plasmiden für Wt1(-KTS), Wt1(+KTS) oder dem leeren Vektor (pCB6<sup>+</sup>) transient in erythroide K562- (B) und HEK293-Zellen (C) transfiziert. Ein Renilla-Luziferase-Vektor diente der Normalisierung der Transfektionseffizienz. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standarddeviation von insgesamt fünf unabhängigen Experimenten, von denen jedes jeweils in zweifacher Ausfertigung durchgeführt wurde. \*P<0,05, \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001; ANOVA.

### 4. Diskussion

#### 4.1 Bedeutung von Wt1 für die Hämatopoiese

Das Wilmstumoren Wt1 kodiert ein Zinkfingerprotein, das neben seiner Funktion als Tumorsuppressor auch für die normale Embryonalentwicklung notwendig ist. Auffälliges Merkmal von Mausmutanten mit homozygoter *Wt1*-Inaktivierung (*Wt1*<sup>-/-</sup>) ist ein Ausbleiben der Nieren- und Gonadendifferenzierung (Kreidberg et al., 1993). Da *Wt1*<sup>-/-</sup>-Embryonen ab dem 12. Entwicklungstag letal sind (Kreidberg et al., 1993; Herzer et al., 1999), eignen sie sich nur begrenzt für Untersuchungen zur Rolle von Wt1 im blutbildenden System. Hinweise auf einen Zusammenhang von Wt1 und der Hämatopoiese ergeben sich sowohl aus experimentellen Untersuchungen als auch aus klinischen Beobachtungen. So konnte nachgewiesen werden, dass *Wt1*-defiziente hämatopoietische Progenitorzellen im Vergleich zu intakten (*Wt1*<sup>+/+</sup>) Vorläufern ein um ca. 75% reduziertes Potential zur Ausbildung von BFU-E, CFU-E- und CFU-GEMM aufweisen (Alberta et al., 2003). In der gleichen Arbeit wurde gezeigt, dass durch Injektion *Wt1*-defizienter fetaler Leberzellen in letal bestrahlte Mäuse die Hämatopoiese zwar ermöglicht wird, jedoch trugen *Wt1*<sup>-/-</sup>- Stammzellen in Maus-Chimären nicht zur Ausbildung des hämatopoietischen Systems bei (Alberta et al., 2003). Allerdings konnte in einer ähnlich angelegten Untersuchung bezüglich der Hämatopoiese kein signifikanter Unterschied zwischen fetalen Leberzellen von Wildtyp- und *Wt1*<sup>-/-</sup>-Embryonen festgestellt werden (King-Underwood et al., 2005). Die kontroversen Ergebnisse dieser beiden Arbeiten könnten in den unterschiedlichen Studienbedingungen und der genetischen Heterogenität (C57/BL6- bzw. CBA-Mausstämme) der verwendeten Tiere begründet sein. Möglicherweise wird die Funktion von Wt1 während der Hämatopoiese in Nagetieren durch weitere Gene beeinflusst. Diese Hypothese wird durch die Beobachtung gestützt, dass Fehlbildungen der Milz bei *Wt1*-Defizienz von der genetischen Ausstattung der Mäuse abhängig waren (Herzer et al., 1999).

#### 4.2 Wt1 in Leukämiezelllinien und Leukämien

*Wt1*-Mutationen wurden nicht nur in Wilms-Tumoren, sondern auch in kolorektalen

#### 4. Diskussion

Tumoren (Koesters et al., 2004), desmoplastischen Rundzelltumoren (Amini et al., 2005), Mamma-Karzinomen (Loeb et al., 2001), Hirntumoren (Oji et al., 2004) und Leukämien gefunden (Scharnhorst et al., 2001).

In bezug auf letztere wurde die Expression von Wt1 sowohl in myeloischen und lymphatischen Leukämien des Kindes- und Erwachsenenalters, als auch *in vitro* in myeloischen und lymphoiden Leukämiezelllinien beobachtet (Miwa et al., 1992; Miyagi et al., 1993).

In der Diskussion ist aktuell unklar, wann genau im Rahmen der Leukämogenese es zur Expression von Wt1 kommt, und ob die Wt1-Expression aus den Progenitorzellen der jeweiligen Leukämiezellen hervorgeht oder als Teil eines Transformationsprozesses zu deuten ist (Algar et al., 2002).

Fraizer und Menssen fanden eine Expression von Wt1 nur in Stadien der frühen Wachstumsphase klonaler Stammzellpopulationen (Fraizer et al., 1995; Menssen et al. 1997). Phelan und Sekiya beobachteten in leukämischen Zelllinien eine Abnahme von Wt1 mit einsetzender Differenzierung (Phelan et al., 1994; Sekiya et al., 1994), und jüngere Studien hierzu wiesen in leukämischen Zelllinien und Knochenmark-Vorläuferzellen eine gestörte Zelldifferenzierung infolge stabiler exogener Wt1-Expression nach (Carrington und Algar 2000; Svedberg et al., 1998; Deuel et al., 1999). Demnach könnte die Expression von Wt1 mit einem undifferenzierten Zell-Phänotyp assoziiert sein, in dem Wt1 ausgeschaltet werden muss, damit die Zelle reift.

Andererseits zeigten Smith und Kollegen, dass die Isoform Wt1(+KTS) die Differenzierung promyeloischer Zelllinien zu Monozyten förderte (Smith et al., 1998). Und Ellisen et al. beobachteten, dass Wt1(-KTS) die myeloische Differenzierung leukämischer Zelllinien aktiviert, statt hemmt (Ellisen et al., 2001).

Ob Wt1 als Repressor oder Aktivator wirkt, scheint abhängig von einer Vielzahl von Faktoren zu sein. Es ist anzunehmen, dass z. B. durch das Niveau der Wt1-Expression, die jeweils vorliegende Wt1-Isoform, die Lokalisation der jeweiligen Transkriptionsstartstelle im Verhältnis zur DNA-Bindungsstelle und durch den jeweiligen Zelltyp in dem ein Experiment durchgeführt wird, Einfluss auf die Funktion von Wt1 im zellulären Kontext genommen wird (Reddy et al., 1995; Wang et al., 1995; Laity et al., 2000).

Von großem klinischen Interesse sind die Befunde verschiedener Studien, die eine Wt1-Expression im peripheren Blut von Leukämiepatienten mit dem Erkrankungsprogress

#### 4. Diskussion

und der Prognose in verschiedenen hämatologischen Malignomen zu korrelieren versuchten (Inoue et al., 1994; Ogawa et al., 1998; Kim et al., 1997; Tamaki et al., 1999): King-Underwood und Pritchard-Jones beschrieben 1998, dass das Vorkommen von Wt1-Mutationen bei Patienten mit akuten myeloischen Leukämien (AML) mit einem Versagen der Standardinduktionstherapie assoziiert sei (King-Underwood und Pritchard-Jones 1998). Entsprechend zeigten Patienten mit hohem Wt1-Expressionsniveau im Vergleich zu Patienten mit geringerer und fehlender Wt1-Expression bei Bergmann und Inoue eine schlechtere Überlebensrate (Bergmann et al., 1997; Inoue et al., 1994). Konsekutiv wurde der Gebrauch zytotoxischer anti-Wt1 T-Lymphozyten (CTL) zur selektiven Zerstörung Wt1-exprimierender maligner Zellen in Leukämien untersucht (Ladomery et al., 1999; Little und Wells 1997; Pelletier et al., 1991; Little et al., 1993). Hier konnte Wt1 als viel versprechendes Ziel zytotoxischer T-Lymphozyten beschrieben werden (Ohminami et al., 2000; Gao et al., 2000). Zusätzlich zeigten verschiedene Gruppen, dass das Wachstum Wt1-exprimierender Leukämiezellen durch *in vitro* Hemmung der Translation unter Verwendung von Wt1-antisense-Oligonukleotiden gegen die Startcodons des Wt1- Transkriptes gehemmt werden kann (Algar et al., 1996; Yamagami et al., 1996).

Im Gegensatz hierzu konnten die Untersuchungen von Gaiger und Schmid keinen Zusammenhang zwischen fehlendem Wt1-Nachweis und einem längeren erkrankungsfreien Intervall oder längerem Überleben feststellen und es fanden sich keine Hinweise darauf, dass Wt1 als einen Indikator für ein verkürztes erkrankungsfreies Überleben dienen könnte (Gaiger et al., 1998; Schmid et al., 1997).

Aus der Beobachtung heraus, dass in der chronischen myeloischen Leukämie (CML) die Wt1-Niveaus in der chronischen Phase gewöhnlich gering sind, aber bei Patienten im Krankheitsprogress oder der sogenannten Blasten-Krise häufig anstiegen (Miwa et al., 1992; Menssen et al., 1995) ergibt sich die Frage, ob Wt1 im Gegensatz zu seiner ihm bisher zugeschriebenen Rolle als Tumorsuppressor, onkogen wirken und notwendig für die Proliferation und das Überleben der Leukämiezellen sein könnte. Diese These wird beispielsweise dadurch unterstützt, dass in akuten Leukämien erhöhte Wt1-Level sowohl in lymphoblastischen als auch in myeloblastischen Leukämien gefunden werden konnten (Miyagie et al., 1993; Miwa et al., 1992; Menssen et al., 1995; Ostergaard et al., 2004; Brieger et al., 1994; Schmid et al., 1997). Und auch in einigen Formen des myelodysplastischen Syndroms (MDS) wurde ein erhöhtes

#### 4. Diskussion

Wt1-Niveau nachgewiesen, welches eine frühe Progression zur AML anzudeuten scheint (Tamaki et al., 1999).

Kontrastierend deutet die Tatsache, dass AML-Patienten mit Wt1-Mutationen unter besonders aggressiven Formen der Erkrankung leiden (King-Underwood et al. 1996) auf eine mögliche Funktion von Wt1 als Tumorsuppressor in der AML hin. Auch die Expression von Wt1(+KTS) in Wt1-negativen humanen myeloblastischen leukämischen Zellen, die mit einer verminderten Tumorbildung einherging, nachdem die Zellen in immunkomprimierte Mäuse injiziert wurden, passt zur Funktion von Wt1 als Tumorsuppressor in einigen AML-Formen (Smith et al., 2000).

Zusammengefasst deuten diese z.T. widersprüchlichen Beobachtungen auf eine mögliche Rolle von Wt1 als Tumorsuppressor in einigen Tumoren einerseits und als potentiell Onkogen in anderen Tumoren andererseits hin. Wt1 scheint somit, je nach Gewebe und Kontext, fördernde und hemmende Differenzierungsfunktionen während der Entwicklung zu haben. Bezüglich der teils konträren klinischen Befunde stehen groß angelegte multizentrische Kohortenstudien nach standardisierten Protokollen zum Nachweis der Wt1-Expression in klar festgelegten Leukämiesubgruppen aktuell noch aus.

#### **4.3 Rolle von Erythropoietin in der Hämatopoiese**

In Anbetracht der noch nicht vollständig geklärten Bedeutung von Wt1 für die Blutbildung ergeben sich wichtige Hinweise auf seine Funktion aus der Kenntnis von Zielgenen, die durch Wt1 in hämatopoietischen Zellen reguliert werden. In einer vorausgegangenen Publikation der Arbeitsgruppe wurde nachgewiesen, dass der hämatopoietische Wachstumsfaktor Erythropoietin (Epo) durch Wt1 transkriptional aktiviert wird. Die Kolo-kalisation von Wt1 und Epo in verschiedenen hämatopoietischen und nicht-hämatopoietischen Geweben der Maus legt nahe, dass eine Regulation des *Epo*-Gens durch Wt1 auch *in vivo* erfolgt (Dame et al., 2006).

Erythropoietin als primärer Regulator der Erythropoiese stimuliert die Zellproliferation und -differenzierung erythroider Vorläuferzellen und hemmt Apoptosevorgänge im Knochenmark, um das Überleben der erythroiden Zellen zu gewährleisten (Lacombe et al., 1999).

