

Aus dem
CharitéCentrum für Grundlagenmedizin
Institut für Translationale Physiologie
Direktor: Prof. Dr. Pontus B. Persson

Habilitationsschrift

Die Rolle des Wilms-Tumorproteins (WT1) in der Organentwicklung

zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach Physiologie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité-Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. Karin M. Kirschner
geboren in Karlsruhe

Eingereicht: 06/2023

Dekan: Prof. Dr. Joachim Spranger

1. Gutachterin: Prof. Dr. Dörthe Katschinski, Göttingen

2. Gutachter: Prof. Dr. Rudolf Schubert, Augsburg

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	II
1. Einleitung.....	1
1.1 Organogenese	1
1.2 Das Wilms-Tumorprotein (WT1)	1
1.3 Die Rolle des WT1 der Nephrogenese.....	3
1.4 WT1 als geschlechtsregulierender Faktor	4
1.5 WT1 in der Hämatopoese.....	6
1.6 WT1 Deletion im Tiermodell	6
2. Zielsetzung.....	8
3. Eigene Arbeiten	9
3.1 Das Wilms-Tumorprotein WT1 aktiviert die Transkription des Erythropoietin-Rezeptors in hämatopoetischen Vorläuferzellen.....	9
3.2 <i>Wt1</i> -Haploinsuffizienz induziert die braune Differenzierung des epididymalen Fettdepots und mildert Stoffwechselstörungen bei Mäusen mit fettreicher Ernährung.....	23
3.3 Die Transkriptionsregulierung durch das Wilms-Tumorprotein WT1 deutet auf eine Rolle der Metalloproteinase ADAMTS16 bei der Entwicklung des Urogenitalsystems der Maus hin.	39
3.4 Die kupferhaltige Aminoxydase 1 (AOC1) ist ein nachgeschaltetes Zielgen des Wilms-Tumorproteins WT1 während der Nierenentwicklung.....	57
3.5 Auffallend konservierte Veränderungen der Genexpression von polyaminregulierenden Enzymen bei verschiedenen Formen von akuter und chronischer Nierenschädigung.....	71
4. Diskussion.....	91
4.1 Der Erythropoietin-Rezeptor als WT1 Zielgen.....	91
4.2 WT1 unterdrückt die braune Differenzierung der Adipozyten	92
4.3 WT1 im Urogenitalsystem während der Embryonalentwicklung	93
4.4 Die Rolle des durch WT1 regulierten Enzyms AOC1 in der Nierenentwicklung und der Nierenschädigung.....	94
5. Literaturangaben	98
6. Zusammenfassung.....	106
7. Danksagung	108
8. Erklärung.....	109

Abkürzungsverzeichnis

ADAMTS16	a Disintegrin-Like And Metalloprotease With Thrombospondin Type 1 Motif 16
<i>Aldh1a1</i>	Aldehyde Dehydrogenase 1 Family Member A1
AML	akute myeloische Leukämie
AOC1	kupferhaltige Aminoxidase 1
BAT	braunen Fettgewebe
BCL-2	B-cell lymphoma 2
ChIP	Chromatin Immunoprecipitation
CML	chronische myeloische Leukämie
CD117	Cluster of differentiation 117
<i>Cidea</i>	Cell Death Inducing DFFA Like Effector A
<i>Cpt1b</i>	Carnitine Palmitoyltransferase 1B
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay
<i>EpoR</i>	Erythropoetin-Rezeptor
ER	Endoplasmatische Retikulum
FOXL	Forkhead Box L1
FST	Follistatin
GATA3	GATA Binding Protein 3
GC	Guanin und Cytosin
HIF	Hypoxie-induzierbarer Faktor
KO	Knockout
KTS	Lysine Threonine Serine
<i>Lcn2</i>	Lipocalin-2
MMP-2	Matrix Metalloproteinase-2
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
MT1-MMP	Membrane-type I matrix metalloproteinase
ODC1	Ornithine Decarboxylase 1
<i>Ppargc1a</i>	PPARG Coactivator 1 Alpha
<i>Prdm16</i>	PR/SET Domain 16
rhEpo	Rekombinantes humanes Erythropoietin
RSPO1	R-Spondin 1
<i>Sat1</i>	Spermidine/Spermine N1-Acetyltransferase 1
<i>Smox</i>	Spermine Oxidase
SOX9	Sex-determining region Y-box 9
SRY	Sex determining region of Y-Chromosom
TIMP-2	Tissue Inhibitor of Metalloproteinases 2
<i>Tmem26</i>	Transmembrane Protein 26
<i>Ucp1</i>	Uncoupling Protein 1
WAGR	Wilms' tumor/Aniridia/Genitourinary Anomalies/Mental Retardation
WAT	weißes Fettgewebe
WNT4	Wnt Family Member 4
WT1	Wilms-Tumorprotein
X	X-Chromosom
<i>Xbp1</i>	X-Box Binding Protein 1
Y	Y-Chromosom
<i>Zfp423</i>	Zinc Finger Protein 423

1. Einleitung

1.1 Organogenese

Die Organogenese beschreibt den Prozess der Bildung der verschiedenen Organe und Gewebe in einem Organismus. Während der Embryonalentwicklung bilden sich beim Menschen am 16. Entwicklungstag die drei Keimschichten (Ektoderm, Mesoderm und Endoderm). Aus dem Ektoderm entstehen unter anderem die Haut, das Nervensystem und die Sinnesorgane.¹ Aus dem Mesoderm entstehen z.B. Muskeln, Knochen und Blutgefäße,² während aus dem Endoderm unter anderem Darm, Leber und Bauchspeicheldrüse hervorgehen³.

Die Organogenese wird durch verschiedene Signalwege wie z.B. den Notch-, den Wnt- und den Hedgehog-Weg, streng kontrolliert.^{4,5} Solche Signalwege regulieren die Expression bestimmter Gene, die wiederum die Differenzierung steuern. Die Organogenese kann durch verschiedene Umweltfaktoren gestört werden, z. B. durch Toxine⁶, Strahlung⁷ oder Infektionen⁸. Diese Faktoren können die normale Expression stören, was zu schwerwiegenden Störungen der Entwicklung führen kann.

Die Mechanismen der Organogenese zu verstehen, ist für die Vorbeugung und die Behandlung von Krankheiten, sowie für die Entwicklung regenerativer Therapien, wichtig.

1.2 Das Wilms-Tumorprotein (WT1)

Das Wilms-Tumorprotein (WT1) ist ein Transkriptionsfaktor, das aber auch in der post-transkriptionellen Expressionsregulation eine Rolle spielt. WT1 hat eine wichtige Rolle während der Organogenese. Besonders gut untersucht ist seine Rolle bei der Entwicklung der Nieren und Gonaden. Der Transkriptionsfaktor wurde nach dem Wilms-Tumor benannt, einer Form von Nierenkrebs, die mit inaktivierenden Mutationen im *WT1* Gen einhergehen kann. Aufgrund seiner möglichen Rolle in der Tumorgenese ist WT1 als Ziel therapeutischer Interventionen Gegenstand umfangreicher Forschungsarbeiten.

Das WT1 Protein enthält vier Zinkfinger-Domänen, die an spezifische DNA-Sequenzen binden und so die Expression von Zielgenen regulieren können.⁹ WT1 bindet an ein hoch konserviertes GC-reiches Fragment.^{10, 11} In der Zinkfingerregion des WT1 lokalisierte Sequenzen vermitteln eine nukleäre Lokalisation des Transkriptionsfaktors WT1.¹² WT1 kann in seiner Aktivität durch Phosphorylierung reguliert werden.¹³ Über die Signalwege, die Regulation dieses vermitteln ist jedoch bisher wenig bekannt. WT1 kann die Expression seiner Zielgene sowohl aktivieren als auch hemmen.^{14, 15} WT1 reguliert unter anderem Gene, die für Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren¹⁵⁻¹⁷, Transkriptionsfaktoren¹⁸⁻²⁰, extrazelluläre Proteine^{21, 22} und Zellzyklusregulatoren²³ kodieren.

Das *WT1* Gen besteht aus 10 Exons, und weist mehrere Transkriptvarianten aufweist, die durch alternatives Spleißen^{24, 25} und der Nutzung von unterschiedlichen Promotoren entstehen^{26, 27}. Diese Transkriptvarianten haben unterschiedliche Eigenschaften und Funktionen. Die häufigsten Spleißvarianten von *WT1* sind die *WT1(+KTS)* und *WT1(-KTS)* Variante.²⁴ Die Kürzel +KTS und -KTS beziehen sich auf das Vorhandensein bzw. Fehlen von drei Aminosäuren (Lysin, Threonin und Serin). Diese drei Aminosäuren werden durch alternatives Spleißen von Exon 9 zwischen die Zinkfinger 3 und 4 in das Protein eingefügt.²⁴ Diese beiden *WT1* Splicevarianten unterscheiden sich wesentlich in ihrer DNA Bindungsaffinität. Der Isoform *WT1(-KTS)* fehlt die KTS-Sequenz, und es hat sich gezeigt, dass sie im Vergleich zu *WT1(+KTS)* eine deutlich höhere DNA Bindungsaffinität aufweist.²⁸ Die Isoform *WT1(+KTS)* enthält die zusätzliche KTS-Aminosäuresequenz. Hier wird angenommen, dass die zusätzlichen Aminosäuren KTS RNA-Bindungspezifität verleihen.²⁹⁻³¹ Das Verhältnis von *WT1(+KTS)* zu *WT1(-KTS)* Protein, ca. 60 zu 40 %, ist zwischen den Geweben konserviert.^{24, 32} Eine unausgewogene Expression der beiden Isoformen kann zu Entwicklungsanomalien führen.³³ Weitere Spleißvarianten des *WT1* umfassen *WT1-A*, *WT1-B* und *WT1-C*.²⁴ Diese Isoformen entstehen durch alternatives Spleißen von Exon 5, 7 bzw. 8 (zusammengefasst in Scharnhorst et. al³⁴). Unerwarteter Weise verursachte die selektive Ablation der *WT1*-Isoformen, die Exon 5 enthalten, keinen offensichtlichen Phänotyp bei Mäusen. Dies lässt eine funktionelle Redundanz zwischen den verschiedenen *WT1* Isoformen während der Embryonalentwicklung vermuten.³⁵