Hierbei wirkt Epo synergistisch mit verschiedenen Wachstumsfaktoren wie SCF, GM-

## 4. Diskussion

CSF, IL-3, IL-4, IL-9 und IGF-1 und beeinflusst neben den Zellen im Stadium der *burst-forming unit erythroid* (BFU-E) insbesondere die sogenannten *colony-forming unit erythroid* (CFU-E) im Knochenmark, deren Proliferation und Reifung zu Normoblasten es bewirkt (Gregory et al., 1974; Gregory et al., 1974; Wu et al., 1995; Lin et al., 1996). Die fötale Epo-Produktion des Menschen erfolgt hauptsächlich in den Hepatozyten und wird beim Erwachsenen durch die peritubulären Zellen der Nieren übernommen (Jacobson et al., 1957; Fisher et al., 1961; Kuratowska et al., 1961; Erslev et al., 1974; Koury et al., 1988; Fisher et al., 1996). Geringe extrarenale Epo-Mengen werden auch beim Erwachsenen zusätzlich noch durch die Leber gebildet (Zanjani et al., 1977; Koury et al., 1991). Untersuchungen von Epo- und EpoR-Knock-Out-Mäusen haben gezeigt, dass Erythropoietin unverzichtbar sowohl für die Erythropoiese als auch für die normale Entwicklung des Gehirns, des Herzens und der Blutgefäße ist. So zeigten die Herzen von Mäusen mit gestörtem Erythropoietin-System beispielsweise ventrikuläre Hypoplasien, Septumdefekte und Abnormalitäten des Gefäßnetzes (Wu et al., 1999). Bei EpoR-defizienten Tieren verläuft die Entwicklung des Gehirns normal bis zu Tag 10.5 post conceptionem, in späteren Stadien jedoch kommt es zu einer Reduktion der neuronalen Vorläuferzellen und einer gesteigerten Apoptose der Neuronen (Yu et al., 2002). Auch die Angiogenese von Epo- und EpoR-Knock-Out-Mäusen ist nach einem initial regelrechten Verlauf später gestört (Kertesz et al., 2004).

### **4.4 Klinischer Einsatz von Epo und seine Rolle in der Kardio- und Neuroprotektion**

Klinisch wird das Wissen um die Fähigkeit von Epo zur Stimulation der Erythropoiese aktuell mit Hilfe rekombinanten humanen Epos (rHuEpo) u.a. zur Behandlung von Anämien bei Patienten mit chronischen Nierenversagen (Eschbach et al., 1987; Drüeke et al., 1997), Patienten mit AIDS-Erkrankung unter antiretroviraler Medikation (Henry et al., 1992; Fischl et al., 1990) und bei Tumorpatienten unter Chemotherapie (Smith et al., 1988, Gabrilove et al., 2001a und 2001b) genutzt.

Darüber hinaus konnten Epo und sein Rezeptor auch in neuronalen Zelllinien (Masuda et al., 1993; Dame et al., 2001) und *in vivo* in Zellen des Kortex, Cerebellums, Hippocampus, Rückenmarks und in der Hypophyse nachgewiesen werden (Marti et al.,

#### 4. Diskussion

2002). Während Epo und sein Rezeptor im adulten Gehirn nur schwach exprimiert werden, kommt es unter Hypoxie und metabolischem Stress von Neuronen zu einer signifikanten Heraufregulation (Bernaudin et al., 1999; Lewzcuk et al., 2000; Marti et al., 1996; Masuda et al., 1993; Morishita et al., 1997; Sakanaka et al., 1998; Sirén et al., 2001 a,b). Verschiedene Tiermodelle zeigten, dass die Applikation von rHuEpo Läsionen nach fokaler zerebraler Ischämie und den Immunschaden in experimentellen Modellen der Multiplen Sklerose (Agnello et al., 2002) sowie in Kainat-induzierten epileptischen Anfällen verringern konnte (Brines et al., 2000). Auch erste Studien mit menschlichen Probanden, die nach zerebralen Ischämien rHuEpo injiziert bekamen, zeigten, dass die Verum-Gruppe im Vergleich zur Placebo-Gruppe bildmorphologisch im Verlauf kleinere Defektareale sowie frühere und größere Verbesserungen des klinischen Outcomes vorwies (Christensen et al., 2002; Ehrenreich et al., 2002). Die Mechanismen, durch welche Epo seine neuroprotektiven Effekte ausübt, sollen hierbei in einer Reduktion glutamaterger Toxizität (Kawakami et al., 2001), in einer Steigerung neuronaler anti-apoptotischer Faktoren (Sirén et al., 2001b), in der Verminderung Stickstoffmonoxid-vermittelter Zellschäden (Sakanaka et al., 1998), in anti-inflammatorischen Effekten (Agnello et al., 2002; Villa et al., 2003) und in anti-oxidativen Effekten (Chattopadhyay et al. 2000; Genc et al., 2002) begründet sein.

Zudem haben neuere Studien einen Einfluß von Epo auf vaskuläre Endothelzellen nachweisen können (Anagnostou et al., 1990; Ribatti et al., 1999). Auch der Epo-Rezeptor konnte *in vivo* und *in vitro* auf endothelialen Zellen nachgewiesen werden (Lappin et al., 2002). Die Interaktionen von Epo und seinem Rezeptor bewirken eine Vielzahl zellulärer Antworten in endothelialen Zellkulturen (Lappin et al., 2003; Anagnostou et al., 1990; Carlini et al., 1993 und 1995; Vogel et al., 1997). Ribatti et al. konnten nachweisen, dass Epo *in vitro* und *in vivo* eine angiogene Antwort in endothelialen Zellen bewirken kann und somit als effektiver angiogener Faktor fungiert (Ribatti et al., 1999). Klinisch relevant ist in diesem Zusammenhang ein möglicher protektiver Effekt von Epo auf vaskuläre Fibrinablagerungen, da durch die Reduktion einer bestehenden Anämie und die Korrektur der damit einhergehenden Hypoxie eine Verminderung von Fibrinablagerungen im Gefäßlumen erzielt werden könnten (Ten et al., 2002).

Jüngere Studien zeigten zudem, dass Epo essentiell für die kardiale Morphogenese ist (Cai et al., 2003; Calvillo et al., 2003; Parsa et al., 2003; Wu et al. 1999), und dass es

## 4. Diskussion

das Herz vor hypoxisch-ischämischen Läsionen *in vitro* und *in vivo* schützt: Behandelte Tiere zeigten aufgrund einer verminderten Apoptoserate eine Reduktion des myokardialen Schadens in histologischen Analysen und in der Bestimmung hämodynamischer Parameter (Parsa et al., 2003; Moon et al., 2003; Calvillo et al., 2003; Wright et al., 2004).

Trotz positiver experimenteller Daten zu den extra-erythropoietischen Effekten von Epo deutet der Vergleich der bislang publizierten Daten ebenfalls auf eine große Variabilität der Resultate, die eine klinische Anwendung aktuell noch stark einschränkt. Der Nachweis eines potentiellen Nutzens bei klarem Nebenwirkungsspektrum muss das Ziel ausführlicher klinischer Studien zur Applikation von Epo außerhalb der bereits anerkannten Anwendung in Anämien sein.

### 4.5 Regulation des *EpoR*-Gens durch *Wt1*

Die Regulation des *Epo*-Gens durch *Wt1* bietet allerdings keine hinreichende Erklärung für die beschriebenen *in vitro*-Differenzierungsstörungen *Wt1*-defizienter hämatopoietischer Progenitorzellen. Vielmehr deuten diese Beobachtungen auf einen zellautonomen Defekt von *Wt1*<sup>-/-</sup>-Vorläufern hin, der möglicherweise durch die verminderte Expression eines hämatopoietischen Wachstumsfaktorrezeptors verursacht ist. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb untersucht, ob neben Epo möglicherweise auch das *Epo*-Rezeptorgen durch *Wt1* reguliert wird. Dazu wurde zunächst überprüft, ob die Expressionsniveaus von *Wt1* und *EpoR* in verschiedenen Zellen hämatopoietischen und nicht-hämatopoietischen Ursprungs miteinander korreliert sind. In Lebergewebe *Wt1*-defizienter Mausembryonen (E11,5) wurde ein signifikant geringeres *EpoR*-mRNA-Niveau als in den entsprechenden Organen von *Wt1*<sup>+/+</sup>- und *Wt1*<sup>+/-</sup>-Embryonen festgestellt. In den Herzen der *Wt1*<sup>+/+</sup>-, *Wt1*<sup>+/-</sup>- und *Wt1*<sup>-/-</sup>-Embryonen hingegen fanden sich keine Unterschiede bezüglich des *EpoR*-mRNA-Gehaltes (s. Abb. 1C). Aufgrund der Tatsache, dass aktuell kein spezifischer Antikörper existiert, konnte eine *EpoR*-Expression auf Proteinebene nicht untersucht werden (Elliott et al., 2006; Brown et al., 2007; Kirkeby et al., 2007). Zusätzlich zu fetalen Leber- und Herzzellen wurde die Expression von *WT1* und *EpoR* noch in anderen hämatopoietischen und nicht- hämatopoietischen Zelllinien untersucht. Hierbei konnten *Wt1*- und *EpoR*-Transkripte gemeinsam in allen untersuchten Zelllinien hämatopoietischen Ursprungs

#### 4. Diskussion

nachgewiesen werden. In der humanen embryonalen Nierenzelllinie HEK293 und der Neuroblastomlinie SH-SY5Y waren hingegen entweder *Wt1*- oder *EpoR*-Transkripte nachweisbar (s. Abb. 8B). Weiterhin bewirkte die Transfektion eines *Wt1*(-KTS)-Expressionsplasmids *in vitro* eine Verdopplung der *EpoR*-mRNA in transient transfizierten Leberzellen (s. Abb. 9).

Die an etablierten Zelllinien erhobenen Befunde werden durch *in vivo* - Daten gestützt. Diese zeigen eine um ca.  $53 \pm 20$  ( $P < 0,005$ ,  $n=10$ ) verminderte *EpoR*-mRNA-Expression im Lebergewebe von *Wt1*<sup>-/-</sup>-Embryonen im Vergleich zu Wildtypen. Interessanterweise wurde die Expression von *EpoR* in *Wt1*-defizienten hämatopoietischen Vorläuferzellen nicht vollständig verhindert, sondern um ca. 40% vermindert (s. Abb. 5C). Dieser Befund deutet darauf hin, dass bezüglich der Kontrolle der *EpoR*-Expression eine funktionelle Redundanz besteht, so dass ein Verlust von *Wt1* durch andere Faktoren teilweise kompensiert werden kann. Als mögliche Kandidaten hierfür kommen die Transkriptionsfaktoren Sp1- und GATA-1 in Frage, die in *Wt1*<sup>+/+</sup>-, *Wt1*<sup>+/-</sup>- und *Wt1*<sup>-/-</sup>-CD117<sup>+</sup>-Zellen gleichmäßig stark exprimiert werden und als Transkriptionsaktivatoren des *EpoR*-Gens bekannt sind (Zon et al., 1991; Chiba et al., 1991; Chin et al., 1995).

Übereinstimmend mit diesen *in vitro*-Befunden entwickeln Mausembryonen mit einer Knock-Out-Deletion des *Wt1*-Gens gewöhnlich weniger schwerwiegende Defekte des hämatopoietischen Systems als Mäuse mit homozygoter *EpoR*-Ablation (Wu et al., 1995; Lin et al., 1996; Kieran et al., 1996).

Eine signifikante Verminderung der *EpoR*-mRNA wurde auch in CD117<sup>+</sup> fetalen Leberzellen festgestellt (s. Abb. 6). Wichtig hierbei ist, dass diese Abnahme von *EpoR*-mRNA mit keiner generellen Hemmung der Expression von pro-hämatopoietischen Faktoren in *Wt1*-defizienten CD117<sup>+</sup>-Zellen verbunden war. Andere Hämatopoiese-assoziierte Proteine, wie z.B. der Stammzellfaktorrezeptor c-kit, der Thrombopoetin-Rezeptor TpoR (c-mpl) und der Granulozyten-stimulierende-Faktor-Rezeptor G-CSFR, wurden in CD117<sup>+</sup> fetalen Leberzellen mit und ohne *Wt1* auf gleichem Niveau exprimiert (Abb. 5).

In weiteren Versuchen wurde in Reporterassays überprüft, ob *Wt1* den *EpoR*-Promotor transaktiviert. Die signifikante Zunahme der Aktivität der *EpoR*-Promotorkonstrukte durch WT1(-KTS)-Protein in K562- und HEK293-Zellen und durch WT1(+KTS) in K562-Zellen belegt, dass WT1 an den proximalen Promotor des *EpoR*-Gens bindet und diesen transaktiviert (s. Abb. 12). Mittels gezielter Mutagenese wurde

#### 4. Diskussion

das relevante *cis*-Element im *EpoR*-Promotor lokalisiert. Im EMSA konnte gezeigt werden, dass rekombinantes Wt1-Protein tatsächlich an das identifizierte *cis*-Element des humanen *EpoR*-Promotors bindet.