WT1 wird während der Embryonalentwicklung in einer Vielzahl von Geweben exprimiert, unter anderem in den Nieren, Gonaden, der Leber, dem Herzen und dem Mesothel.³⁶ Neben seiner Rolle in der Entwicklung wurde die *WT1* Expression auch in erwachsenen Geweben und Zellen beobachtet, hauptsächlich in den Nieren³⁷ und im Knochenmark³⁸ und Fettgewebe^{39, 40}. In normalen Geweben ist die *WT1* Expression auf bestimmte Zelltypen und Entwicklungsstadien beschränkt. Faktoren, die diese sehr selektive Expression des *WT1*, in diesen wenigen Zelltypen, aktivieren sind bisher nur wenige bekannt. Bisher konnte nur der Hypoxie-induzierbare Faktor (HIF) als aktivierender Transkriptionsfaktor der *WT1* Expression beschrieben werden, jedoch gibt es vermutlich noch weitere regulierende Faktoren.^{41, 42}

Seine wichtige Rolle in der Embryonalentwicklung erlangt *WT1* durch seinen Einfluss durch die transkriptionelle Regulation verschiedener zellulärer Prozesse, wie z. B. Zellproliferation, Apoptose und DNA-Reparatur.⁴³ *WT1* befähigt Zellen, zwischen einem epitheliale und mesenchymalem Zustand zu wechseln.^{44, 45} Es konnte gezeigt werden, dass diese Transition in embryonalen Zellaggregaten von *WT1*-Knockout-Mäusen nicht mehr stattfindet.⁴⁶

Mutationen im *WT1*-Gen werden mit verschiedenen Krankheiten in Verbindung gebracht, darunter Wilms-Tumor⁴⁷, Denys-Drash³⁷, Frasier^{33, 48} und WAGR-Syndrom²⁵. Der Wilms-Tumor ist Nierenkrebs,

der hauptsächlich Kinder betrifft. In 5-10 % der Tumore sind inaktivierende Mutationen im WT1 Gen für die Tumorentwicklung verantwortlich.⁴⁹ Es wird angenommen, dass der Wilms-Tumor entsteht, wenn in der Embryonalentwicklung pluripotente mesenchymale Stammzellen nicht in Glomeruli und Tubuli differenzieren, sondern weiter proliferieren.^{47, 49, 50} Das Denys-Drash-Syndrom ist eine seltene genetische Störung, die durch die Entwicklung einer Nierenerkrankung und männlichen Pseudohermaphroditismus gekennzeichnet ist.⁵¹ Das Frasier-Syndrom ist eine Erkrankung, die durch die Entwicklung von Glomerulosklerose und männlichem Pseudohermaphroditismus gekennzeichnet ist.⁵² Patienten mit WAGR Syndrom weisen schwere Entwicklungsstörungen auf, die die Entwicklung von Wilms-Tumoren, Aniridie, genitourinäre Fehlbildungen und geistiger Retardierung beinhalten.⁵³

WT1 spielt auch bei der Entwicklung weiterer Krebsarten eine Rolle. Bei verschiedenen Krebsarten, darunter Karzinomen der Lunge⁵⁴, des Darms⁵⁵, des Thymus⁵⁶, der Brust⁵⁷, Plattenepithelkarzinom des Kopfes und Halses⁵⁸, als auch in Sarkomen der Knochen und Weichteile⁵⁹ und in Leukämien⁶⁰, wird WT1 übermäßig stark exprimiert, wohingegen es im Wilms-Tumor durch Mutation des *WT1* zu einer fehlenden Expression oder Funktion kommt⁵⁰. Diese Beobachtungen legen nahe, dass WT1 eine duale Rolle als Tumorgen und als Tumorsuppressor spielt, da es die Bildung von Wilms-Tumoren verhindert kann, jedoch unter bestimmten Bedingungen die Proliferation bösartiger Zellen fördert⁶¹. Diese gegensätzliche Rolle lässt sich möglicherweise dadurch erklären, dass WT1 in einem unterschiedlichen Zellhintergrund als Aktivator und als Suppressor eines Gens agieren kann.^{62, 63} Die gezielte Behandlung von WT1 positiven Krebsarten mit immuntherapeutischen Ansätzen, die sich gegen das WT1 richten, hat sich in präklinischen Studien und klinischen Versuchen als vielversprechend erwiesen.⁶⁴ Die Entwicklung wirksamer Therapien, die auf WT1 abzielen, ist jedoch noch nicht abgeschlossen.

1.3 Die Rolle des WT1 der Nephrogenese

WT1 hat sich als wichtiger Regulator der Nierenentwicklung erwiesen, der eine entscheidende Rolle bei der Differenzierung und Erhaltung von Nierenvorläuferzellen spielt.⁶⁵ Um die Proliferation und Differenzierung der Vorläuferzellen zu steuern, interagieren während der Entwicklung der Nieren verschiedene Zelltypen miteinander. Durch die Aktivierung unterschiedlicher Signalwege wird so die Entwicklung verschiedener Zelltypen koordiniert.

Die Nieren entwickeln sich aus dem intermediären Mesoderm, einer Gruppe von Zellen, die sich entlang der Mittellinie des Embryos bildet.⁶⁶ Diese Zellen exprimieren auch WT1.⁶⁵ Das intermediäre Mesoderm umgibt den eptelialen Wolffschen Gang, den es zum Aussprossen einer Ureterknospe anregt. Das Mesenchym und die aussprossende Ureterknospe interagieren, was zur weiteren Verzweigung der Ureterknospe führt. Diese tubuläre Struktur der sich verzweigenden Ureterknospe ist der Ursprung des sich immer weiter verzweigenden Sammelrohrsystems.⁶⁶ Durch weitere Interaktion des sich teilenden Ureters mit dem umgebenden Mesenchym kommt es zur Kondensierung

des Mesenchyms im Bereich der Ureterspitze. Durch mesenchymaler zu epithelialer Transition in diesem kondensierten Teil des Mesenchyms bildet sich ein Nierenbläschen. Aus dem Nierenbläschen entwickelt sich ein S-förmiger Gang, der Ursprung des Nephrons. Der S-förmige Gang verlängert sich und verschmilzt an einem Ende mit dem Sammelrohr.⁶⁷ Am entgegengesetzten Ende bildet sich der Glomerulus aus. Das Zwischenstück des S-förmigen Ganges verlängert sich nochmals und wird zum Tubulussystem mit proximalem Tubulus, Henle-Schleife und distalem Tubulus.⁶⁷

Die Expression des WT1 im Mesenchym der Nierenanlage ist für eine ordnungsgemäße Ausbildung von Nephronen unabdingbar.⁶⁸ In der Nierenentwicklung wird WT1 in den frühen mesenchymalen Vorläuferzellen der Nephrone exprimiert.⁶⁹ Es ist für die mesenchymalen zu epithelialen Transition dieser Vorläuferzellen und damit für ihre Differenzierung notwendig.⁶⁵ Die Wt1 Expression nimmt im Laufe dieser Entwicklung im Tubulussystem der Nephrone ab³⁶, und in der adulten Niere wird WT1 nur noch im Glomerulus in den Podozyten exprimiert⁷⁰. Es konnte gezeigt werden, dass WT1 die Expression von Genen reguliert, die an der Proliferation und Differenzierung des Mesenchyms und an der Bildung des Nephrons beteiligt sind, wie z. B. Pax2¹⁹ und Wnt4⁶². Darüber hinaus hat sich gezeigt, dass WT1 die Expression von Genen reguliert, die an der Bildung und Funktion des Podozyten beteiligt sind, wie z.B. Nephrin⁷¹ und Podocin⁷². Mutationen im *WT1*-Gen werden mit verschiedenen Nierenerkrankungen in Verbindung gebracht, darunter Wilms-Tumor^{37, 50, 73}, fokal segmentale Glomerulosklerose⁷⁴ und nephrotisches Syndrom⁷⁵.

1.4 WT1 als geschlechtsregulierender Faktor

WT1 spielt eine entscheidende Rolle bei der Ausdifferenzierung der embryonalen Gonadenanlage.^{37, 53} Die Gonaden von Säugetieren werden durch Gewebe gebildet, das sich aus dem intermediären Mesoderm auf beiden Seiten der embryonalen Mittellinie abgeleitet.⁷⁶ Die Etablierung der bipotenten Gonadenanlage erfolgt geschlechtsunspezifisch bei XX- und XY-Individuen und ist bei Ratten und Mäusen bis ca. 12 Tage nach der Empfängnis abgeschlossen.⁷⁶ Aus Teilen des intermediären Mesoderms entwickelt sich das Mesonephros, die sogenannte Urniere. Hier bilden sich die Urogenitalkanäle. Zu diesem sehr frühen Zeitpunkt in der Embryonalentwicklung können diese Blut filtern und Primärharn bilden. Diese Filtrationsleistung hat jedoch keinen Einfluss auf die Entwicklung des Embryos. Das Mesonephros verdickt sich zu einer Seite und bildet die Gonadenanlage aus. Die primordialen Keimzellen fangen an, zwischen die bisher undifferenzierten somatischen Zellen der Gonadenanlage einzuwandern. Die weitere Entwicklung der bipotenten Gonaden zu Testes oder Ovar wird durch das Vorhandensein oder Fehlen des SRY-Gens auf dem Y-Chromosom bestimmt. Ist das SRY-Gen vorhanden, leitet es die Differenzierung der Gonaden in Hoden ein.⁷⁷ SRY und sein wichtigstes Zielgen Sox9 (sex-determining region Y-box 9) fördern die Differenzierung von Sertoli-Zellen, was wiederum eine Voraussetzung für die Bildung des Samenstrangs im Hoden ist.^{78, 79} Die Hoden beginnen

dann, Testosteron zu produzieren, das die Entwicklung des männlichen Fortpflanzungssystems fördert. Fehlt das *SRY*-Gen, entwickeln sich die Gonaden zu Ovarien. Die Entwicklung des weiblichen Fortpflanzungssystems wird zudem durch andere Faktoren wie das Vorhandensein des *WNT4*-Gens und des *RSPO1*-Gens beeinflusst.^{80, 81}