Allerdings blieb nachzuweisen, dass eine Interaktion von Wt1 mit dem *EpoR*-Promotor auch unter *in vivo* - Bedingungen im natürlichen chromosomalen Kontext erfolgt. Dazu wurde mittels ChIP-Assay eine Bindung von Wt1-Protein an den *EpoR*-Promotor aus frisch isolierten Zellen der fetalen Mausleber nachgewiesen (s. Abb. 11).

Die vorliegenden Resultate beschreiben nicht nur die Rolle von Wt1 in der murinen Hämatopoese, sondern erweitern auch das Verständnis der transkriptionalen Regulation des *EpoR*-Gens. Bisher wurden GATA-1 und Sp1 als die hauptsächlichsten transkriptionalen Aktivatoren des *EpoR*-Gens identifiziert (Zon et al., 1991; Chin et al., 1995). Von GATA-1 wird angenommen, dass es während der Differenzierung erythroider Vorläuferzellen zellzyklusabhängig auf die *EpoR*-Expression wirkt. Wie zuvor in logarithmisch wachsenden Epo-abhängigen Leukämiezellen (UT-7-Zelllinie) gezeigt, sinken gleichzeitig sowohl *EpoR*- als auch GATA1-, nicht aber GATA-2-mRNA in der Go/G1-Phase und nehmen später in der S- und G2/M-Phase wieder zu (Komatsu et al., 1997). Diese dynamischen Schwankungen der *EpoR*-mRNA verlaufen parallel zu Veränderungen der Bindungsaktivität von GATA-1 an den *EpoR*-Promotor. Es wurde spekuliert, dass dieser Anstieg in der *EpoR*-mRNA während der Ruhephase, wenn er durch Deprivation von Wachstumsfaktoren induziert wird, von anderen Transkriptionsfaktoren als GATA-1 abhängig ist (Komatsu et al., 1997). Übereinstimmend damit ist die Zunahme von GATA-1 allein nicht ausreichend, um den erythroiden Phänotyp während der Differenzierung beizubehalten oder zu stabilisieren (Leonard et al., 1993). Da die *EpoR*-Expression in hämatopoietischen Zellen nicht vom GATA-1-Niveau alleine abhängt, könnte Wt1 ein zusätzlicher Aktivierungsfaktor des TATA-losen *EpoR*-Promotors sein, der für die Aktivierung in diesen Zellen benötigt wird (Chin et al., 1995).

Die stadienspezifische Expression dieser Transkriptionsfaktoren während der erythroiden Differenzierung ist noch nicht vollständig verstanden. Interessanterweise scheint die Wt1-Expression in hämatopoietischen Vorläufern durch GATA-1 und c-Myb reguliert zu werden (Wu et al, 1995; Zhang et al., 1997). Das deutet an, dass die Menge an Wt1 in hämatopoietischen Vorläuferzellen durch andere Transkriptionsfaktoren, von denen einige das *EpoR*-Gen aktivieren könnten, kontrolliert wird.

#### 4. Diskussion

Um die funktionellen Auswirkungen einer verminderten EpoR-Expression infolge *Wt1*-Defizienz zu überprüfen, wurde der Einfluss von rekombinantem Epo auf hämatopoietischen Vorläuferzellen aus Wildtyp- und *Wt1*<sup>-/-</sup>-Embryonen vergleichend untersucht. Im Unterschied zu anderen Arbeitsgruppen, die eine heterogene Zellpopulation aus fetalen Nagetierlebern isolierten (Alberta et al., 2003; King-Underwood et al., 2005), wurden in den vorliegenden Versuchen ausschließlich CD117<sup>+</sup>-Vorläuferzellen verwendet. Der hämatopoietische Ursprung dieser Zellen ergibt sich aus ihrer ca. 50-fach höheren Expression der Transferrin-Rezeptor-mRNA im Vergleich zu CD117<sup>-</sup>-Zellen (Trf-R) (Abb. 8). In Übereinstimmung mit ihrer verminderten EpoR-Expression reagierten *Wt1*-defiziente CD117<sup>+</sup>-Vorläuferzellen mit einem im Vergleich zu Wildtypzellen signifikant geringeren Proliferationszuwachs auf Gabe von rhEpo (Abb. 7). Dies deutet darauf hin, dass ein reduziertes EpoR-Niveau in *Wt1*<sup>-/-</sup>-Progenitorzellen möglicherweise die Wirksamkeit von rhEpo limitiert. Allerdings ist bei dieser Interpretation zu berücksichtigen, dass in der vorliegenden Arbeit die EpoR-Expression lediglich auf mRNA-Ebene bestimmt werden konnte. Leider steht ein spezifischer EpoR-Antikörper weltweit nicht zur Verfügung (Elliott et al., 2006; Brown et al., 2007; Kirkeby et al., 2007), um geringe Mengen von EpoR-Protein auf unreifen CD117<sup>+</sup>-Zellen aus murinen fetalen Lebern nachzuweisen (Broudy et al., 1991). Aus diesem Grunde ließ sich nicht ermitteln, ob dem verminderten *EpoR*-mRNA-Gehalt eine Reduktion von Rezeptorprotein in *Wt1*-defizienten hämatopoietischen Vorläuferzellen entspricht.

Um diese Ergebnisse zu validieren, erfolgten *in vitro*-Versuche mit fötalen Leberzellen aus Wildtyp- und *Wt1*-defizienten C57/B6-Mäusen. Dabei wurde die Bildung hämatopoietischer Kolonien und die Beladung von *Wt1*<sup>+/+</sup>- und *Wt1*<sup>-/-</sup>-Zellen mit Hämoglobin miteinander verglichen. Es zeigte sich, dass die fetalen *Wt1*<sup>-/-</sup>-Leberzellen signifikant weniger Kolonien bildeten und zu einer geringeren Anzahl hämoglobinpositiv waren als *Wt1*<sup>+/+</sup>- und *Wt1*<sup>+/-</sup>-Zellen (Abb. 7). Im Vergleich dazu war die Bildung erythroider Kolonien in *Wt1*-heterozygoten Zellen (*Wt1*<sup>+/-</sup>) und in fetalen Wildtyp-Leberzellen ähnlich. Diese Beobachtung widerspricht vorherigen Ergebnissen einer anderen Arbeitsgruppe, die in heterozygoten *Wt1*-Zellen aus fötalen Nagetierlebern ein reduziertes Kolonien-bildendes Potential feststellen konnte (Alberta et al., 2003), stimmt allerdings mit dem Fehlen offensichtlicher hämatopoietischer Störungen in neonatalen und adulten Mäusen mit heterozygotem *Wt1*-Gendefekt (*Wt1*<sup>+/-</sup>) überein (Kreidberg et

#### 4. Diskussion

al., 1993). Möglicherweise hat eine *Wt1*-Heterozygotie keine Veränderungen der *EpoR*-Expression in hämatopoietischen Progenitorzellen zur Folge, bzw. ist eine in geringgradig reduzierte *Epo*-Rezeptorexpression ausreichend, um eine basale Proliferationsaktivität aufrechtzuerhalten (Sawyer et al., 1987; Philo et al., 1996). Da Überexpression von *Wt1* mit einer gestörten Hämatopoiese assoziiert ist (Ellisen et al., 2001; Svedberg et al., 2001), weisen die vorliegenden Daten darauf hin, dass ein bestimmter *Wt1*-Schwellenwert für die normale Differenzierung einer Abstammungslinie hämatopoietischer Vorläuferzellen nötig ist. Ein solcher dosisabhängiger Effekt eines transkriptionalen Regulators ist für andere Faktoren der Hämatopoiese, wie z.B. *GATA 3*, bereits bekannt (Chen et al. 2001; Pandolfi et al., 1995).

Zusammenfassend bestätigt diese Arbeit die Rolle von *Wt1* in der ungestörten hämatopoietischen Entwicklung der Maus und erweitert das Verständnis der transkriptionalen Regulation des *EpoR*-Gens. *EpoR* wird als das erste Zielgen von *Wt1* in der hämatopoietischen Zytokinrezeptorsuperfamilie identifiziert. Erstmals wird die direkte Regulation der *EpoR*-Expression durch *WT1(-KTS)* in hämatopoietischen Vorläuferzellen nachgewiesen. Dies könnte dazu beitragen, die Funktion von *Wt1* in malignen Erkrankungen des blutbildenden Systems besser zu verstehen.

Aktuell unterstützen unsere Daten keine Rolle von *Wt1* in der *EpoR*-Genexpression nicht-erythroider Gewebe wie dem Herzen (Abb. 7). Damit übereinstimmend scheint die Regulation von *Wt1* und *EpoR* in nicht- hämatopoietischen Zellen nicht eng miteinander verknüpft zu sein, während beide Gene in allen hämatopoietischen Zelllinien, die in dieser Arbeit untersucht wurden, koexprimiert werden (Abb. 8B). Eingedenk der Bedeutung von *EpoR* in der Vermittlung neuro- und kardioprotektiver Effekte von *Epo* (Noguchi et al., 2007; Fandry et al., 2006), werden zusätzliche Studien notwendig sein, um diesem Thema weiter näher zu kommen.

## 5. Zusammenfassung

Das Wilmstumoren, *Wt1*, auf dem kurzen Arm des humanen Chromosoms 11 (11p13) wurde ursprünglich als Tumorsuppressorgen identifiziert. Es kodiert ein Zinkfingerprotein, dessen alternative Spleißformen überwiegend als Transkriptionsfaktoren wirksam sind. Neben seiner Eigenschaft als Tumorsuppressor spielt *Wt1* eine zentrale Rolle in der embryonalen Entwicklung, während der es u.a. für die Ausbildung des Urogenitalsystems, des Mesothels sowie bestimmter sensorischer Neuroepithelien erforderlich ist.

Die Expression von *Wt1* in CD34-positiven hämatopoietischen Vorläuferzellen deutet auf eine bislang noch unklare Funktion bei der normalen Reifung von Blutzellen hin. Neuere Untersuchungen haben ergeben, daß *Wt1* die Transkription des *Erythropoietin*-(*Epo*)-Gens in der fötalen Mausleber aktiviert. *Epo* fördert durch Bindung an den *Epo*-Rezeptor (*EpoR*) das Wachstum hämatopoietischer Progenitorzellen, indem es deren programmierten Zelltod (Apoptose) verhindert und die Proliferation und Differenzierung stimuliert. Die *EpoR*-Expression ist essentiell für die sogenannte *definitive* Hämatopoese, und kann auf transkriptionaler und post-transkriptionaler Ebene sowie durch posttranslationale Modifikation reguliert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Hypothese geprüft, daß die Transkription des *EpoR*-kodierenden Gens durch *Wt1* stimuliert wird. Weiterhin wurde untersucht, ob eine verminderte *EpoR*-Expression bei Fehlen von *Wt1* zu einem Funktionsdefizit erythroider Vorläuferzellen beiträgt.

Die Versuchsergebnisse dokumentieren eine enge Korrelation der Expressionsniveaus von *Wt1* und *EpoR* in verschiedenen Zellen hämatopoietischen und nicht-hämatopoietischen Ursprungs. *Wt1*-defiziente, fötale CD117<sup>+</sup>-Leberzellen der Maus enthielten im Vergleich zu Zellen von heterozygoten (*Wt1*<sup>+/-</sup>) und Wildtyp-Tieren (*Wt1*<sup>+/+</sup>) signifikant weniger *EpoR*-mRNA. Auch die Fähigkeit hämatopoietischer Vorläuferzellen, erythroide Kolonien auszubilden, war bei *Wt1*-Defizienz signifikant vermindert. Im Vergleich zu hämatopoietischen Progenitorzellen von *Wt1*<sup>+/+</sup> - und

## 5. Zusammenfassung

*Wt1*<sup>+/-</sup>-Embryonen war die *in vitro* Proliferation *Wt1*-negativer CD117<sup>+</sup>-Zellen in Gegenwart von rekombinantem humanem Erythropoietin (rhEpo) signifikant reduziert. Mittels Benzidinfärbungen konnte eine signifikante Reduktion hämoglobinpositiver Zellen als Hinweis auf eine gestörte erythroide Differenzierung in den Lebern von *Wt1*<sup>-/-</sup>-Embryonen im Vergleich zu *Wt1*<sup>+/-</sup>- und *Wt1*<sup>+/+</sup>-Tieren nachgewiesen werden. Durch Kombination verschiedener zell- und molekularbiologischer Arbeitstechniken (Promotor-Reporterassays, Elektrophorese Mobilitätsshiftassay, Chromatinimmunpräzipitationsassay etc.) wurde ermittelt, daß die transkriptionskompetente *Wt1*(-KTS)-Isoform den *EpoR*-Promotor von Mensch und Maus in erythroleukämischen Zellen transaktiviert. Das hierfür verantwortliche *cis*-Element wurde in den jeweiligen Promotoren lokalisiert und identifiziert.