Für die Weiterentwicklung der bipotenten Gonadenanlage ist *WT1* notwendig.⁶⁵ Die Expression von *WT1* ist während der Entwicklung der Gonaden stark reguliert.³² *WT1* ist im Mesonephros und in der bipotenten Gonadenanlage von Mäusen vorhanden.³² Die Expression von *WT1* wird in den somatischen Zellen nachgewiesen³⁷ und ist entscheidend für die Differenzierung von Sertoli-Zellen des Hodens und den Granulosazellen des Eierstocks. Die Expression von *WT1* in den somatischen Zellen ist auch für die Migration und das Überleben der primordialen Keimzellen wichtig.⁸² Die Expression von *WT1* ist in den fetalen Hoden während der Ausdifferenzierung der Hodenkanälchen am höchsten und nimmt ab, wenn die Keimzellen in die Meiose eintreten.⁸³ Im adulten Testis ist *WT1* nur noch in Sertolizellen zu finden.^{37, 70, 84, 85} Im adulten Ovar ist die *WT1* Expression auf die Granulosazellen beschränkt.³⁷ Bei Fehlen der *WT1* Expression findet die normale Verdickung der Gonadenleiste nicht statt, was zu einer Gonaden-Agenesie führt.⁶⁵ Während der Hodendifferenzierung führt eine konditionale *WT1*-Deletion in Sertoli-Zellen zur Auflösung der Hodenkanälchen und dem Verlust von Keimzellen.⁸⁶ Diese abnorme Entwicklung der Hoden korreliert mit einem Verlust der *SOX9* Expression.⁸⁶ Eine gestörte *WT1*-Funktion in XX-Gonaden korreliert mit reduzierter Follikelzahl und verringerter Größe der Eierstöcke.⁸⁷

WT1 reguliert die Expression einer Reihe von Genen, die an der Gonadenentwicklung beteiligt sind. In den XY-Gonaden ist *WT1* beispielsweise für die Expression des geschlechtsbestimmenden Faktors *SRY* und des Anti-Müller-Hormon-Rezeptors 2, der für die Rückbildung der weiblichen Urogenitalkanäle entscheidend ist, erforderlich.^{85, 88, 89} In den weiblichen Gonaden ist *WT1* an der Expression von Genen wie *FOXL* und *FST* beteiligt, die für die Differenzierung der Eierstöcke erforderlich sind.⁹⁰

Mutationen im *WT1*-Gen wurden mit einer Reihe von Störungen der Gonadenentwicklung in Verbindung gebracht, darunter das Denys-Drash-³⁷, WARG-³⁸ und das Frasier-Syndrom⁴⁸. Diese Erkrankungen zeigen Anomalien in der Gonadendifferenzierung, können zur Entwicklung von Intersexualität führen und haben ein erhöhtes Risiko für gonadale Tumoren. Neben seiner Rolle bei der Entwicklung der Gonaden wurde *WT1* auch mit der Entwicklung bestimmter Arten von gonadalen Tumoren in Verbindung gebracht.⁹¹ Eine erhöhte *WT1* Expression wurde zudem bei Eierstockkrebs beschrieben.^{92, 93} In diesen Tumoren ist die Expression von *WT1* häufig dysreguliert, was zu einer abnormen Expression von Genen führt, die an der Zellproliferation und -differenzierung beteiligt sind.

1.5 WT1 in der Hämatopoese

WT1 zeigt eine starke Expression in hämatopoetischen Stammzellen und Vorläuferzellen³⁸. Es spielt eine wichtige Rolle bei der Bildung und Differenzierung dieser Zellen, indem es die Genexpression während der Zelldifferenzierung reguliert.⁹⁴ Hämatopoetische Stammzellen gehen während der Embryonalentwicklung aus dem Mesoderm hervor. Während der Hämatopoese differenzieren sich hämatopoetische Stammzellen in verschiedene Arten von Vorläuferzellen, die sich dann in reife Blutzellen wie Erythrozyten, Immunzellen und Thrombozyten differenzieren. WT1 ist an der Differenzierung bestimmter Blutzelllinien beteiligt. In der myeloischen Linie ist WT1 für die Differenzierung der Megakaryozyten, aus denen sich die Blutplättchen bilden, sowie für die Produktion von Neutrophilen, Monozyten und Makrophagen erforderlich.^{94,95} Im adulten Knochenmark bleibt die WT1 Expression in hämatopoetischen Stammzellen und Vorläuferzellen weiterhin erhalten³⁸, hier reguliert WT1 die Expression von Genen, die an der Zellproliferation, Differenzierung und dem Überleben beteiligt sind. In ausdifferenzierten Blutzellen wird die WT1 Expression herunterreguliert.⁹⁶

Mutationen im *WT1*-Gen wurden mit einer Reihe von Blutkrankheiten in Verbindung gebracht, darunter akute myeloische Leukämie (AML) und chronische myeloische Leukämie (CML).⁹⁷ Hier ist die Expression von WT1 erhöht, was zu einer abnormen Genexpression und Zellproliferation führt. In den meisten, jedoch nicht allen Studien, war die gesteigerte WT1 Expression mit einem verringerten Wachstum und einer gesteigerten Apoptose von akuten myeloischen Leukämiezellen verbunden.^{98,99} Die Rolle von WT1 bei der Differenzierung von Blutzellen und seine Fehlregulierung bei Leukämie machen es zu einem wichtigen Ziel für die Entwicklung neuer Therapieansätze für Blutkrankheiten. So haben sich WT1-Peptid-Impfstrategien bei myelodysplastischem Syndrom und akuter myeloischer Leukämie in ersten Studien als erfolgversprechend erwiesen.¹⁰⁰ Zudem haben WT1-spezifische T-Zellen in präklinischen Studien eine leukämiehemmende Wirkung gezeigt.¹⁰¹

WT1 ist ein potenzieller Biomarker für bestimmte Krebsarten. Erhöhte WT1-Konzentrationen wurden im Blut, Urin oder Gewebe von Patienten mit verschiedenen Krebsarten, darunter Leukämie^{60,102}, Eierstockkrebs¹⁰³, Brustkrebs¹⁰⁴ und Lungenkrebs¹⁰⁵, nachgewiesen. Die erhöhte WT1 Expression bei verschiedenen Arten von Leukämie macht es zu einem potenziellen Biomarker für die Diagnose und Überwachung,¹⁰⁶⁻¹⁰⁸. So haben AML-Patienten mit höheren WT1-Werten eine schlechtere Prognose als Patienten mit niedrigeren Werten.¹⁰⁹

1.6 WT1 Deletion im Tiermodell

Durch Deletion des *Wt1* Gens in Mäusen wurde die Rolle von WT1 in einer Vielzahl von Geweben und biologischen Prozessen untersucht. So haben Studien gezeigt, dass WT1 für die Entwicklung der Niere essentiell ist.^{65,68} Der Verlust von WT1 bei Mäusen führt zu einem vollständigen Fehlen der Nieren. In

diesen Tieren wird das Mesenchym des intermediären Mesoderms apoptotisch und ein weiteres Wachstum der Harnleiterknospe findet nach dem Aussprossen nicht statt.^{65, 68} Das induzierte Fehlen der WT1 Expression in Podozyten verursacht eine Glomerulonephritis und mesangiale Sklerose.⁷¹ In den meisten Geweben von Wt1-defizienten Mäusen, die normalerweise Wt1 exprimieren würden, tritt Apoptose auf. Diese These, dass WT1 den Zellverlust durch Apoptose verhindert wird auch dadurch gestützt, dass BCL-2, ein wichtiges antiapoptotisches Protein, als WT1 Zielgen beschrieben wurde.¹¹⁰

Abhängig vom genetischen Hintergrund sind Mäuse mit einer homozygoten Deletion des WT1 zwischen dem zwölften Tag und dem Ende der Trächtigkeit letal.^{65, 111} Die Tiere versterben vermutlich an Herzversagen. Ihre Herzen sind deutlich verkleinert und weisen eine stark reduzierte Wanddicke auf^{45, 65}. Zudem gibt es eine verminderte Entwicklung der Koronargefäße.¹¹² Weitere Defekte wurden im Mesothelgewebe (d.h., Zwerchfell, Peritoneum, Epikard)^{45, 65}, den Gonaden^{65, 86, 87} den Nebennieren⁴⁵ der Milz¹¹¹ dem Fettgewebe¹¹³ und Knochen¹¹³ beschrieben. Zudem konnte gezeigt werden, dass WT1 auch für die Entwicklung von neuronalen Geweben, insbesondere der Netzhaut erforderlich ist.¹¹⁴

In einem Versuch, die molekulare Funktion des WT1(+KTS)-Proteins zu definieren, wurden transgene Mäuse erzeugt, die nur das -KTS-Produkt exprimieren. Tiere mit selektivem Mangel an der WT1(+KTS) zeigten einen Phänotyp, der an das Frasier-Syndrom beim Menschen erinnert.³² Die Fehlbildungen, d. h. hypoplastische Nieren und Streak-Gonaden, waren bei den Wt1(-KTS)-defizienten Mäusen noch gravierender.³²

Mutationen im *WT1*-Gen treten bei >90 % der Patienten mit Denys- Drash-Syndrom (DDS) auf, die durchweg eine Glomerulosklerose entwickeln. Die Einführung einer Trunkierung der Zinkfinger im murinen *Wt1* Gen bewirkt eine schwere Nephropathie, die der bei DDS-Patienten beobachteten ähnelt.¹¹⁵

Die Untersuchungen zu den Folgen einer genetischen WT1 Ablation in Mäusen hat wesentlich dazu beigetragen, das Wissen über die Funktion von WT1 zu erweitern.

2. Zielsetzung

WT1 spielt eine wichtige Rolle bei der Entwicklung unterschiedlicher Organe und Mutationen im *WT1* Gen bzw. Störungen der normalen WT1 Expression sind mit verschiedenen Erkrankungen assoziiert. Es ist während der Embryonalentwicklung in verschiedenen Organen in spezifischen Zellen exprimiert. In dieser Arbeit soll untersucht werden, welche Gene durch WT1 reguliert werden und wie diese Regulation die Funktion von WT1 in der Organogenese vermittelt

3. Eigene Arbeiten

3.1 Das Wilms-Tumorprotein WT1 aktiviert die Transkription des Erythropoietin-Rezeptors in hämatopoetischen Vorläuferzellen.

WT1 wird in verschiedenen Stadien der erythroiden Entwicklung exprimiert.^{38, 116} und spielt eine entscheidende Rolle bei der Regulierung der Erythropoese in den verschiedenen Stadien.⁹⁴ In *Wt1* Knockout-Mäusen fehlt die ordnungsgemäße Differenzierung von erythroiden Vorläuferzellen. Der Verlust von WT1 in diesen Zellen führt zu einem Rückgang der reifen Erythrozyten und zu einer Anämie. Dieses deutet darauf hin, dass WT1 für das Überleben und die Differenzierung erythroider Zellen erforderlich ist.⁹⁴ Wie dieses durch WT1 vermittelt wird, war bisher unklar. In einer vorangegangenen Studie mit meiner Beteiligung konnte gezeigt werden, dass WT1 die Expression von Erythropoetin reguliert.¹¹⁷ Das Hormon, welches den letzten Schritt der Erythropoese reguliert. In der nachfolgenden Arbeit wurde die Hypothese untersucht, dass WT1 ein direkter transkriptioneller Aktivator des Erythropoietin-Rezeptor Gens sein könnte.