Die Ergebnisse dieser Arbeit beschreiben *Wt1* als neuen transkriptionalen Aktivator des *EpoR*-Gens. Gemeinsam mit der in vorangegangenen Untersuchungen nachgewiesenen Transaktivierung des *Epo*-Gens durch *Wt1* stellt die Stimulation der Transkription von *EpoR* einen wichtigen Signalmechanismus während der normalen Hämatopoese dar. Mit *EpoR* wurde erstmalig ein Mitglied der hämatopoietischen Zytokinrezeptorsuperfamilie als *Wt1*-Zielgen identifiziert und eine direkte Regulation des *EpoR*-Gens durch *Wt1*(-KTS) in hämatopoietischen Vorläuferzellen nachgewiesen. Bei Fehlen von *Wt1* resultiert eine Störung der normalen *in vitro* Differenzierung erythroider Progenitorzellen. Es bleibt abzuklären, ob eine Fehlfunktion des *Epo/EpoR*-Signalwegs für die Malignität von Leukämien mit hohem *Wt1*-Expressionsniveau mitverantwortlich ist. In Anbetracht der klinisch relevanten Bedeutung von *EpoR* als Vermittler neuro- und kardioprotektiver Effekte von *Epo* sind zusätzliche Studien erforderlich, um eine mögliche *Wt1*-abhängige Expressionskontrolle des *EpoR*-Gens in nicht-hämatopoietischen Geweben abzuklären.

## 6. Summary

Wilms' tumor gene, *Wt1*, on the short arm of human chromosome 11 (11p13) was initially identified as a tumor suppressor gene. *Wt1* encodes an approximately 50 kDa zinc finger protein, whose alternative splice forms function mainly as transcription factors. Besides its role as a tumor suppressor *Wt1* fulfills critical functions during embryonic development and is required for normal formation of the genitourinary system, mesothelium, and certain neuronal tissues.

Expression of *Wt1* in CD34-positive hematopoietic progenitor cells suggested a so far not well defined role for *Wt1* in blood cell maturation. Indeed, recent studies have shown that *Wt1* stimulates transcription of the gene encoding erythropoietin (Epo) in fetal mouse liver. Through interaction with its cognate receptor, Epo inhibits programmed death (apoptosis) and favors the proliferation and differentiation of hematopoietic progenitor cells. Expression of *EpoR*, which can be regulated at the transcriptional and post-transcriptional level as well as by post-transcriptional modification, is essential for *definitive* hematopoiesis.

The purpose of this study was to examine the hypothesis that *Wt1* stimulates transcription of the *EpoR* gene. Furthermore it was tested whether reduced *EpoR* expression would impair the normal maturation of erythroid progenitors in *Wt1* deficiency.

The results of this study demonstrate a close correlation between *Wt1* and *EpoR* mRNA levels in various cell lines of hematopoietic and non-hematopoietic origin. In particular, *Wt1*-deficient CD117<sup>+</sup> cells from mouse fetal liver contained lower amounts of *EpoR* transcripts than those obtained from heterozygous (*Wt1*<sup>+/-</sup>) and wild-type (*Wt1*<sup>+/+</sup>) embryos. The capacity of erythroid colony formation was significantly reduced in the absence of *Wt1*. Likewise CD117<sup>+</sup> cells from *Wt1*-deficient murine fetal liver exhibited a significantly lower *in vitro* proliferative response to recombinant human Epo than *Wt1*<sup>+/+</sup> and *Wt1*<sup>+/-</sup> progenitors. Benzidine staining indicated a significant reduction of

## 6. Summary

hemoglobin-positive cells in fetal liver of *Wt1*<sup>-/-</sup> vs. *Wt1*<sup>+/+</sup> and *Wt1*<sup>+/-</sup> murine embryos. The combinatorial use of various cell and molecular biology techniques (promoter-reporter assay, electrophoretic mobility shift assay, chromatin immunoprecipitation assay) disclosed stimulation of the *EpoR* promoter from human and mouse by the transcriptionally active *Wt1*(-KTS) protein in erythroleukemia cells. The responsible *cis*-element in the human and murine *EpoR* promoter sequence could be identified.

In conclusion, these findings demonstrate that the Wilms' tumor gene product, *Wt1*, activates transcription of the *EpoR* gene. Along with the previously recognized transactivation of the *Epo* gene by *Wt1* the results of this study describe a novel regulatory switch in normal hematopoiesis. Notably, *EpoR* is the first target gene of *Wt1* among the hematopoietic cytokine receptor superfamily. Moreover, direct regulation of the *EpoR* gene by the *Wt1*(-KTS) protein in hematopoietic progenitor cell is demonstrated. Lack of *Wt1* results in a failure of normal *in vitro* differentiation of erythroid progenitor cells. It remains to be proven whether dysfunction of the *Epo*/*EpoR* signaling pathway is responsible, at least in part, for the malignancy of human leukemias with high *Wt1* expression. Considering the importance of *EpoR* in mediating the neuro- and cardioprotective effects of *Epo*, additional studies are necessary to clarify the possible role of *Wt1* in *EpoR* expression in non-hematopoietic tissues.

## 7. Literaturverzeichnis

Agnello D, Bigini P, Villa P, Mennini T, Cerami A, Brines ML, Ghezzi P, Erythropoietin exerts an anti-inflammatory effect on the CNS in a model of experimental autoimmune encephalomyelitis, *Brain Res.*, Oct 11;952(1):128-34, 2002.

Alberta JA, Springett GM, Rayburn H, Natoli TA, Loring J., Kreidberg JA & Housman D, Role of the WT1 tumor suppressor in murine hematopoiesis, *Blood*. Apr 1;101(7):2570-4, 2003.

Algar EM, Khromykh T, Smith SI, Blackburn DM, Bryson GJ, Smith PJ, A WT1 antisense oligonucleotide inhibits proliferation and induces apoptosis in myeloid leukaemia cell lines, *Oncogene*, Mar 7;12(5):1005-14, 1996.

Algar E, A review of the Wilms' tumor 1 gene (WT1) and its role in hematopoiesis and leukemia, *J Hematother Stem Cell Res.*, Aug;11(4):589-99, 2002.

Amini Nik S, Hohenstein P, Jadidzadeh A, Van Dam K, Bastidas A, Berry RL, Upregulation of Wilms' tumor gene 1 (WT1) in desmoid tumors, *Int J Cancer*; 114: 202-208, 2005.

Anagnostou A, Lee ES, Kessimian N, Levinson R, Steiner M, Erythropoietin has a mitogenic and positive chemotactic effect on endothelial cells, *Proc Natl Acad Sci USA*, Aug;87(15):5978-82, 1990.

Anagnostou A, Liu Z, Steiner M, Chin K, Lee ES, Kessimian N, Noguchi CT, Erythropoietin receptor mRNA expression in human endothelial cells, *Proc Natl Acad Sci U S A*, Apr 26;91(9):3974-8, 1994.

Baird PN, Simmons PJ, Expression of the Wilms' tumor gene (WT1) in normal hemopoiesis, *Exp Hematol*, Apr;25(4):312-20, 1997.

Barber DL, Beattie BK, Mason JM, Nguyen MH, Yoakim M, Neel BG, D'Andrea AD, Frank DA, A common epitope is shared by activated signal transducer and activator of transcription-5 (STAT5) and the phosphorylated erythropoietin receptor: implications for the docking model of STAT activation, *Blood*, Apr 15;97(8):2230-7, 2001.

Beleslin-Cokic BB, Cokic VP, Yu X, Weksler BB, Schechter AN, Noguchi CT, Erythropoietin and hypoxia stimulate erythropoietin receptor and nitric oxide production by endothelial cells, *Blood*, Oct 1;104(7):2073-80, 2004.

## 7. Literaturverzeichnis

- Bergmann L, Miething C, Maurer U, Brieger J, Karakas T, Weidmann E, Hoelzer D, High levels of Wilms' tumor gene (wt1) mRNA in acute myeloid leukemias are associated with a worse long-term outcome, *Blood*, Aug 1;90(3):1217-25, 1997.
- Bernaudin M, Marti HH, Roussel S, Divoux D, Nouvelot A, MacKenzie ET, Petit E, A potential role for erythropoietin in focal permanent cerebral ischemia in mice, *J Cereb Blood Flow Metab.*, Jun;19(6):643-51, 1999.
- Bickmore WA, Oghene K, Little MH, Seawright A, van Heyningen V, Hastie ND, Modulation of DNA binding specificity by alternative splicing of the Wilms tumor wt1 gene transcript, *Science*, Jul 10;257(5067):235-7, 1992.
- Brieger J, Weidmann E, Fenchel K, Mitrou PS, Hoelzer D, Bergmann L, The expression of the Wilms' tumor gene in acute myelocytic leukemias as a possible marker for leukemic blast cells, *Leukemia*, Dec;8(12):2138-43,1994.
- Briggs MR, Kadonaga JT, Bell SP, Tjian R, Purification and biochemical characterization of the promoter-specific transcription factor, Sp1, *Science*. Oct 3;234(4772):47-52, 1986.
- Brines ML, Ghezzi P, Keenan S, Agnello D, de Lanerolle NC, Cerami C, Itri LM, Cerami A, Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury, *Proc Natl Acad Sci U S A*, Sep 12;97(19):10526-31, 2000.
- Broudy VC, Lin N, Brice M, Nakamoto B, Papayannopoulou T, Erythropoietin receptor characteristics on primary human erythroid cells, *Blood*, Jun 15;77(12):2583-90,1991.
- Brown WM, Maxwell P, Graham AN, Yakkundi A, Dunlop EA, Shi Z, Johnston PG, Lappin TR, Erythropoietin receptor expression in non-small cell lung carcinoma: a question of antibody specificity, *Stem Cells*, Mar;25(3):718-22, 2007.
- Cai Z, Manalo DJ, Wei G, Rodriguez ER, Fox-Talbot K, Lu H, Zweier JL, Semenza GL, Hearts from rodents exposed to intermittent hypoxia or erythropoietin are protected against ischemia-reperfusion injury, *Circulation*, Jul 8;108(1):79-85, 2003.
- Calvillo L, Latini R, Kajstura J, Leri A, Anversa P, Ghezzi P, Salio M, Cerami A, Brines M, Recombinant human erythropoietin protects the myocardium from ischemia-reperfusion injury and promotes beneficial remodeling, *Proc Natl Acad Sci U S A*, Apr 15;100(8):4802-6, 2003.
- Carlini RG, Dusso AS, Obialo CI, Alvarez UM, Rothstein M, Recombinant human erythropoietin (rHuEPO) increases endothelin-1 release by endothelial cells, *Kidney Int.*, May;43(5):1010-4, 1993.

## 7. Literaturverzeichnis

Carlini RG, Reyes AA, Rothstein M, Recombinant human erythropoietin stimulates angiogenesis in vitro, *Kidney Int.*, Mar;47(3):740-5, 1995.

Carrington D, Algar E, Overexpression of murine WT1 + / + and - / - isoforms has no effect on chemoresistance but delays differentiation in the K562 leukemia cell line, *Leuk Res.*, Nov;24(11):927-36, 2000.

Chattopadhyay A, Choudhury TD, Bandyopadhyay D, Datta AG, Protective effect of erythropoietin on the oxidative damage of erythrocyte membrane by hydroxyl radical, *Biochem Pharmacol.*, Feb 15;59(4):419-25, 2000.

Chen D, Zhang G, Enforced expression of the GATA-3 transcription factor affects cell fate decisions in hematopoiesis, *Exp. Hematol.* 29, 971-980, 2001.

Chiba T, Ikawa Y, Todokoro K, GATA-1 transactivates erythropoietin receptor gene, and erythropoietin receptor-mediated signals enhance GATA-1 gene expression, *Nucleic Acids Res.*, Jul 25;19(14):3843-8, 1991.

Chin K, Oda N, Shen K, Noguchi CT, Regulation of transcription of the human erythropoietin receptor gene by proteins binding to GATA-1 and Sp1 motifs, *Nucleic Acids Res.*, Aug 11;23(15):3041-9, 1995.

Constantinescu SN, Huang LJ, Nam H, Lodish HF, The erythropoietin receptor cytosolic juxtamembrane domain contains an essential, precisely oriented, hydrophobic motif, *Mol Cell*, Feb;7(2):377-85, 2001.

Christensen H, Boysen G, Johannesen HH, Christensen E, Bendtzen K, Deteriorating ischaemic stroke. cytokines, soluble cytokine receptors, ferritin, systemic blood pressure, body temperature, blood glucose, diabetes, stroke severity, and CT infarction-volume as predictors of deteriorating ischaemic stroke, *J Neurol Sci.*, Sep 15;201(1-2):1-7, 2002.

D'Andrea AD, Zon LI, Erythropoietin Receptor: Subunit Structure and Activation, *J. Clin. Invest.*, Volume 86, 681-687, 1990.

Dame C, Juul SE, Christensen RD, The biology of erythropoietin in the central nervous system and its neurotrophic and neuroprotective potential, *Biol Neonate*, 79(3-4):228-35, 2001.

Dame, C., Sola, M.C., Fandrey, J., Rimsza, L.M., Freitag, P., Knöpple, G., Christensen, R.D. Bungert, J., Developmental changes in the expression of transcription factors GATA-1, -2 and -3 during the onset of human medullary haematopoiesis, *British Journal of Haematology*, 119, 510-515, 2002.

## 7. Literaturverzeichnis

Dame C, Kirschner KM, Bartz KV, Wallach T, Hussels CS, Scholz H; Wilms tumor suppressor, Wt1, is a transcriptional activator of the erythropoietin gene, *Blood*, 1;107(11):4282-90, 2006.

de la Chapelle A, Träskelin AL, Juvonen E, Truncated erythropoietin receptor causes dominantly inherited benign human erythrocytosis, *Proc Natl Acad Sci USA*, May 15;90(10):4495-9, 1993.

Deuel TF, Guan LS, Wang ZY, Wilms' tumor gene product WT1 arrests macrophage differentiation of HL-60 cells through its zinc-finger domain, *Biochem Biophys Res Commun.*, Jan 8;254(1):192-6, 1999.

Drüeke TB, Bárány P, Cazzola M, Eschbach JW, Grützmacher P, Kaltwasser JP, Macdougall IC, Pippard MJ, Shaldon S, van Wyck D, Management of iron deficiency in renal anemia: guidelines for the optimal therapeutic approach in erythropoietin-treated patients, *Clin Nephrol.*, Jul;48(1):1-8, 1997.

Drummond IA, Madden SL, Rohwer-Nutter P, Bell GI, Sukhatme VP, Rauscher FJ 3rd, Repression of the insulin-like growth factor II gene by the Wilms tumor suppressor WT1, *Science*, Jul 31;257(5070):674-8, 1992.

Ehrenreich H, Hasselblatt M, Dembowski C, Cepek L, Lewczuk P, Stiefel M, Rustenbeck HH, Breiter N, Jacob S, Knerlich F, Bohn M, Poser W, Rütter E, Kochen M, Gefeller O, Gleiter C, Wessel TC, De Ryck M, Itri L, Prange H, Cerami A, Brines M, Sirén AL, Erythropoietin therapy for acute stroke is both safe and beneficial, *Mol Med.*, Aug;8(8):495-505, 2002.

Elliott S, Busse L, Bass MB, Lu H, Saosi I, Sinclair AM, Spahr C, Um M, Van G, Begley CG, Anti-Epo receptor antibodies do not predict Epo receptor expression, *Blood* 107, 1892-1895, 2006.

Ellisen LW, Carlesso N, Cheng T, Scadden DT, Haber DA, The Wilms tumor suppressor WT1 directs stage-specific quiescence and differentiation of human hematopoietic progenitor cells, *The EMBO Journal*, Vol. 20 No. 8 pp. 1897-1909, 2001.

Emerson SG, Sieff CA, Wang EA, Wong CG, Clark SC, Nathan DG, Purification of Fetal Hematopoietic Progenitors and Demonstration of Recombinant Multipotential Colony-stimulating Activity, *J. Clin. Invest.*, Vol. 76, 1286-1290, 1985.

Englert C, Hou X, Maheswaran S, Bennett P, Ngwu C, Re G, Garvin A, Rosner M, Haber D, WT1 suppresses synthesis of the epidermal growth factor receptor and induces apoptosis, *EMBO J.* , 14, 4662-4675, 1995.

## 7. Literaturverzeichnis

- Englert C, Vidal, M, Maheswaran, S, Ge, Y, Ezzell, RM, Isselbacher KJ & Haber DA, Truncated WT1 mutants alter the subnuclear localization of the wild-type protein, *Genetics*, Vol.92, 11960-11864, 1995.
- Englert, C, Maheswaran, S. Garvin, AJ, Kreidberg, J, Haber, DA, Induction of p21 by the Wilms' tumor suppressor gene WT1, *Cancer Res.* 57, 1429–1434, 1997.
- Erslev AJ, In vitro production of erythropoietin by kidneys perfused with a serum-free solution, *Blood*, Jul;44(1):77-85, 1974.
- Eschbach JW, Egrie JC, Downing MR, Browne JK, Adamson JW, Correction of the anemia of end-stage renal disease with recombinant human erythropoietin. Results of a combined phase I and II clinical trial, *N Engl J Med.*, Jan 8;316(2):73-8, 1987.
- Fandrey J, A cordial affair-erythropoietin and cardioprotection, *Cardiovasc. Res.* 72, 1-2, 2006.
- Farrell F, Lee A, The erythropoietin receptor and its expression in tumor cells and other tissues, *Oncologist*, 9 Suppl 5:18-30, 2004.
- Fisher JW, Birdwell BJ, The production of an erythropoietic factor by the in situ perfused kidney, *Acta Haematol.*, 6:224-32, 1961.
- Fisher JW, Koury S, Ducey T, Mendel S, Erythropoietin production by interstitial cells of hypoxic monkey kidneys, *Br J Haematol.*, Oct;95(1):27-32, 1996.
- Fischl M, Galpin JE, Levine JD, Groopman JE, Henry DH, Kennedy P, Miles S, Robbins W, Starrett B, Zalusky R, Recombinant human erythropoietin for patients with AIDS treated with zidovudine, *N Engl J Med.*, May 24;322(21):1488-93, 1990.
- Fraizer GC, Patmasiriwat P, Zhang X, Saunders GF, Expression of the tumor suppressor gene WT1 in both human and mouse bone marrow, *Blood*, Dec 15;86(12):4704-6, 1995.
- Gabrilove JL, Cleeland CS, Livingston RB, Sarokhan B, Winer E, Einhorn LH, Clinical evaluation of once-weekly dosing of epoetin alfa in chemotherapy patients: improvements in hemoglobin and quality of life are similar to three-times-weekly dosing, *J Clin Oncol.*, Jun 1;19(11):2875-82, 2001a.
- Gabrilove JL, Cancer therapy. New strategies and treatment modalities for optimizing patient outcomes, *Semin Hematol*, Jul;38(3 Suppl 7):1-7,2001b.

## 7. Literaturverzeichnis

Gaiger A, Schmid D, Heinze G, Linnerth B, Greinix H, Kalhs P, Tisljar K, Priglinger S, Laczika K, Mitterbauer M, Novak M, Mitterbauer G, Mannhalter C, Haas OA, Lechner K, Jäger U, Detection of the WT1 transcript by RT-PCR in complete remission has no prognostic relevance in de novo acute myeloid leukemia, *Leukemia*, Dec;12(12):1886-94, 1998.

Gao L, Bellantuono I, Elsässer A, Marley SB, Gordon MY, Goldman JM, Stauss HJ, Selective elimination of leukemic CD34(+) progenitor cells by cytotoxic T lymphocytes specific for WT1, *Blood*, Apr 1;95(7):2198-203, 2000.

Gashler AL, Bonthron DT, Madden SL, Rauscher FJ 3rd, Collins T, Sukhatme VP, Human platelet-derived growth factor A chain is transcriptionally repressed by the Wilms tumor suppressor WT1, *Proc Natl Acad Sci USA*, Nov 15; 89(22):10984-8, 1992.

Genc S, Akhisaroglu M, Kuralay F, Genc K, Erythropoietin restores glutathione peroxidase activity in 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine-induced neurotoxicity in C57BL mice and stimulates murine astroglial glutathione peroxidase production in vitro, *Neurosci Lett.*, Mar 15;321(1-2):73-6, 2002.

Goldberg MA, Glass GA, Cunningham JM, Bunn HF, The regulated expression of erythropoietin by two human hepatoma cell lines, *Proc Natl Acad Sci U S A*, Nov;84(22):7972-6, 1987.

Gregory CJ, Tepperman AD, McCulloch EA, Till JE, Erythropoietic progenitors capable of colony formation in culture: response of normal and genetically anemic W-W-V mice to manipulations of the erythron, *J Cell Physiol.*, Aug;84(1):1-12, 1974.

Gregory CJ, Erythropoietin sensitivity as a differentiation marker in the hemopoietic system: studies of three erythropoietic colony responses in culture, *J. Cell Physiol.*, 89(2):289-301, 1976.

Gregory CJ & Eaves AC, Human Marrow Cells Capable of Erythropoietic Differentiation In Vitro: Definition of Three Erythroid Colony Responses, *Blood*, Vol. 49, No. 6, 1977.

Gregory CJ & Eaves AC, Three Stages of Erythropoietic Progenitor Cell Differentiation Distinguished by a Number of Physical and Biologic Properties, *Blood*, Vol. 51, No. 3, 1978.

Gross AW, Lodish HF, Cellular trafficking and degradation of erythropoietin and novel erythropoiesis stimulating protein (NESP), *J Biol Chem.*, Jan 27;281(4):2024-32, 2006.

## 7. Literaturverzeichnis

Haber DA, Buckler AJ, Glaser T, Call KM, Pelletier J, Sohn RL, Douglass EC, Housman DE, An internal deletion within an 11p13 zinc finger gene contributes to the development of Wilms' tumor, *Cell*, Jun 29;61(7):1257-69, 1990.

Haber DA, Sohn RL, Buckler AJ, Pelletier J, Call KM & Housman DE, Alternative splicing and genomic structure of the Wilms tumor gene WT1, *Genetics*, Vol. 88 pp. 9618-9622, 1991.

Hammes A, Guo JK, Lutsch G, Leheste JR, Landrock D, Ziegler U, Gubler MC, Schedl A., Two splice variants of the Wilms' tumor 1 gene have distinct functions during sex determination and nephron formation, *Cell*, Aug 10;106(3):319-29, 2001.

Henry DH, Beall GN, Benson CA, Carey J, Cone LA, Eron LJ, Fiala M, Fischl MA, Gabin SJ, Gottlieb MS, Recombinant human erythropoietin in the treatment of anemia associated with human immunodeficiency virus (HIV) infection and zidovudine therapy. Overview of four clinical trials, *Ann Intern Med.*, Nov 1;117(9):739-48, 1992.

Herzer U, Crocoll A, Barton D, Howells N, Englert C, The Wilms tumor suppressor gene wt1 is required for development of the spleen, *Curr Biol.*, Jul 29-Aug 12;9(15):837-40, 1999.

Hohenstein P, Hastie ND, The many facets of the Wilms' tumour gene, WT1, *Hum Mol Genet.*, Oct 15;15 Spec No 2:R196-201, 2006.

Huff V, Miwa H, Haber DA, Call KM, Housman D, Strong LC, Saunders GF, Evidence for WT1 as a Wilms tumor (WT) gene: intragenic germinal deletion in bilateral WT, *Am J Hum Genet.*, May;48(5):997-1003, 1991.

Inoue K, Sugiyama H, Ogawa H, Nakagawa M, Yamagami T, Miwa H, Kita K, Hiraoka A, Masaoka T, Nasu K, WT1 as a new prognostic factor and a new marker for the detection of minimal residual disease in acute leukemia, *Blood*, Nov 1;84(9):3071-9, 1994.

Inoue K, Tamaki H, Ogawa H, Oka Y, Soma T, Tatekawa T, Oji Y, Tsuboi A, Kim EH, Kawakami M, Akiyama T, Kishimoto T, Sugiyama H, Wilms' tumor gene (WT1) competes with differentiation-inducing signal in hematopoietic progenitor cells, *Blood*, Apr 15;91(8):2969-76, 1998.

Ito K, Oji Y, Tatsumi N, Shimizu S, Kanai Y, Nakazawa T, Asada M, Jomgeow T, Aoyagi S, Nakano Y, Tamaki H, Sakaguchi N, Shirakata T, Nishida S, Kawakami M, Tsuboi A, Oka Y, Tsujimoto Y, Sugiyama H, Antiapoptotic function of 17AA(+)WT1 (Wilms' tumor gene) isoforms on the intrinsic apoptosis pathway, *Oncogene*, Jul 13;25(30):4217-29, 2006.