Kirschner KM, Hagen P, Hussels CS, Ballmaier M, Scholz H, Dame C.

The Wilms' tumor suppressor *Wt1* activates transcription of the erythropoietin receptor in hematopoietic progenitor cells. FASEB J. 2008 Aug;22(8):2690-701.

<https://doi.org/10.1096/fj.07-097576>

Der nachfolgende Text entspricht der übersetzten Zusammenfassung dieser Arbeit:

„Das Wilms-Tumorprotein WT1 ist für die Embryonalentwicklung erforderlich und wurde mit hämatologischen Erkrankungen in Verbindung gebracht. Da ein WT1 Mangel die Proliferation und Differenzierung von erythroiden Vorläuferzellen beeinträchtigen kann, haben wir die mögliche Rolle der transkriptionell aktiven WT1 Isoform, WT1(-KTS), bei der Regulierung der Expression des Erythropoietin-Rezeptors (*EpoR*) untersucht. WT1 und *EpoR* wurden in CD117⁺ hämatopoetischen Vorläuferzellen und in mehreren hämatopoetischen Zelllinien gemeinsam exprimiert. CD117⁺ Zellen von *Wt1* defizienten Mäuseembryonen (*Wt1*^{-/-}) zeigten eine signifikant geringere Proliferationsreaktion auf rekombinantes Erythropoetin als CD117⁺ Zellen von heterozygoten (*Wt1*^{+/-}) und Wildtyp-Wurfgeschwistern (*Wt1*^{+/+}). Die *EpoR*-Expression war in hämatopoetischen Vorläuferzellen (CD117⁺), denen *Wt1* fehlte, signifikant vermindert, und die erythroide Koloniebildungskapazität war in fetalen Leberzellen von *Wt1*-defizienten embryonalen Mäusen um mehr als 50% reduziert. WT1(-KTS) erhöhte signifikant die endogenen *EpoR* Transkripte in transfizierten Zellen. Der proximale *EpoR* Promotor von Mensch und Maus wurde durch WT1(-KTS) in transient ko-transfizierten K562 Erythroleukämiezellen mehr als 10-fach stimuliert. Ein verantwortliches Cis-Element, das im *EpoR* Promotor von Mensch und Maus hoch konserviert ist, wurde durch Mutationsanalyse, elektrophoretischen Mobilitätsverschiebungstest und Chromatin-

Immunpräzipitationstest identifiziert. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Aktivierung des *EpoR* Gens durch WT1 einen wichtigen Mechanismus in der normalen Hämatopoese darstellen könnte.“ (Übersetzung durch die Autorin)

3.2 *Wt1*-Haploinsuffizienz induziert die braune Differenzierung des epididymalen Fettdepots und mildert Stoffwechselstörungen bei Mäusen mit fettreicher Ernährung.

Der Transkriptionsfaktor WT1 wird spezifisch in Vorläuferzellen des viszeralen, nicht aber des subkutanen weißen Fettgewebes exprimiert.^{39, 40} (Zusammenfassende Darstellung in Kirschner et al.¹¹⁸) Abhängig von seiner anatomischen Lage wird das weiße Fettgewebe in subkutane und viszerale Depots unterteilt, die sich sowohl in ihrer Funktion als auch in ihrem Entwicklungsursprung unterscheiden.^{119, 120} Einer zweiten Art von Fettgewebe, dem braunen Fettgewebe, werden positive Stoffwechseleigenschaften zugeschrieben, da es in der Lage ist, überschüssige Nährstoffenergie in einem als Thermogenese bezeichneten Prozess abzubauen.¹²¹ Braune Fettzellen kommen in zwei Varianten vor, d. h. entweder in den klassischen braunen Fettdepots oder verteilt in den weißen Fettdepots. Im weißen Fettdepot reifen die braunen Fettzellen durch Transdifferenzierung aus weißen Fettzellen, die als Reaktion auf Kältereize rekrutiert werden.¹²⁰ Aufgrund ihrer verstreuten anatomischen Lage wird diese letztere Art von braunen Adipozyten auch als beige oder brite (braun-weiß) Fettzellen bezeichnet. Die subkutane Adipositas ist mit einem günstigeren Stoffwechselprofil verbunden als die viszerale Adipositas. Fettleibigkeit und dysfunktionales Fettgewebe sind maßgeblich an der Entwicklung des metabolischen Syndroms beteiligt. Interessanterweise verursachte die Induktion eines ubiquitären *Wt1* Knockouts in adulten Mäusen innerhalb von ungefähr acht Tagen eine signifikante Abnahme sowohl der abdominalen weißen als auch der interscapularen braunen Fettdepots.¹¹³ Weiterhin wurde bei diesen Tieren eine geringe Reduktion des Vorläuferpools in einigen viszeralen Fettpolstern festgestellt.³⁹ Mäuse mit induzierten generalisiertem *Wt1* Knockout versterben innerhalb von 10-14 Tagen an einem Multiorganversagen. In der nachfolgenden Arbeit wurde die Hypothese untersucht, dass das WT1 ein thermogenes Programm in weißen Fettzellen unterdrückt.

Kirschner KM, Foryst-Ludwig A, Gohlke S, Li C, Flores RE, Kintscher U, Schupp M, Schulz TJ, Scholz H. **Wt1 haploinsufficiency induces browning of epididymal fat and alleviates metabolic dysfunction in mice on high-fat diet.** Diabetologia. 2022 Mar;65(3):528-540.

<https://doi.org/10.1007/s00125-021-05621-1>

Der nachfolgende Text entspricht der übersetzten Zusammenfassung dieser Arbeit:

„Ziele/Hypothese

Trotz einer ähnlichen Fettspeicherfunktion ist viszerales (intraabdominales) weißes Fettgewebe (WAT) schädlich, während subkutanes WAT als Schutz vor Stoffwechselerkrankungen gilt. Neuere Erkenntnisse deuten darauf hin, dass thermogene Gene, die im braunen Fettgewebe (BAT) exprimiert werden, vor allem im subkutanen WAT induziert werden können. Hier untersuchen wir die Hypothese, dass das Produkt des Wilms-Tumor-Gens (WT1), das im intraabdominalen WAT, nicht aber im

subkutanen WAT und BAT exprimiert wird, ein thermogenes Programm in weißen Fettzellen unterdrückt.

Methoden

Heterozygote *Wt1* Knockout-Mäuse und ihre Wildtyp-Wurfgeschwister wurden im Hinblick auf die thermogene und adipozytenselektive Genexpression untersucht. Die Glukosetoleranz und die hepatische Lipidakkumulation wurden bei diesen Mäusen unter normalen Futter- und fettreichen Diätbedingungen untersucht. Aus der stromalen vaskulären Fraktion der BAT isolierte Präadipozyten wurden mit einem *Wt1* exprimierenden Retrovirus transduziert, zur Differenzierung veranlasst und auf die Expression von thermogenen und adipozytenselektiven Genen untersucht.

Ergebnisse

Die Expression der thermogenen Gene *Cpt1b* und *Tmem26* war erhöht, und die Transkription von *Ucp1* war im epididymalen WAT von heterozygoten *Wt1* Knockout-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp Mäusen im Durchschnitt um mehr als das Zehnfache erhöht. *Wt1* Heterozygotie reduzierte die epididymale WAT-Masse, verbesserte die Ganzkörper-Glukosetoleranz und milderte die schwere Lebersteatose bei diätetisch induzierter Fettleibigkeit bei Mäusen. Die retrovirale Expression von WT1 in braunen Präadipozyten, denen endogenes WT1 fehlt, reduzierte die mRNA-Spiegel von *Ucp1*, *Ppargc1a*, *Cidea*, *Prdm16* und *Cpt1b* bei der in-vitro-Differenzierung um 60-90 %. Die Ausschaltung von WT1 in epididymalen Präadipozyten senkte die Transkripte von *Aldh1a1* und *Zfp423*, zwei wichtigen Suppressoren des thermogenen Programms, erheblich. Umgekehrt wurden die mRNA-Spiegel von *Aldh1a1* und *Zfp423* durch die retrovirale Expression von WT1 in braunen Präadipozyten um das Fünffache bzw. Dreifache erhöht.

Schlussfolgerung/Interpretation

WT1 fungiert als Bestimmungsfaktor für weiße Adipozyten in epididymalem WAT, indem es thermogene Gene unterdrückt. Die Verringerung der *Wt1* Expression in diesem und anderen intraabdominalen Fettdepots könnte eine neue Behandlungsstrategie für Stoffwechselerkrankungen darstellen.“ (Übersetzung durch die Autorin)

3.3 Die Transkriptionsregulierung durch das Wilms-Tumorprotein WT1 deutet auf eine Rolle der Metalloproteinase ADAMTS16 bei der Entwicklung des Urogenitalsystems der Maus hin.

WT1 reguliert mehrere Schritte der Gonadenentwicklung. Fehlt bei Mäusen die WT1 Expression, dann wird die Gonadenbildung, sowohl bei Männchen als auch bei Weibchen, zwar eingeleitet, jedoch degeneriert das Gewebe aufgrund von Apoptose. Dieses führt zu einer Gonaden-Agenesie.⁶⁵ Der geschlechtsbestimmende Faktor SRY und der Anti-Müller-Hormonrezeptor 2, der für die Rückbildung der weiblichen Urogenitalgänge entscheidend ist, gehören zu den Genen, die durch WT1 reguliert werden.^{85, 88, 89} Übereinstimmend wurden bei XY-Patienten mit heterozygoten *WT1*-Keimbahnmutationen eine männlich zu weiblicher Geschlechtsumwandlung oder Anomalien des Genitaltrakts beobachtet.³⁷ Eigene Arbeiten konnten bisher dazu beitragen, zu verstehen, über welche Zielgene WT1 die Entwicklung der Gonade reguliert.^{122, 123} In der nachfolgenden Arbeit wurde die Hypothese untersucht, dass WT1 ein direkter transkriptioneller Aktivator des *Adamts16* Gens ist und wie sich diese Aktivierung auf die Entwicklung der Gonade auswirkt.

Jacobi CL, Rudigier LJ, Scholz H, Kirschner KM.