## 7. Literaturverzeichnis

- Jacobson LO, Goldwasser E, Fried W, Plzak LF, Studies on erythropoiesis. VII. The role of the kidney in the production of erythropoietin, *Trans Assoc Am Physicians.*;70:305-17, 1957.
- Jones SS, D'Andrea AD, Haines LL, Wong GG, Human erythropoietin receptor: cloning, expression, and biologic characterization, *Blood*, Jul 1;76(1):31-5, 1990.
- Kawakami M, Sekiguchi M, Sato K, Kozaki S, Takahashi M, Erythropoietin receptor-mediated inhibition of exocytotic glutamate release confers neuroprotection during chemical ischemia, *J Biol Chem.*, Oct 19;276(42):39469-75, 2001.
- Kertesz N, Wu J, Chen TH, Sucov HM, Wu H, The role of erythropoietin in regulating angiogenesis, *Dev Biol.*, Dec 1;276(1):101-10, 2004.
- Kieran MW, Perkins AC, Orkin SH, Zon LI, Thrombopoietin rescues in vitro erythroid colony formation from mouse embryos lacking the erythropoietin receptor, *Proc Natl Acad Sci U S A*, Aug 20;93(17):9126-31, 1996.
- Kim S, Yoo N, Hahn J, Lee S, Chong S, Min Y, Ko Y, Monitoring of WT-1 gene expression in peripheral blood of patients with acute leukemia by semiquantitative RT-PCR: Possible marker for detection of minimal residual leukemia. *Yonseo Med. J* 38:212-219, 1997.
- King-Underwood L, Pritchard-Jones K, Wilms' tumor (WT1) gene mutations occur mainly in acute myeloid leukemia and may confer drug resistance, *Blood*, Apr 15;91(8):2961-8, 1998.
- King-Underwood L, Little S, Baker M, Clutterbuck R, Delassus S, Enver T, Lebozer C, Min T, Moore A, Schedl A, Pritchard-Jones K, Wt1 is not essential for hematopoiesis in the mouse, *Leuk Res.*, Jul;29(7):803-12, 2005.
- Kirkeby A, van Beek J, Nielsen J, Leist M, Helboe L, Functional and immunochemical characterisation of different antibodies against the erythropoietin receptor, *Neurosci Methods*, Aug 15;164(1):50-8, 2007.
- Klingmüller U, The role of tyrosine phosphorylation in proliferation and maturation of erythroid progenitor cells--signals emanating from the erythropoietin receptor, *Eur J Biochem.*, Nov 1;249(3):637-47, 1997.
- Klingmüller U, Lorenz U, Cantley LC, Neel BG, Lodish HF, Specific recruitment of SH-PTP1 to the erythropoietin receptor causes inactivation of JAK2 and termination of proliferative signals, *Cell*, Mar 10;80(5):729-38, 1995.

## 7. Literaturverzeichnis

Koesters R, Linnebacher M, Coy JF, Germann A, Schwitalle Y, Findeisen P, von Knebel Doeberitz M, WT1 is a tumor-associated antigen in colon cancer that can be recognized by in vitro stimulated cytotoxic T cells, *Int J Cancer*, Apr 10;109(3):385-92, 2004.

Komatsu N, Kirito K, Kashii Y, Furukawa Y, Kikuchi J, Suwabe N, Yamamoto M, Miura Y, Cell-cycle-dependent regulation of erythropoietin receptor gene, *Blood*, Feb 15;89(4):1182-8, 1997.

Koury ST, Bondurant MC, Koury MJ, Localization of erythropoietin synthesizing cells in murine kidneys by in situ hybridization, *Blood*, Feb;71(2):524-7, 1988.

Koury MJ, Bondurant MC, Graber SE, Sawyer ST, Erythropoietin Messenger RNA Levels in Developing Mice and Transfer of 125I-Erythropoietin by the Placenta, *The Journal of Clinical Investigation*, Vol. 82, 154-159, 1988.

Koury ST, Bondurant MC, Koury MJ, Semenza GL, Localization of cells producing erythropoietin in murine liver by in situ hybridization, *Blood*, Jun 1;77(11):2497-503, 1991.

Koury MJ, Sawyer ST, Brandt SJ, New insights into erythropoiesis, *Curr Opin Hematol*. Mar;9(2):93-100, 2002.

Kreidberg JA, Sariola H, Loring JM, Maeda M, Pelletier J, Housman D, Jaenisch R, WT-1 is required for early kidney development, *Cell*, 74, 679-691, 1993.

Knudson AG Jr., Genetics of human cancer, *Genetics*, Jun;79 Suppl:305-16, 1975.

Kudoh T, Ishidate T, Moriyama M, Toyoshima K, Akiyama T, G1 phase arrest induced by Wilms tumor protein WT1 is abrogated by cyclin/CDK complexes, *Proc Natl Acad Sci USA*, May 9;92(10):4517-21, 1995.

Kuramochi S, Ikawa Y, Todokoro K, Characterization of murine erythropoietin receptor genes, *J Mol Biol.*, Dec 5;216(3):567-75, 1990.

Kuratowska Z, Lewartowski B, Michalak E, Studies on the production of erythropoietin by isolated perfused organs, *Blood*, Nov;18:527-34, 1961.

Lacombe C, Mayeux P, Erythropoietin (Epo) receptor and Epo mimetics, *Adv Nephrol Necker Hosp.*, 29:177-89, 1999.

Ladomery MR, Slight J, Mc Ghee S, Hastie ND, Presence of WT1, the Wilm's tumor suppressor gene product, in nuclear poly(A)(+) ribonucleoprotein, *J Biol Chem.* , Dec 17;274(51):36520-6, 1999.

## 7. Literaturverzeichnis

- Laity JH, Chung J, Dyson HJ, Wright PE, Alternative splicing of Wilms' tumor suppressor protein modulates DNA binding activity through isoform-specific DNA-induced conformational changes, *Biochemistry*, May 9;39(18):5341-8, 2000.
- Lappin TR, Maxwell AP, Johnston PG, EPO's alter ego: erythropoietin has multiple actions, *Stem Cells*, 20(6):485-92, 2002.
- Lappin T, The cellular biology of erythropoietin receptors, *Oncologist*, 8 Suppl 1:15-8, 2003.
- Larsson SH, Charlier JP, Miyagawa K, Engelkamp D, Rassoulzadegan M, Ross A, Cuzin F, van Heyningen V, Hastie ND, Subnuclear localization of WT1 in splicing or transcription factor domains is regulated by alternative splicing, *Cell*, May 5;81(3):391-401, 1995.
- Lee SB, Haber DA, Wilms tumor and the WT1 gene, *Exp Cell Res.*, Mar 10;264(1):74-99. Review, 2001.
- Leonard M, Brice M, Engel JD, Papayannopoulou T, Dynamics of GATA transcription factor expression during erythroid differentiation, *Blood*, Aug 15;82(4):1071-9, 1993.
- Lewczuk P, Hasselblatt M, Kamrowski-Kruck H, Heyer A, Unzicker C, Sirén AL, Ehrenreich H, Survival of hippocampal neurons in culture upon hypoxia: effect of erythropoietin, *Neuroreport*, Nov 9;11(16):3485-8, 2000.
- Leyland-Jones B, Evidence for erythropoietin as a molecular targeting agent, *Semin Oncol.*, Jun;29(3 Suppl 11):145-54, 2002.
- Lin CS, Lim SK, D'Agati V, Costantini F, Differential effects of an erythropoietin receptor gene disruption on primitive and definitive erythropoiesis, *Genes & Development* 10:154-164, 1996.
- Little MH, Williamson KA, Mannens M, Kelsey A, Gosden C, Hastie ND, van Heyningen V, Evidence that WT1 mutations in Denys-Drash syndrome patients may act in a dominant-negative fashion, *Hum Mol Genet.*, Mar;2(3):259-64, 1993.
- Little M, Wells C, A clinical overview of WT1 gene mutations, *Hum Mutat.*, 9(3):209-25, 1997.
- Loeb DM, Evron E, Patel CB, Sharma PM, Niranjana B, Buluwela L, Weitzman SA, Korz D, Sukumar S, Wilms' tumor suppressor gene (WT1) is expressed in primary breast tumors despite tumor-specific promoter methylation, *Cancer Res.*, Feb 1;61(3):921-5, 2001.
- Madden SL, Cook DM, Morris JF, Gashler A, Sukhatme VP, Rauscher FJ 3rd, Transcriptional repression mediated by the WT1 Wilms tumor gene product, *Science*, Sep 27;253(5027):1550-3, 1991.

## 7. Literaturverzeichnis

Maheswaran S, Park S, Bernard A, Morris J, Rauscher F, Hill D, Haber D, Physical and functional interaction between WT1 and p53 proteins, *Proc Natl Acad Sci USA*, 90, 5100-5104, 1993.

Maheswaran S, Englert C, Bennett P, Heinrich G, Haber DA, The WT1 gene product stabilizes p53 and inhibits p53-mediated apoptosis, *Genes Dev.*, Sep 1; 9(17):2143-56, 1995.

Maouche L, Tournamille C, Hattab C, Boffa G, Cartron JP, Chrétien S, Cloning of the gene encoding the human erythropoietin receptor, *Blood*, Nov 15;78(10):2557-63, 1991.

Maouche L, Cartron JP, Chretien S, Different domains regulate the human erythropoietin receptor gene transcription, *Nucleic Acids Research*, Vol. 22, No. 3, 1994.

Marti HH, Wenger RH, Rivas LA, Straumann U, Digicaylioglu M, Henn V, Yonekawa Y, Bauer C, Gassmann M, Erythropoietin gene expression in human, monkey and murine brain, *Eur J Neurosci.*, Apr;8(4):666-76, 1996.

Marti HH, Bernaudin M, Function of erythropoietin in the brain, In: Wolfgang J, Ed. *Erythropoietin: Molecular Biology and Clinical Use*. Johnson City, Tennessee: F.P. Graham Publishing Cp., pp 195-215, 2002.

Masuda S, Nagao M, Takahata K, Konishi Y, Gallyas F Jr, Tabira T, Sasaki R, Functional erythropoietin receptor of the cells with neural characteristics. Comparison with receptor properties of erythroid cells, *J Biol Chem.* , May 25;268(15):11208-16, 1993.

Maurer U, Brieger J, Weidmann E, Mitrou PS, Hoelzer D, Bergmann L, The Wilms' tumor gene is expressed in a subset of CD34+ progenitors and downregulated early in the course of differentiation in vitro, *Exp Hematol.*, Aug; 25(9):945-950, 1997.

Menssen HD, Renkl HJ, Rodeck U, Maurer J, Notter M, Schwartz S, Reinhardt R, Thiel E, Presence of Wilms' tumor gene (wt1) transcripts and the WT1 nuclear protein in the majority of human acute leukemias, *Leukemia*, Jun;9(6):1060-7, 1995.

Menssen HD, Renkl HJ, Entezami M, Thiel E, Wilms' tumor gene expression in human CD34+ hematopoietic progenitors during fetal development and early clonogenic growth, *Blood*, May 1;89(9):3486-7, 1997.

Migliaccio AR, Migliaccio G, D'Andrea A, Baiocchi M, Crotta S, Nicolis S, Ottolenghi S, Adamson JW, Response to erythropoietin in erythroid subclones of the factor-dependent cell line 32D is determined by translocation of the erythropoietin receptor to the cell surface, *Proc Natl Acad Sci U S A*, Dec 15;88(24):11086-90, 1991.

## 7. Literaturverzeichnis

- Migliaccio AR, Jiang Y, Migliaccio G, Nicolis S, Crotta S, Ronchi A, Ottolenghi S, Adamson JW, Transcriptional and posttranscriptional regulation of the expression of the erythropoietin receptor gene in human erythropoietin-responsive cell lines, *Blood*, Dec 15;82(12):3760-9, 1993.
- Miwa H, Beran M, Saunders GF, Expression of the Wilms' tumor gene (WT1) in human leukemias, *Leukemia*, May;6(5):405-9, 1992.
- Miyagi T, Ahuja H, Kubota T, Kubonishi I, Koeffler HP, Miyoshi I, Expression of the candidate Wilm's tumor gene, WT1, in human leukemia cells, *Leukemia*, Jul;7(7):970-7, 1993.
- Moore AW, McInnes L, Kreidberg J, Hastie ND, Schedl A, YAC complementation shows a requirement for *Wt1* in the development of epicardium, adrenal gland and throughout nephrogenesis, *Development*, May;126(9):1845-57, 1999.
- Morishita E, Masuda S, Nagao M, Yasuda Y, Sasaki R, Erythropoietin receptor is expressed in rat hippocampal and cerebral cortical neurons, and erythropoietin prevents in vitro glutamate-induced neuronal death, *Neuroscience*, Jan;76(1):105-16, 1997.
- Matsunaga, E, Genetics of Wilms' tumor, *Hum. Genet.* 57(3), 231-246, 1981.
- Moon C, Krawczyk M, Ahn D, Ahmet I, Paik D, Lakatta EG, Talan MI, Erythropoietin reduces myocardial infarction and left ventricular functional decline after coronary artery ligation in rats, *Proc Natl Acad Sci U S A*, Sep 30;100(20):11612-7, 2003.
- Mulcahy L, The erythropoietin receptor, *Ortho Biotech Inc. Semin Oncol.*, Apr;28(2 Suppl 8):19-23, 2001.
- Noguchi CT, Bae KS, Chin K, Wada Y, Schechter AN, Hankins WD, Cloning of the human erythropoietin receptor gene, *Blood*, Nov 15;78(10):2548-56, 1991.
- Noguchi CT, Asavaritikrai P, Teng R, Jia Y, Role of erythropoietin in the brain, *Crit Rev Oncol Hematol.*, Nov;64(2):159-71, 2007.
- Ohminami H, Yasukawa M, Fujita S, HLA class I-restricted lysis of leukemia cells by a CD8(+) cytotoxic T-lymphocyte clone specific for WT1 peptide, *Blood*, Jan 1;95(1):286-93, 2000.
- Ogawa H, Tsuboi A, Oji Y, Tamaki H, Soma T, Inoue K, Sugiyama H, Successful donor leukocyte transfusion at molecular relapse for a patient with acute myeloid leukemia who was

## 7. Literaturverzeichnis

treated with allogenic bone marrow transplantation: importance of the monitoring of minimal residual disease by WT1 assay, *Bone Marrow Transplant*, Mar;21(5):525-7, 1998.

Ohminami H, Yasukawa M, Fujita S, HLA class I-restricted lysis of leukemia cells by a CD8(+) cytotoxic T-lymphocyte clone specific for WT1 peptide, *Blood*, Jan 1;95(1):286-93, 2000.

Oji Y, Suzuki T, Nakano Y, Maruno M, Nakatsuka S, Jomgeow T, Abeno S, Tatsumi N, Yokota A, Aoyagi S, Nakazawa T, Ito K, Kanato K, Shirakata T, Nishida S, Hosen N, Kawakami M, Tsuboi A, Oka Y, Aozasa K, Yoshimine T, Sugiyama H, Overexpression of the Wilms' tumor gene W T1 in primary astrocytic tumors, *Cancer Sci.*, Oct;95(10):822-7, 2004.

Oka Y, Elisseeva OA, Tsuboi A, Ogawa H, Tamaki H, Li H, Oji Y, Kim EH, Soma T, Asada M, Ueda K, Maruya E, Saji H, Kishimoto T, Udaka K, Sugiyama H, Human cytotoxic T-lymphocyte responses specific for peptides of the wild-type Wilms' tumor gene (WT1 ) product, *Immunogenetics*, Feb;51(2):99-107, 2000.

Østergaard M, Olesen LH, Hasle H, Kjeldsen E, Hokland P, WT1 gene expression: an excellent tool for monitoring minimal residual disease in 70% of acute myeloid leukaemia patients - results from a single-centre study, *Br J Haematol.*, Jun;125(5):590-600, 2004.

Pandolfi PP, Roth ME, Karis A, Leonard MW, Dzierzak E, Grosveld FG, Engel JD, Lindenbaum MH, Targeted disruption of the GATA3 gene causes severe abnormalities in the nervous system and in fetal liver haematopoiesis, *Nat Genet.*, Sep;11(1):40-4, 1995.

Parsa CJ, Matsumoto A, Kim J, Riel RU, Pascal LS, Walton GB, Thompson RB, Petrofski JA, Annex BH, Stamler JS, Koch WJ, A novel protective effect of erythropoietin in the infarcted heart, *J Clin Invest.*, Oct;112(7):999-1007, 2003.

Pelletier J, Bruening W, Kashtan CE, Mauer SM, Manivel JC, Striegel JE, Houghton DC, Junien C, Habib R, Fouser L, Germline mutations in the Wilms' tumor suppressor gene are associated with abnormal urogenital development in Denys-Drash syndrome, *Cell*, Oct 18;67(2):437-47, 1991.

Penny LA, Forget BG, Genomic organization of the human erythropoietin receptor gene, *Genomics*, Dec;11(4):974-80, 1991.

Pevny L, Simon MC, Robertson E, Klein WH, Tsai SF, D'Agati V, Orkin SH, Costantini F, Erythroid differentiation in chimaeric mice blocked by a targeted mutation in the gene for transcription factor GATA-1, *Nature*, Jan 17;349(6306):257-60, 1991.

## 7. Literaturverzeichnis

Phelan SA, Lindberg C, Call KM, Wilms' tumor gene, WT1, mRNA is down-regulated during induction of erythroid and megakaryocytic differentiation of K562 cells, *Cell Growth Differ.* , Jun;5(6):677-86, 1994.

Philo JS, Aoki KH, Arakawa T, Narhi LO, Wen J, Dimerization of the extracellular domain of the erythropoietin (EPO) receptor by EPO: one high-affinity and one low-affinity interaction, *Biochemistry*, Feb 6;35(5):1681-91, 1996.

Pritchard-Jones K, Fleming S, Davidson D, Bickmore W, Porteous D, Gosden C, Bard J, Buckler A, Pelletier J, Housman D, The candidate Wilms' tumour gene is involved in genitourinary development, *Nature*, Jul 12;346(6280):194-7, 1990.

Pritchard-Jones K, Renshaw J, Regarding "expression of the Wilms' tumor gene (WT1) in normal hemopoiesis", *Experimental Hematology* 25:312-320 (1997), *Exp Hematol.*, Dec;25(13):1311-2, 1997.

Rauscher FJ 3rd, Morris JF, Tournay OE, Cook DM, Curran T, Binding of the Wilms' tumor locus zinc finger protein to the EGR-1 consensus sequence, *Science*, Nov 30;250(4985):1259-62, 1990.

Rauscher FJ 3rd, The WT1 Wilms tumor gene product: a developmentally regulated transcription factor in the kidney that functions as a tumor suppressor, *FASEB J.*, Jul;7(10):896-903, 1993.

Ribatti D, Presta M, Vacca A, Ria R, Giuliani R, Dell'Era P, Nico B, Roncali L, Dammacco F, Human erythropoietin induces a pro-angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and stimulates neovascularization in vivo, *Blood*, Apr 15;93(8):2627-36, 1999.

Richmond TD, Chohan M, Barber DL, Turning cells red: signal transduction mediated by erythropoietin, *Trends Cell Biol.*, Mar;15(3):146-55, 2005.

Reddy JC, Hosono S, Licht JD, The transcriptional effect of WT1 is modulated by choice of expression vector, *J Biol Chem.* , Dec 15;270(50):29976-82, 1995.

Sakanaka M, Wen TC, Matsuda S, Masuda S, Morishita E, Nagao M, Sasaki R, In vivo evidence that erythropoietin protects neurons from ischemic damage, *Proc Natl Acad Sci U S A*, Apr 14;95(8):4635-40, 1998.

Sawada K, Krantz SB, Dai CH, Koury ST, Horn ST, Glick AD, Civin CI, Purification of human blood burst-forming units-erythroid and demonstration of the evolution of erythropoietin receptors, *J Cell Physiol.*, Feb;142(2):219-30, 1990.

## 7. Literaturverzeichnis

Sawyer ST, Krantz SB, Goldwasser E, Binding and receptor-mediated endocytosis of erythropoietin in Friend virus-infected erythroid cells, *J Biol Chem.*, Apr 25;262(12):5554-62, 1987.

Scharnhorst V, van der Eb AJ, Jochemsen AG, WT1 proteins: functions in growth and differentiation, *Gene.*, Aug 8;273(2):141-61, 2001.

Schmid D, Heinze G, Linnerth B, Tisljar K, Kusec R, Geissler K, Sillaber C, Laczika K, Mitterbauer M, Zöchbauer S, Mannhalter C, Haas OA, Lechner K, Jäger U, Gaiger A, Prognostic significance of WT1 gene expression at diagnosis in adult de novo acute myeloid leukemia, *Leukemia*, May;11(5):639-43, 1997.

Sekiya M, Adachi M, Hinoda Y, Imai K, Yachi A, Downregulation of Wilms' tumor gene (wt1) during myelomonocytic differentiation in HL60 cells, *Blood*, Apr 1;83(7):1876-82, 1994.

Sirén AL, Knerlich F, Poser W, Gleiter CH, Brück W, Ehrenreich H, Erythropoietin and erythropoietin receptor in human ischemic/hypoxic brain, *Acta Neuropathol.*, Mar; 101 (3):271-6, 2001.

Sirén AL, Fratelli M, Brines M, Goemans C, Casagrande S, Lewczuk P, Keenan S, Gleiter C, Pasquali C, Capobianco A, Mennini T, Heumann R, Cerami A, Ehrenreich H, Ghezzi P, Erythropoietin prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress, *Proc Natl Acad Sci U S A*, Mar 27;98(7):4044-9, 2001.

Smith DH, Guaneri CM, Whaling SM, Vokes EE, Erythropoietin response in cancer patients receiving cisplatin, *Proc Am Assoc Cancer Res* 29:52; 1988.

Smith SI, Weil D, Johnson GR, Boyd AW, Li CL, Expression of the Wilms' tumor suppressor gene, WT1, is upregulated by leukemia inhibitory factor and induces monocytic differentiation in M1 leukemic cells, *Blood*, Feb 1;91(3):764-73, 1998.

Svedberg H, Chylicki K, Baldetorp B, Rauscher FJ 3rd, Gullberg U, Constitutive expression of the Wilms' tumor gene (WT1) in the leukemic cell line U937 blocks parts of the differentiation program, *Oncogene*, Feb 19;16(7):925-32, 1998.

Svedberg H, Richter J, Gullberg U, Forced expression of the Wilms tumor 1 (WT1) gene inhibits proliferation of human hematopoietic CD34(+) progenitor cells, *Leukemia*, Dec;15(12):1914-22, 2001.

## 7. Literaturverzeichnis

Suzuki N, Ohneda O, Takahashi S, Higuchi M, Mukai HY, Nakahata T, Imagawa S, Yamamoto M, Erythroid-specific expression of the erythropoietin receptor rescued its null mutant mice from lethality, *Blood*, Oct 1;100(7):2279-88, 2002.

Tamaki H, Ogawa H, Ohyashiki K, Ohyashiki JH, Iwama H, Inoue K, Soma T, Oka Y, Tatekawa T, Oji Y, Tsuboi A, Kim EH, Kawakami M, Fuchigami K, Tomonaga M, Toyama K, Aozasa K, Kishimoto T, Sugiyama H, The Wilms' tumor gene WT1 is a good marker for diagnosis of disease progression of myelodysplastic syndromes, *Leukemia*, Mar;13(3):393-9, 1999.

Tauchi T, Feng GS, Shen R, Hoatlin M, Bagby GC Jr, Kabat D, Lu L, Broxmeyer HE, Involvement of SH2-containing phosphotyrosine phosphatase Syp in erythropoietin receptor signal transduction pathways, *J Biol Chem.*, Mar 10;270(10):5631-5, 1995.

Ten VS, Pinsky DJ, Endothelial response to hypoxia: physiologic adaptation and pathologic dysfunction, *Curr Opin Crit Care*, Jun;8(3):242-50, 2002.

Timens W, Kamps WA, Hemopoiesis in human fetal and embryonic liver, *Microsc Res Tech.*, Dec 1;39(5):387-97, 1997.

Tsuboi A, Oka Y, Ogawa H, Elisseeva OA, Tamaki H, Oji Y, Kim EH, Soma T, Tatekawa T, Kawakami M, Kishimoto T, Sugiyama H, Constitutive expression of the Wilms' tumor gene WT1 inhibits the differentiation of myeloid progenitor cells but promotes their proliferation in response to granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF), *Leuk Res.*, May;23(5):499-505, 1999.

Villa P, Bigini P, Mennini T, Agnello D, Laragione T, Cagnotto A, Viviani B, Marinovich M, Cerami A, Coleman TR, Brines M, Ghezzi P, Erythropoietin selectively attenuates cytokine production and inflammation in cerebral ischemia by targeting neuronal apoptosis, *J Exp Med.*, Sep 15;198(6):971-5, 2003.

Vogel V, Kramer HJ, Bäcker A, Meyer-Lehnert H, Jelkmann W, Fandrey J, Effects of erythropoietin on endothelin-1 synthesis and the cellular calcium messenger system in vascular endothelial cells, *Am J Hypertens.*, Mar;10(3):289-96, 1997.