Transcriptional regulation by the Wilms tumor protein, Wt1, suggests a role of the metalloproteinase Adamts16 in murine genitourinary development. J Biol Chem. 2013 Jun 28;288(26):18811-24.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M113.464644>

Der nachfolgende Text entspricht der übersetzten Zusammenfassung dieser Arbeit:

„ADAMTS16 (eine Desintegrin- und Metalloproteinase mit Thrombospondin-Motiven) ist eine sezernierte Säugetier-Metalloproteinase mit unbekannter Funktion. Wir berichten, dass *Adamts16* in der Maus zusammen mit dem Wilms-Tumorprotein WT1 in den sich entwickelnden Glomeruli der embryonalen Niere exprimiert wird. Die *Adamts16* mRNA-Konzentration wurde durch die Transfektion embryonaler Mäusenieren-Explantate mit *Wt1* Antisense-Vivo-Morpholinos deutlich reduziert. Der Antisense-Knockdown von ADAMTS16 hemmte die Verzweigungsmorphogenese in Nierenorgan-Kulturen. ADAMTS16 wurde durch in situ mRNA-Hybridisierung und/oder Immunhistochemie auch in embryonalen Gonaden sowie in Spermatozyten und Granulosazellen adulter Hoden und Eierstöcke nachgewiesen. Die Ablation von WT1 durch Transfektion mit Antisense-vivo-Morpholinos erhöhte die *Adamts16* mRNA in kultivierten embryonalen XY-Gonaden (11,5 und 12,5 Tage nach der Empfängnis) signifikant und reduzierte die *Adamts16* Transkripte in XX-Gonaden (12,5 und 13,5 Tage nach der Empfängnis). Drei vorhergesagte WT1 Konsensmotive konnten im Promotor und in der 5'-untranslatierten Region des murinen *Adamts16* Gens identifiziert werden. Die Bindung des WT1-Proteins an diese Elemente wurde durch EMSA und CHIP überprüft. Ein Glühwürmchen-Luciferase-Reportergen unter Kontrolle des *ADAMTS16* Promotors wurde durch transiente Co-Transfektion menschlicher Granulosazellen mit einem WT1-Expressionskonstrukt rund 8-fach aktiviert. Eine

schrittweise Verkürzung der 5'-flankierenden Sequenz reduzierte sukzessive die Aktivierung des *ADAMTS16* Promotors durch WT1 und hob sie schließlich auf. Diese Ergebnisse zeigen, dass WT1 das *ADAMTS16* Gen in XX- und XY-embryonalen Keimdrüsen unterschiedlich reguliert. Es wird vermutet, dass *ADAMTS16* während der urogenitalen Entwicklung der Maus unmittelbar WT1 nachgeschaltet wirkt. Wir vermuten, dass *ADAMTS16* an der Verzweigungsmorphogenese der Nieren bei Mäusen beteiligt ist.“ (Übersetzung durch die Autorin)

3.4 Die kupferhaltige Aminoxidase 1 (AOC1) ist ein nachgeschaltetes Zielgen des Wilms-Tumorproteins WT1 während der Nierenentwicklung.

WT1 wird in der Embryonalentwicklung zunächst im kondensierenden Mesenchym der metanephrischen Niereanlage exprimiert. Es ist notwendig dafür, dass das Mesenchym die Harnleiterknospe zum weiteren Verzweigen anregt. In Abwesenheit von WT1 werden die Zellen der metanephrischen Nierenanlage apoptotisch, die Harnleiterknospe verzweigt sich nicht weiter in das umgebende Mesenchym, und die Epithelialisierung findet nicht statt.⁶⁵ In-vitro-Organokulturexperimenten konnten nachweisen, dass WT1 nicht nur für die frühen induktiven Ereignisse, sondern auch für die späteren Phasen der Nierenbildung, d.h. der Differenzierung und Reifung von Nephronen notwendig ist.⁶⁸ In eigenen Arbeiten konnte beschrieben werden, über welche Zielgene WT1 auf die Nierenentwicklung Einfluss nimmt.^{63, 124-128} In der nachfolgenden Arbeit wurde untersucht, ob WT1 über die Regulation des Polyaminsystems Einfluss auf die Nierenentwicklung nimmt.

Kirschner KM, Braun JF, Jacobi CL, Rudigier LJ, Persson AB, Scholz H.

Amine oxidase copper-containing 1 (AOC1) is a downstream target gene of the Wilms tumor protein, WT1, during kidney development. J Biol Chem. 2014 Aug 29;289(35):24452-62.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M114.564336>

Der nachfolgende Text entspricht der übersetzten Zusammenfassung dieser Arbeit:

„Die kupferhaltige Aminoxidase 1 (AOC1; früher bekannt als Amilorid-bindendes Protein 1) ist ein sekretiertes Glykoprotein, das den Abbau von Putrescin und Histamin katalysiert. Polyamine und ihr Diaminvorläufer Putrescin sind in allen Organismen allgegenwärtig und erfüllen zentrale Funktionen bei Zellwachstum und -vermehrung. Trotz der Bedeutung von AOC1 bei der Regulierung des Polyaminabbaus ist nur sehr wenig über die molekularen Mechanismen bekannt, die seine Expression steuern. Wir berichten hier, dass das Wilms-Tumorprotein WT1, das für eine normale Nierenentwicklung notwendig ist, die Transkription des *AOC1* Gens aktiviert. Die Expression eines Glühwürmchen-Luciferase-Reporters unter Kontrolle des proximalen *AOC1* Promotors wurde durch die Co-Transfektion eines WT1 Expressionskonstrukts deutlich verstärkt. Die Bindung des WT1 Proteins an ein cis-regulatorisches Element im *AOC1* Promotor wurde durch einen elektrophoretischen Mobilitätsverschiebungstest und eine Chromatin-Immunpräzipitation bestätigt. Die Antisense-Hemmung der Translation des WT1 Proteins reduzierte die *Aoc1* Transkripte in kultivierten embryonalen Nieren und Gonaden von Mäusen stark. Die *Aoc1* mRNA-Spiegel korrelierten in mehreren Zelllinien mit dem WT1 Protein. Eine doppelte Immunfluoreszenzfärbung zeigte eine Koexpression von WT1 und AOC1 Proteinen im sich entwickelnden Urogenitalsystem von Mäusen und Ratten. Auffallend ist, dass die induzierten Veränderungen in der Polyamin-Homöostase die

Verzweigungsmorphogenese kultivierter embryonaler Mäusenieren in einer entwicklungsstadienspezifischen Weise beeinflussen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die WT1-abhängige Kontrolle des Polyaminabbaus, die durch Veränderungen der AOC1 Expression vermittelt wird, eine Rolle bei der Nierenorganogenese spielt.“ (Übersetzung durch die Autorin)

3.5 Auffallend konservierte Veränderungen der Genexpression von polyaminregulierenden Enzymen bei verschiedenen Formen von akuter und chronischer Nierenschädigung.

Die Rolle des Putrescin degradierenden Enzyms AOC1 in der adulten Niere wurde mit der nachfolgenden Arbeit weiterverfolgt. Hier wurde untersucht, welche Rolle das Polyaminsystem und speziell das AOC1 in der Nierenschädigung spielt.

Sieckmann T, Schley G, Ögel N, Kelterborn S, Boivin FJ, Fähling M, Ashraf MI, Reichelt M, Vigolo E, Hartner A, Lichtenberger FB, Breiderhoff T, Knauf F, Rosenberger C, Aigner F, Schmidt-Ott KM, Scholz H, and Kirschner KM.

Strikingly conserved gene expression changes of polyamine regulating enzymes among various forms of acute and chronic kidney injury. *Kidney Int.* 2023 Apr 28;S0085-2538(23)00310-1.

<https://doi.org/10.1016/j.kint.2023.04.005>

Der nachfolgende Text entspricht der übersetzten Zusammenfassung dieser Arbeit:

„Die Polyamine Spermidin und Spermin und ihr gemeinsames Vorläufermolekül Putrescin sind an der Verletzung und Reparatur von Gewebe beteiligt. Hier testen wir die Hypothese, dass eine gestörte Polyamin-Homöostase zu verschiedenen Nierenpathologien bei Mäusen im Rahmen experimenteller Modelle für Ischämie-Reperfusion, Transplantation, Rhabdomyolyse, Cyclosporin-Behandlung, arterielle Hypertonie, Diabetes, einseitige Harnleiterobstruktion, Fütterung mit hohem Oxalatgehalt und Adenin-induzierte Verletzungen beiträgt. Wir fanden ein bemerkenswert ähnliches Muster bei den meisten Nierenpathologien mit einer verringerten Expression von Enzymen, die an der Polyaminsynthese beteiligt sind, zusammen mit einer erhöhten Expression von Polyamin-abbauenden Enzymen. Die Expression der kupferhaltigen Aminoxidase 1 (*Aoc1*), ein Enzym, das den Abbau von Putrescin katalysiert, war in gesunden Nieren durch *in situ* mRNA-Hybridisierung kaum nachweisbar. Bei verschiedenen experimentellen Nierenschädigungen wurde *Aoc1* in hohem Maße exprimiert, was zu einer erheblichen Verringerung des Putrescin-Gehalts der Niere führte. Der Gehalt an Spermin in der Niere war ebenfalls deutlich reduziert, während Spermidin als Reaktion auf eine Ischämie-Reperfusionsschädigung erhöht war. Die erhöhte *Aoc1* Expression in geschädigten Nieren war hauptsächlich auf eine *Aoc1* Isoform zurückzuführen, die 22 zusätzliche Aminosäuren an ihrem N-Terminus aufweist und eine erhöhte Sekretion zeigt. Mäuse mit Keimbahndeletion von *Aoc1* und geschädigten Nieren zeigten keine Abnahme des Putrescin-Gehalts der Nieren. Obwohl sie keinen offensichtlichen Phänotyp aufwiesen, hatten sie weniger tubuläre Ablagerungen nach Ischämie-Reperfusionsschädigung. Hyperosmotischer Stress stimulierte die AOC1 Expression auf der Transkriptions- und Posttranskriptionsebene in metanephrischen Explantaten und Nierenzelllinien. Die AOC1-Expression war auch nach einer Nierentransplantation beim Menschen deutlich erhöht. Diese

Daten zeigen, dass die Nieren auf verschiedene Formen von Verletzungen mit einer Herunterregulierung der Polyaminsynthese und einer Aktivierung des Polyaminabbaus reagieren. Ein Ungleichgewicht bei den Nierenpolyaminen kann somit zu verschiedenen Ursachen von Nierenschäden beitragen.“ (Übersetzung durch die Autorin)

4. Diskussion

4.1 Der Erythropoetin-Rezeptor als WT1 Zielgen

Durch die in Abschnitt 3.1 gezeigte Studie¹²⁹ konnte die Rolle von WT1 in der Hämatopoese tiefergreifender verstanden werden. Diese Studie beschreibt WT1 als neuartigen Transkriptionsaktivator des *EpoR* Gens.¹²⁹ Sie komplementiert eine meiner vorausgegangenen Untersuchungen, die zeigt, dass WT1 auch für die normale Expression von Erythropoetin in der fötalen Leber der Maus erforderlich ist.¹¹⁷ Somit wirkt WT1 synergistisch auf die Erythropoese, indem es die Expression des Erythropoetin Rezeptors in hämatopoetischen Vorläuferzellen aktiviert und die Erythropoietinexpression stimuliert. Frühere Arbeiten zeigten bereits, dass WT1 unterschiedliche Auswirkungen auf die linienspezifische Differenzierung von hämatopoetischen Vorläuferzellen haben kann.^{94,97} Eine wichtige neue Erkenntnis dieser hier vorgestellten Studie ist, dass die reduzierte Proliferation von rhEpo behandelten hämatopoetischen Vorläuferzellen aus homozygoten *Wt1* Knockout-Mäusen mit einer geringeren Expressionsrate des *EpoR* verbunden ist.¹²⁹ Fetale Leberzellen aus homozygoten *Wt1* Knockout-Mäusen hatten ein signifikant geringeres Potenzial zur Koloniebildung unter rhEpo Behandlung. Zudem wiesen sie auch eine geringere Anzahl von Hämoglobin-positiven Zellen auf als Leberzellen, die aus heterozygoten *Wt1* Knockout-Mäusen und Wildtypmäusen isoliert wurden.¹²⁹

Es konnte gezeigt werden, dass es auch bei kompletter Abwesenheit von WT1 noch eine basale *EpoR* Expression gibt. Die *EpoR* Transkripte sind jedoch in hämatopoetischen Vorläuferzellen von homozygoten WT1 Knockout-Mäusen um etwa 40% reduziert.¹²⁹ Dementsprechend entwickeln Mäuseembryonen mit gezielter Inaktivierung des *Wt1* Gens weniger schwere Defekte im hämatopoetischen System als Mäuse mit homozygotem Knockout des *EpoR*.¹³⁰⁻¹³² Die Transkriptionskontrolle der *EpoR* Expression zeigt eine funktionelle Redundanz, andere Transkriptionsfaktoren können das Fehlen von WT1 in einem gewissen Umfang kompensieren. Dieses ist nicht verwunderlich, da mit SP1 und GATA1, bereits zwei weitere Transkriptionsaktivatoren des *EpoR* Gens beschrieben wurden.¹³³⁻¹³⁵ Eine Überprüfung der Expression dieser beiden Transkriptionsfaktoren in CD117⁺ Zellen isoliert aus WT1 homozygoten, heterozygoten Knockout- und Wildtypmäusen zeigte keine Veränderung.¹²⁹

Die Ergebnisse, die in Abschnitt 3.1 vorgestellt wurden,¹²⁹ zeigen in Kombination mit anderen Studien^{136,137}, dass eine gestörte Hämatopoese mit einer erhöhten WT1-Expression verbunden ist. Dies deutet darauf hin, dass eine ausgeglichene WT1-Konzentration für die normale Differenzierung von erythroiden Vorläuferzellen unentbehrlich ist. Eine solche dosisabhängige Wirkung ist auch für andere an der Hämatopoese beteiligte Transkriptionsfaktoren bekannt, so z.B. für GATA3.^{138,139} Mit dem *EpoR* Gen wurde zum ersten Mal ein Mitglied aus der Superfamilie der hämatopoetischen Zytokinrezeptoren als transkriptionales Ziel von WT1 beschrieben. Diese Aktivierung des *EpoR* Gens durch WT1 könnte

ein wichtiger Mechanismus in der normalen Hämatopoese der Maus sein. Darüber hinaus könnten jedoch auch weitere WT1 regulierte Gene zu der verringerten Erythropoetin vermittelten Proliferation von *Wt1* defizienten hämatopoetischen Vorläuferzellen beitragen. Genomweite Expressionsanalysen und WT1 Chromatin Bindungsstudien können hier weitere Erkenntnisse liefern.

4.2 WT1 unterdrückt die braune Differenzierung der Adipozyten

Die unter Abschnitt 3.2 dargestellte Studie¹⁴⁰ zeigt, dass die Haploinsuffizienz von *Wt1* ein genetisches Programm für braune Adipozyten im epididymalen weißem Fettgewebe von Mäusen aktiviert. Damit zeigt sie eine bisher unbekannt Funktion für das WT1 auf. Die Daten aus der Veröffentlichung unter Abschnitt 3.2¹⁴⁰ deuten darauf hin, dass WT1 ein direkter oder indirekter Repressor der braunen Differenzierung des weißen Fettgewebes ist. Das viszerale Fettgewebe von Mäusen, zu dem auch das epididymale weiße Fettgewebe gehört, ist normalerweise weniger empfänglich für die braune Differenzierung als das subkutane weiße Fettgewebe.^{141, 142} In der Studie unter Abschnitt 3.2¹⁴⁰ wurde *in vivo* gezeigt, dass die Aktivierung thermogener Gene im epididymalen weißen Fettgewebe mit der verringerten WT1 Expression in heterozygoten *Wt1* Knockout-Mäusen einhergeht. Durch eine Stimulation der β 3-adrenergen Rezeptoren wurden diese Unterschiede in der Expression von wärmeregulierenden Genen zwischen Wildtyp- und heterozygoten *Wt1* Knockout-Mäusen beseitigt.¹⁴⁰ Dies deutet darauf hin, dass die repressive Aktivität von WT1 auf die braune Differenzierung des weißen Fettgewebes durch die Wirkung eines starken β 3-adrenergen Stimulus aufgehoben werden kann. Diese Daten lassen den Schluss zu, dass WT1 die allgemeine Kapazität zur braunen Differenzierung des epididymalen weißen Fettgewebes nicht einschränkt. Es sieht vielmehr so aus, dass WT1 zur Aufrechterhaltung der weißen Ausdifferenzierung unter unbelasteten Bedingungen, d.h. in Abwesenheit eines starken Bräunungsauslösers, beiträgt. Dieses wird auch durch den Befund bestärkt, dass WT1 die Expression von *Aldh1a1* und *Zfp423* in epididymalen Präadipozyten stimuliert.¹⁴⁰ Aus frühere Studien ist bereits bekannt, dass die Deletion von *Aldh1a1* und *Zfp423* die Expression von thermogene Genen in viszeralen Fettdepots induziert.¹⁴³⁻¹⁴⁵ Zudem konnten in einer genomweiten ChIP-Sequenzierungsanalyse in embryonalen Nieren der Maus regulatorische Sequenzen des *Zfp423* Gens gefunden werden, die durch WT1 gebunden sind.¹⁴⁶ Diese Befunde deuten auf eine direkte Interaktion zwischen WT1 und dem *Zfp423* Gen hin. Diese Ergebnisse legen somit nahe, dass WT1 die braune Differenzierung der Adipozyten unterdrückt. Die Konsequenzen, die sich hieraus im epididymalen Fett von heterozygoten *Wt1* Knockout-Mäusen ergeben, wurden in der unter Abschnitt 3.2 angegebenen Studie weiter untersucht.¹⁴⁰ Hier zeigte sich, dass Mäuse mit einem heterozygoten *Wt1* Gen eine verbesserte Glukosetoleranz und eine weniger starke Ausprägung der diätbedingten Fettleber aufweisen. Die verbesserte Glukosetoleranz steht im Einklang mit dem

höheren Grundumsatz, der für diese heterozygoten *Wt1* Mäuse gezeigt wurde.¹⁴⁰ Es ist bekannt, dass die Aktivierung der klassischen braunen Fettdepots und die braune Differenzierung der weißen Fettdepots mit einem günstigen Stoffwechselstatus verbunden sind.¹⁴⁷⁻¹⁵⁰ Diese lässt den Schluss zu, dass die braune Differenzierung des epididymalen weißen Fetts zur Verringerung der ernährungsbedingten Lebersteatose und zur Erhöhung der Glukosetoleranz bei Mäusen mit nur einem intakten *Wt1* Allel beiträgt. Somit könnte sich WT1 als ein potenzielles therapeutisches Ziel bei Stoffwechselstörungen darstellen.

4.3 WT1 im Urogenitalsystem während der Embryonalentwicklung

ADAMTS16 ist eine Metalloproteinase die in Säugetieren vorkommt. Bisher war ihre Funktion weitgehend unbekannt. Die in Abschnitt 3.3¹²⁷ gezeigte Arbeit zeigt, dass die Transkription von *Adamts16* durch den Transkriptionsfaktor WT1 reguliert wird. Um ein genaueres Bild über die Auswirkungen dieser Regulation zu bekommen, wurde daher weiterführend auch die Funktion des ADAMTS16 in der Nieren- und Gonadenentwicklung untersucht.¹²⁷ Metalloproteinasen spielen eine wichtige Rolle in der Modulation der mesenchymal-epithelialen Interaktion in der embryonalen Niere und anderen Geweben.¹⁵¹⁻¹⁵⁴ Die Expression von mehreren Matrix-Metalloproteinasen und ihrer Inhibitoren (MMP-2, MT1-MMP und TIMP-2) wird in der sich entwickelnden Niere räumlich und zeitlich sehr streng reguliert.¹⁵⁵ Die Ergebnisse der in Abschnitt 3.3 gezeigte Arbeit¹²⁷ konnten in kultivierten embryonalen Mäusenieren zeigen, dass eine reduzierte ADAMTS16 Expression die Verzweigungsmorphogenese erheblich beeinträchtigt. Dieses sind erste Hinweise, dass ADAMTS16 an der Nephrogenese beteiligt ist. Wie *Adamts16* hier wirkt, konnte bisher nicht geklärt werden. Die Transkriptionskontrolle von *Adamts16* durch WT1 könnte bei verschiedenen biologischen Prozessen im embryonalen und adulten Organismus eine Rolle spielen. Die Ablation von WT1 in kultivierten embryonalen Nieren reduzierte die *Adamts16* Expression signifikant.¹²⁷ Die Nierenbildung bei Säugetieren hängt von der wechselseitigen Interaktion zwischen dem metanephrischen Mesenchym und der einsprossenden, sich verzweigenden Harnleiterknospe ab.⁶⁶ WT1 fördert den Übergang von Mesenchym zu Epithel in den frühen Stadien der Nierenentwicklung.^{65, 156} Interessant wäre eine weitergehende Analyse ob ADAMTS16 in der epithelialen zur mesenchymalen Differenzierung eine Rolle spielt. Es gibt erste Hinweise, dass ADAMTS16 nicht nur im embryonalen, sondern auch im adulten Organismus eine Rolle spielt. Der Knockout des *Adamts16* Gens bei Salz-sensitiven Dahl-Ratten führte zu einer Aufspaltung und Verdickung der glomerulären Kapillaren. Weiterhin konnte eine deutlichen Senkung des arteriellen Blutdrucks beobachtet werden.¹⁵⁷