Wagner KD, Wagner N, Vidal VP, Schley G, Wilhelm D, Schedl A, Englert C, Scholz H, The Wilms' tumor gene Wt1 is required for normal development of the retina, *EMBO J.*, Mar 15;21(6):1398-405, 2002.

Wagner N, Wagner KD, Hammes A, Kirschner KM, Vidal VP, Schedl A, Scholz H, A splice variant of the Wilms' tumour suppressor Wt1 is required for normal development of the olfactory system, *Development*, Mar;132(6):1327-36, 2005.

## 7. Literaturverzeichnis

- Wagner N, Wagner KD, Theres H, Englert C, Schedl A, Scholz H, Coronary vessel development requires activation of the TrkB neurotrophin receptor by the Wilms´ tumor transcription factor Wt1, *Genes Dev.*, Nov 1; 19(21):2631-42, 2005.
- Wallach I, Transkriptionelle Regulation des Erythropoietin-Rezeptor-Gens im zentralen Nervensystem, *Dissertationsschrift, HU zu Berlin*, 2007.
- Wallach I, Zhang J, Hartmann A, van Landeghem FK, Ivanova A, Klar M, Dame C, Erythropoietin-receptor gene regulation in neuronal cells, *Pediatr Res.*, Jun;65(6):619-24, 2009.
- Wang ZY, Qiu QQ, Huang J, Gurrieri M, Deuel TF, Products of alternatively spliced transcripts of the Wilms' tumor suppressor gene, wt1, have altered DNA binding specificity and regulate transcription in different ways, *Oncogene*, Feb 2;10(3):415-22, 1995.
- Wang W, Lee SB, Palmer R, Ellisen LW, Haber DA, A functional interaction with CBP contributes to transcriptional activation by the Wilms tumor suppressor WT1, *J Biol Chem.*, May 18;276(20):16810-6, 2001.
- Werner H, Rauscher FJ 3rd, Sukhatme VP, Drummond IA, Roberts CT Jr, LeRoith D, Transcriptional repression of the insulin-like growth factor I receptor (IGF-I-R) gene by the tumor suppressor WT1 involves binding to sequences both upstream and downstream of the IGF-I-R gene transcription start site, *J Biol Chem.*, Apr 29;269(17):12577-82, 1994.
- Wilm B, Ipenberg A, Hastie ND, Burch JB, Bader DM, The serosal mesothelium is a major source of smooth muscle cells of the gut vasculature, *Development*, Dec;132(23):5317-28, 2005.
- Wilson IA & Jolliffe LK, The structure, organization, activation and plasticity of the erythropoietin receptor, *Current Opinion in Structural Biology*, 9: 696-704, 1999.
- Winkelmann JC, Penny LA, Deaven LL, Forget BG, Jenkins RB, The gene for the human erythropoietin receptor: analysis of the coding sequence and assignment to chromosome 19p, *Blood*, Jul 1;76(1):24-30, 1990.
- Wright GL, Hanlon P, Amin K, Steenbergen C, Murphy E, Arcasoy MO, Erythropoietin receptor expression in adult rat cardiomyocytes is associated with an acute cardioprotective effect for recombinant erythropoietin during ischemia-reperfusion injury, *FASEB J.*, Jun;18(9):1031-3, 2004.

## 7. Literaturverzeichnis

- Wu H, Xin L, Rudolf J, Lodish HF, Generation of Committed Erythroid BFU-E and CFU-E Progenitors does not require Erythropoietin or the Erythropoietin Receptor, *Cell*, Vol. 83, 59-67, 1995.
- Wu H, Lee SH, Gao J, Liu X, Iruela-Arispe ML, Inactivation of erythropoietin leads to defects in cardiac morphogenesis, *Development*, Aug;126(16):3597-605, 1999.
- Wu Y, Fraizer GC, Saunders GF, GATA-1 transactivates the WT1 hematopoietic specific enhancer, *J Biol Chem.*, Mar 17;270(11):5944-9, 1995.
- Yamagami T, Sugiyama H, Inoue K, Ogawa H, Tatekawa T, Hirata M, Kudoh T, Akiyama T, Murakami A, Maekawa T, Growth inhibition of human leukemic cells by WT1 (Wilms tumor gene) antisense oligodeoxynucleotides: implications for the involvement of WT1 in leukemogenesis, *Blood*, Apr 1;87(7):2878-84, 1996.
- Yi T, Zhang J, Miura O, Ihle JN, Hematopoietic cell phosphatase associates with erythropoietin (Epo) receptor after Epo-induced receptor tyrosine phosphorylation: identification of potential binding sites, *Blood*, Jan 1;85(1):87-95, 1995.
- Yoshimura A, Arai K, Physician Education: The Erythropoietin Receptor and Signal Transduction, *Oncologist*,1(5):337-339, 1996.
- Yoshimura A, Misawa H, Physiology and function of the erythropoietin receptor, *Curr Opin Hematol.*, May;5(3):171-6, 1998.
- Yousoufian H, Zon LI, Orkin SH, D'Andrea AD, Lodish HF, Structure and transcription of the mouse erythropoietin receptor gene, *Mol Cell Biol.*, Jul;10(7):3675-82, 1990.
- Yu X, Shacka JJ, Eells JB, Suarez-Quian C, Przygodzki RM, Beleslin-Cokic B, Lin CS, Nikodem VM, Hempstead B, Flanders KC, Costantini F, Noguchi CT, Erythropoietin receptor signalling is required for normal brain development, *Development*, Jan;129(2):505-16, 2002.
- Zanjani ED, Poster J, Burlington H, Mann LI, Wasserman LR, Liver as the primary site of erythropoietin formation in the fetus, *J Lab Clin Med.*, Mar;89(3):640-4, 1977.
- Zhang X, Xing G, Fraizer GC, Saunders GF, Transactivation of an intronic hematopoietic-specific enhancer of the human Wilms' tumor 1 gene by GATA-1 and c-Myb, *J Biol Chem.*, Nov 14;272(46):29272-80, 1997.

## 7. Literaturverzeichnis

Zon LI, Youssoufian H, Mather C, Lodish HF, Orkin SH, Activation of the erythropoietin receptor promoter by transcription factor GATA-1, Proc Natl Acad Sci U S A, Dec 1;88(23):10638-41, 1991.

## 8. Abkürzungsverzeichnis

### 8. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AcOH	Essigsäure
AK	Antikörper
AML	akute myeloische Leukämie
AmpliTaq	a modified form of the <i>Thermus aquaticus</i> Taq DNA polymerase gene
ANOVA	analysis of variance
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
Bcl-2	B-Zell-Lymphom-2-Zelllinie
BFU-E	burst-forming unit-erythroid
BIT	bovines Serumalbumin, Insulin und Transferrin
bp	Basenpaar(e)
BSA	bovine serum albumine
°C	Grad Celsius
CD	cluster of differentiation
CFU-E	colony-forming unit-erythroid
CFU-GEMM	colony-forming unit-granulocyte Makrophagen-Erythroiden-Megakaryozyten
ChiP	Chromatinimmunpräzipitation
CML	chronische myeloische Leukämie
COCl <sub>2</sub>	Kobalt(II)Chlorid
CTL	zytotoxische T-Lymphozyten
Cys	Cystein
CBF	core binding factor
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
c-kit	Stammzellefaktor-Rezeptor
c-mpl	Thrombopoietin-Rezeptor
myb	Myeloblastose
myc	Myelozytomatose
CSF-1	colony-stimulating factor 1
Ct	threshold cycle

## 8. Abkürzungsverzeichnis

CTGF	connective tissue growth factor
Cu/Zn-SOD	Kupfer-und-Zink-enthaltende Superoxiddismutase
Dax-1 hypoplasia	dosage-sensitive sex reversal-adrenal congenita critical region on the X chromosome, gene 1
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethyl-Sulfoxid
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphate
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol
E	Tag der embryonalen bzw. fetalen Entwicklung
EC50	mittlere effektive Konzentration
E-cadherin	epithelial calcium-dependent adhesion molecule
EGR	Early-Growth-Response
Epo	Erythropoietin
EpoR	Erythropoietin-Rezeptor
et al.	et alii
His	Histidin
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGFR	Epidermal-Growth-Factor-Receptor
EGR-1	Early Growth Response Protein 1
FKS	fetales Kälberserum
FREAC-4	Human Forkhead Gene
g	Gramm
GAPDH	Glyceraldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
G $\alpha_{i-2}$	heterotrimeric guanine nucleotide-binding protein
GF	growth factor
h	Stunde

## 8. Abkürzungsverzeichnis

h	human
H <sub>2</sub> O	Wasser
EMSA	Elektrophoresemobilitätsshiftassay
IGF	Insulin-Like-Growth-Factor-Gen
IGF-II	Insulin-Like-Growth-Factor-2-Gen
IGF-1R	Insulin-Like-Growth-Factor-1-Rezeptor
IL	Interleukin
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen Kolonie- stimulierender Faktor
G-CSFR	Granulozyten-Kolonien stimulierender Faktor Rezeptor
HCl	Salzsäure
HEK293	humane embryonale Nierenzelllinie
HEL	humane Erythroleukämiezelllinie
HepG2	humane hepatozelluläre Karzinomzelllinie
HindIII	Typ-II-Restriktionsendonuklease
Hsp70	Hitzeschockprotein
HTERT	Human Telomerase Reverse Transcriptase
Ig	Immunglobulin
IgG	Immunglobulin G
JAK2	Janus-Tyrosinkinase-2
K562	humane erythromyeloblastische Leukämiezell- linie
kb	Kilobasenpaar
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
l	Liter
Lys	Lysin
m	murin
m	milli
M	Mol
MACS	magnetische Zellseparation

## 8. Abkürzungsverzeichnis

MAP	Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis
MDR-1	Multiple-Drug-Resistance-Gen 1
MDS	myelodysplastisches Syndrom
MEL	murine Erythroleukämiezelllinie
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MIS	Anti-Müller-Hormon
mRNA	messenger RNA
Mut	Mutante
N <sub>2</sub>	Stickstoff
NaCl	Natriumchlorid
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NovH	human nov gene
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
ODC	Ornithindecaboxylase
Oligo	Oligonukleotid
P	Phosphat
P21	Cyclin-abhängiger Kinase-Inhibitor
Pax2	Paired-box-Gen 2
PBS	Phosphat buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PDGF-A	Platelet-derived growth factor subunit A
PI3-Kinase/Akt	Phosphatidylinositol-3-Kinase
pH	Wasserstoffionenkonzentration
PMSF	Phenyl-methyl-sulfonyl-fluorid
p-Wert	probability-Wert
RAR- $\alpha$	Retinsäurenrezeptor- $\alpha$
Reh	B-Zell-Leukämiezelllinie
rhEpo	rekombinantes humanes Erythropoietin
RLU	Renilla-Luziferaseeinheit
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	revolutions per minute
RpAp46	retinoblastoma binding protein p46

## 8. Abkürzungsverzeichnis

RPMI	Zellkulturmedium aus dem Roswell Park Memorial Institute
RT-PCR	Reverse Transkriptase – Polymerase-Kettenreaktion
s	Sekunde/n
SacI	Restriktionsenzym
SCF	Stammzellefaktor
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Ser	Serin
SH2	Src Homology 2
SHP	SH-2 domain-containing proteins
SH-SY5Y	Neuroblastomzelllinie
Sp1	Simian-virus-40
Sry	sex determining region of Y
STAT	Signal transducer and activator of transcription
TATA	T(hymin)-A(denin)-T(hymin)-A(denin)
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TBS	Tris buffered saline
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TGF- $\beta$	Transforming growth factor- $\beta$
Thr	Threonin
T-Lymphozyten	Thymus-Lymphozyten
TpoR	Thrombopoietinrezeptor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TrfR	Transferrinrezeptor
U	Unit
$\mu$	Mykro
UT-7	humane akute myeloische Leukämiezelllinie
UV	Ultraviolett
V	Volt
VDR	Vitamin D-Rezeptor
WSXWS	Tryptophan-Serin-beliebig-Tryptophan-Serin

## 8. Abkürzungsverzeichnis

Wt

Wildtyp

Wt1

Wilms-Tumor-Gen 1

ZNS

Zentrales Nervensystem

## **9. Lebenslauf**

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

## 10. Eidesstattliche Erklärung

Ich, Patricia Krause, erkläre, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift mit dem Thema: „Der Tumorsuppressor Wt1 aktiviert die Transkription des Erythropoietinrezeptors in hämatopoietischen Vorläuferzellen“ selbst und ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst, keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

---

Datum

---

Unterschrift