Die Regulation des *Adamts16* Gen durch den Transkriptionsfaktors WT1 spielt nicht nur eine Rolle bei der Nierenentwicklung, sondern konnte auch in der Entwicklung der Gonaden beobachtet werden. Die Ergebnisse der in Abschnitt 3.3 gezeigte Arbeit¹²⁷ lassen erkennen, dass WT1 die *Adamts16* Expression

in den sich entwickelnden Gonaden zeitabhängig und geschlechtsspezifisch steuert. In kultivierten XY-Gonadenanlagen aus E11,5 und E12,5 Embryonen erhöht sich nach Ablation der WT1 Expression die *Adamts16* Expression signifikant. In XX-Gonaden ergibt sich ein gegensätzliches Bild. Hier konnte gezeigt werden, dass die Expression von *Adamts16* in XX-Gonadenanlagen zum Entwicklungszeitpunkt E12,5 und E13,5 durch WT1 Ablation signifikant reduziert wird.¹²⁷ Somit konnte gezeigt werden, dass WT1 die *Adamts16* Expression in XY-Gonaden während der frühen Entwicklungsstadien hemmt, und dass es die *Adamts16* Expression in XX-Gonadenanlagen zu späteren Entwicklungszeitpunkten stimuliert. Diese Erkenntnis steht im Einklang mit der Tatsache, dass beide Proteine nicht in den selben Zellen der XY-Gonade zusammen lokalisiert werden konnten. In der in Abschnitt 3.3 gezeigten Arbeit¹²⁷ konnte ein entwicklungsabhängiger Anstieg von *Adamts16* nachgewiesen werden. Die Stimulation der *Adamts16* Expression durch WT1 könnte hierzu beitragen. Die gegensätzliche Regulation der *Adamts16* Expression durch WT1 in XX- und XY- Gonaden ist nicht überraschend, sondern wurde schon für andere Zielgene des WT1 beschrieben. Hier wurde gezeigt, dass WT1 in unterschiedlichen Geweben ein Zielgen sowohl aktivieren als auch reprimieren kann.^{62, 63} Dieses könnte mit der physischen Interaktion von WT1 mit anderen Proteinen bei der Kontrolle der Gentranskription zusammenhängen.¹⁵⁸ Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass die Transkription des *Adamts16* durch das WT1 geschlechts- und gewebespezifisch reguliert wird. Welche Auswirkungen diese regulatorische Verbindung für die Gonaden Entwicklung hat, muss in weiterführenden Studien geklärt werden.

4.4 Die Rolle des durch WT1 regulierten Enzyms AOC1 in der Nierenentwicklung und der Nierenschädigung

Die Niere von Säugetieren entwickelt sich durch Verzweigung des Ureters im Mesenchym und der Ausdifferenzierung der tubulären Strukturen. In-vitro-Experimente an Organkulturen haben gezeigt, dass WT1 für die frühen induktiven Prozesse, wie der Verzweigung des Ureters essentiell ist.^{68, 159} In der unter Abschnitt 3.4 gezeigten Studie¹⁶⁰ konnte eine signifikante Verringerung der Anzahl der Ureterverzweigungen nach WT1 Knockdown nicht nur in sehr frühen Stadien der Nierenentwicklung, sondern auch zu späteren Entwicklungsstadien nachgewiesen werden. Dieser Einfluss von WT1 auf die Ureterverzweigung wird durch seine Zielgene vermittelt. In der in Abschnitt 2.3 dargestellten Studie¹⁶⁰ konnte bereits ADAMTS16 als ein Zielgen von WT1 ermittelt werden, welches diese Funktion des WT1 in der Nierenentwicklung vermitteln könnte. Die Ergebnisse der unter 2.4 beschriebenen Studie¹⁶⁰ deuten darauf hin, dass die transkriptionelle Aktivierung des *Aoc1* Gens durch WT1 ebenfalls zur Morphogenese der Niere beitragen könnte. AOC1 ist eine Aminoxidase, die das Diamin Putrescin abbaut. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass das *Aoc1* Gen direkt durch WT1 aktiviert wird.¹⁶⁰ Die Auswirkungen dieser Regulation auf die Nierenentwicklung wurden an embryonalen

Nierenkulturen untersucht. Die Verabreichung von rekombinant hergestellten AOC1 reduzierte signifikant die Verzweigung der Harnleiterknospen in embryonalen Nierenexplantaten der Maus zum Entwicklungszeitpunkt E11,5.¹⁶⁰ Demgegenüber stimulierte die Hemmung der endogenem AOC1 Enzymaktivität mit Aminoguanidin die *in-vitro*-Nephrogenese zu diesem Entwicklungsstadium.¹⁶⁰ In Übereinstimmung mit dieser Beobachtung wurde bereits früher gezeigt, dass die Hemmung von ODC1, dem Putrescin synthetisierenden Enzym, die Zellproliferation und die Bildung von Ureterverzweigungen in Nierenexplantaten von Mäusen zum Entwicklungszeitpunkt E11,0 reduziert.¹⁶¹ Somit scheint eine Veränderung der Putrescinmenge einen Einfluss auf die Ureterverzweigung zu haben. Der genaue Mechanismus, wie Putrescin hier in die Nierenentwicklung eingreift, ist nicht bekannt. Eine Möglichkeit wäre, dass durch Polyamine wie das Putrescin die Kommunikation zwischen Mesenchym und Epithel beeinflusst wird. Zudem gibt es möglicherweise eine indirekte Wirkweise durch das AOC1, da beim Abbau von Putrescin durch AOC1 H₂O₂ entsteht. Dieses könnte durchaus in den embryonalen Nieren eine toxische Wirkung entfalten. Für diese Sichtweise spricht, dass die verminderte Verzweigung der Harnleiterknospen, als Reaktion auf externes AOC1, durch die gleichzeitige Verabreichung von Putrescin noch verstärkt wurde. Darüber hinaus verhinderte die Gabe von Vitamin C als Radikalfänger die hemmende Wirkung von AOC1 auf die Verzweigung des Ureters.¹⁶⁰ Da bereits bekannt ist, dass WT1 die Expression von ODC1, dem Schlüsselenzym für die Polyaminsynthese reguliert,¹⁶¹ wurde dieses in der unter Abschnitt 3.4 genannte Arbeit¹⁶⁰ überprüft. Es wurde eine signifikante Abnahme der *Odc1* Transkripte in Nierenorgan-Kulturen nach WT1 Knockdown beobachtet. Dieses könnte darauf hindeuten, dass WT1 die *Odc1* Expression in der sich entwickelnden Niere stimuliert. Diese Stimulation der beiden Gene in der embryonalen Niere durch WT1 wirkt in Anbetracht der antagonistischen Funktionen von ODC1 und AOC1 im Polyaminstoffwechsel die Frage nach der physiologischen Bedeutung auf. In diesem Zusammenhang ist zu bedenken, dass verschiedene Zellpopulationen in der embryonalen Niere während der aufeinanderfolgenden Differenzierungsphasen einen spezifischen und variablen Bedarf an Polyaminen aufweisen können. Es wurde gezeigt, dass die Zellen der Harnleiterknospe eine hohe Expression von *Odc1* aufweisen.¹⁶¹ Dieses deutet darauf hin, dass die Verzweigung des Harnleiters eine aktive Polyaminsynthese erfordert. Darüber hinaus ist zu beachten, dass Polyamine sezernierte Moleküle sind. Diese sezernierten Polyamine können von benachbarten Zellen über Membrantransporter aufgenommen werden.¹⁶² Die ins Mesenchym aussprossende Harnleiterknospe könnte Putrescin in den Extrazellulärraum abgeben und dieses könnte hemmend auf das Mesenchym wirken, was zu einer verminderten Nephroindifferenzierung führt. Diese Hypothese wurde in der in Abschnitt 3.4 gezeigten Studie¹⁶⁰ durch Zugabe von Putrescin zu embryonalen Nierenkulturen überprüft. Die Inkubation von embryonalen Nierenexplantaten der Maus in Gegenwart von Putrescin reduzierte die Ureterverzweigung zum Entwicklungszeitpunkt E13,5 signifikant. Die Stimulierung der

Aoc1 Expression durch WT1 könnte somit den Zweck erfüllen, den Polyamingehalt räumlich und zeitlich aufeinander abzustimmen. Diese Hypothese wird durch die gemeinsame Expression von WT1 und AOC1 Proteinen in den sich entwickelnden Glomeruli der embryonalen Nieren unterstützt. In der in Abschnitt 3.4 beschriebenen Arbeit¹⁶⁰ konnte somit gezeigt werden, dass die Regulation des Polyaminhaushalts durch WT1 ein wichtiger Mechanismus bei der Funktionsausübung des WT1 ist. Eine Herabregulierung von AOC1 aufgrund eines Knockdowns von WT1 dürfte das empfindliche Gleichgewicht zwischen wachstumsfördernden und differenzierungsfördernden Signalen stören.

In Anbetracht dieser Ergebnisse wurde die Rolle der AOC1-Expression und des Polyaminstoffwechsels in den Nieren von adulten Mäusen in der in Abschnitt 3.5 gezeigten Studie¹⁶³ genauer untersucht. Diese Studie zeigte eine verringerte Expression von Polyamin synthetisierenden Enzymen in Nierenschädigungen mit sehr heterogenen Ursachen. Eine verringerte ODC1-Expression und -Aktivität in Nieren nach ischämischen Reperfusionsschaden wurde bereits früher gezeigt.^{164, 165} Der Knockdown von *Odc1* verschlimmerte die Nierenschädigung.^{166, 167} Daher ist davon auszugehen, dass eine Verringerung der *Odc1* Expression die Schädigung der Niere eher fördert, als dass hierdurch Reparaturmechanismen aktiviert werden. Ein weiteres wichtiges Ergebnis der in Abschnitt 3.5 gezeigten Studie¹⁶³ ist die erhöhte Expression von Polyamin abbauenden Enzymen als Reaktion auf eine Nierenschädigung. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von *Aoc1* in gesunden Nieren der Maus kaum vorhanden ist. Nach verschiedenen Arten von Nierenschädigung steigt die Expression von *Aoc1* sehr stark an.¹⁶³ Die Lokalisation dieser *Aoc1* Expression liegt im Schädigungsmodell der ischämischen Reperfusion in den proximalen Tubuli und im Modell des nierenspezifischen *Cld10* Knockouts in der Medulla der Niere.¹⁶³ Hier ist interessant, dass die Schädigung der Niere bei ischämischer Reperfusion vor allem die proximalen Tubuli betrifft und im nierenspezifischen *Cld10* Knockouts die distalen Segmente des Nephrons. Die starke Korrelation zwischen der *Aoc1* Expression und der Expression von Markern der Nierenschädigung deutet darauf hin, dass die *Aoc1* Expression mit dem Schweregrad der Nierenschädigung korreliert. Die Plasmakonzentration von AOC1 kann bei Hepatitis-B-Leberversagen zur Vorhersage der Sterblichkeit verwendet werden.¹⁶⁸ Darüber hinaus wurden die kombinierten Plasmaspiegel von AOC1 und Citrullin als Diagnoseinstrument für akute mesenteriale Ischämie vorgeschlagen.¹⁶⁹ Daher wäre interessant, die Möglichkeit zu testen, die AOC1 auch als Marker für die Diagnose von ischämisch bedingten Nierenerkrankungen zu nutzen.

Die erhöhte Expression von *Sat1* in Nieren nach Rhabdomyolyse und von *SmoX* bei Hypertonie¹⁶³ steht im Einklang mit früheren Studien, die eine erhöhte Expression dieser Polyamin abbauenden Enzyme kurz nach ischämischer Reperfusionsschädigung und Endotoxin-induzierter Nierenschädigung (*Sat1*) zeigen.^{165, 170, 171} In der in Abschnitt 3.5 gezeigten Studie¹⁶³ konnten 21 Tage nach Ischämie in den Nieren verringerte Putrescin- und Sperminwerte und erhöhte Spermidinwerte festgestellt werden.

Diese Veränderungen könnten sich durch die Hochregulierung der *Aoc1* Expression und die Herunterregulierung von *Odc1* nach der Nierenschädigung erklären. Um die Funktion der AOC1 in der Nierenschädigung besser zu verstehen, wurde eine Mauslinie mit AOC1 Deletion etabliert. Der Knockout von *Aoc1* führte 21 Tage nach der Nierenschädigung zu einer vollständigen Wiederherstellung der Putrescinwerte.¹⁶³ Die intrarenalen Spermidin- und Sperminwerte veränderten sich jedoch nicht. Eine Untersuchung der Polyaminwerte im Blut ergab erhöhte Plasmaspiegel aller drei Polyamine 21 Tage nach ischämischer Nierenschädigung. Dies steht im Einklang mit den beobachteten erhöhten Putrescin-Plasmaspiegeln bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz.¹⁷² Erhöhte Serum-Polyaminspiegel könnten auf eine verminderte Ausscheidungsfunktion der Nieren zurückzuführen sein, die sich auch in einem Anstieg des Serumkreatinins zeigt. In der in Abschnitt 3.5 gezeigten Studie¹⁶³ wiesen adulte *Aoc1*-KO-Mäuse 21 Tage nach der ischämischen Nierenschädigung eine geringere Anzahl von Proteinablagerungen in den Nierentubuli auf. Dieses lässt auf eine geringere Ablösung von Tubulusepithelzellen als bei Wildtyp Mäusen schließen. Die Expression von *Lcn2* ist bei *Aoc1* KO-Mäusen nach ischämischer Nierenschädigung vermindert. Zudem wurde festgestellt, dass mehr ungespleißtes *Xbp1* in den Nieren der *Aoc1* KO-Mäuse vorliegt. Dieses ungespleißte *Xbp1* kann auf verringerten ER-Stress hindeuten.¹⁷³ Das mäßig verbesserte Erscheinungsbild der *Aoc1* KO-Mäuse nach ischämischer Nierenschädigung hängt möglicherweise mit den wiederhergestellten Putrescinwerten in der geschädigten Niere zusammen.

In der in Abschnitt 3.5 gezeigten Studie¹⁶³ konnte eine anhaltende Herabregulierung des Polyaminsystems im Mausmodell der ischämischen Nierenschädigung für mindestens 21 Tage beobachtet werden. In genomweiten Sequenzierdaten von menschlichen Nierentransplantaten zeigte sich diese Herabregulierung anhaltend über 12 Monate nach der Transplantation.^{163, 174} Dies könnte unterstreichen, dass die langfristigen Veränderungen im Polyaminsystem ein Teil des Übergangs von einer akuten zu einer chronischen Nierenschädigung sind. Eine noch offene Frage ist weiterhin, ob die veränderten Polyaminwerte die Ursache oder die Folge dieser Veränderungen sind. Die funktionellen Konsequenzen, die sich aus den beobachteten Expressionsveränderungen in Polyamin regulierenden Enzymen ergeben, und die Nutzbarkeit des Polyaminsystems als potenzielles Ziel für die Nierenprotektion müssen in zukünftigen Studien noch genauer untersucht werden.

5. Literaturangaben

1. Benitah, S.A. and M. Frye, *Stem cells in ectodermal development*. J Mol Med (Berl), 2012. **90**(7): p. 783-90.
2. Ferretti, E. and A.K. Hadjantonakis, *Mesoderm specification and diversification: from single cells to emergent tissues*. Curr Opin Cell Biol, 2019. **61**: p. 110-116.
3. Grapin-Botton, A. and D.A. Melton, *Endoderm development: from patterning to organogenesis*. Trends Genet, 2000. **16**(3): p. 124-30.
4. Jacobs, C.T. and P. Huang, *Complex crosstalk of Notch and Hedgehog signalling during the development of the central nervous system*. Cell Mol Life Sci, 2021. **78**(2): p. 635-644.
5. Kiecker, C., T. Bates, and E. Bell, *Molecular specification of germ layers in vertebrate embryos*. Cell Mol Life Sci, 2016. **73**(5): p. 923-47.
6. Solhaug, M.J., P.M. Bolger, and P.A. Jose, *The developing kidney and environmental toxins*. Pediatrics, 2004. **113**(4 Suppl): p. 1084-91.
7. Mole, R.H., *Irradiation of the embryo and fetus*. Br J Radiol, 1987. **60**(709): p. 17-31.
8. Silasi, M., et al., *Viral infections during pregnancy*. Am J Reprod Immunol, 2015. **73**(3): p. 199-213.
9. Rauscher, F.J., 3rd, et al., *Binding of the Wilms' tumor locus zinc finger protein to the EGR-1 consensus sequence*. Science, 1990. **250**(4985): p. 1259-62.
10. Drummond, I.A., et al., *DNA recognition by splicing variants of the Wilms' tumor suppressor, WT1*. Mol Cell Biol, 1994. **14**(6): p. 3800-9.
11. Nakagama, H., et al., *Sequence and structural requirements for high-affinity DNA binding by the WT1 gene product*. Mol Cell Biol, 1995. **15**(3): p. 1489-98.
12. Depping, R., et al., *Nuclear transport of Wilms' tumour protein Wt1 involves importins alpha and beta*. Cell Physiol Biochem, 2012. **29**(1-2): p. 223-32.
13. Ye, Y., et al., *Regulation of WT1 by phosphorylation: inhibition of DNA binding, alteration of transcriptional activity and cellular translocation*. EMBO J, 1996. **15**(20): p. 5606-15.
14. Englert, C., et al., *WT1 suppresses synthesis of the epidermal growth factor receptor and induces apoptosis*. EMBO J, 1995. **14**(19): p. 4662-75.
15. Lee, S.B., et al., *The Wilms tumor suppressor WT1 encodes a transcriptional activator of amphiregulin*. Cell, 1999. **98**(5): p. 663-73.
16. Wang, Z.Y., et al., *The Wilms' tumor gene product, WT1, represses transcription of the platelet-derived growth factor A-chain gene*. J Biol Chem, 1992. **267**(31): p. 21999-2002.
17. Drummond, I.A., et al., *Repression of the insulin-like growth factor II gene by the Wilms tumor suppressor WT1*. Science, 1992. **257**(5070): p. 674-8.
18. Rupprecht, H.D., et al., *The Wilms' tumor suppressor gene WT1 is negatively autoregulated*. J Biol Chem, 1994. **269**(8): p. 6198-206.
19. Ryan, G., et al., *Repression of Pax-2 by WT1 during normal kidney development*. Development, 1995. **121**(3): p. 867-75.
20. Kim, J., et al., *The Wilms' tumor suppressor gene (wt1) product regulates Dax-1 gene expression during gonadal differentiation*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(3): p. 2289-99.
21. Cook, D.M., et al., *Transcriptional activation of the syndecan-1 promoter by the Wilms' tumor protein WT1*. Oncogene, 1996. **13**(8): p. 1789-99.
22. Hosono, S., et al., *E-cadherin is a WT1 target gene*. J Biol Chem, 2000. **275**(15): p. 10943-53.
23. Englert, C., et al., *Induction of p21 by the Wilms' tumor suppressor gene WT1*. Cancer Res, 1997. **57**(8): p. 1429-34.
24. Haber, D.A., et al., *Alternative splicing and genomic structure of the Wilms tumor gene WT1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(21): p. 9618-22.
25. Gessler, M., et al., *Homozygous deletion in Wilms tumours of a zinc-finger gene identified by chromosome jumping*. Nature, 1990. **343**(6260): p. 774-8.
26. Bruening, W. and J. Pelletier, *A non-AUG translational initiation event generates novel WT1 isoforms*. J Biol Chem, 1996. **271**(15): p. 8646-54.

27. Scharnhorst, V., et al., *Internal translation initiation generates novel WT1 protein isoforms with distinct biological properties*. J Biol Chem, 1999. **274**(33): p. 23456-62.
28. Laity, J.H., H.J. Dyson, and P.E. Wright, *Molecular basis for modulation of biological function by alternate splicing of the Wilms' tumor suppressor protein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(22): p. 11932-5.
29. Kennedy, D., et al., *An RNA recognition motif in Wilms' tumour protein (WT1) revealed by structural modelling*. Nat Genet, 1996. **12**(3): p. 329-31.
30. Caricasole, A., et al., *RNA binding by the Wilms tumor suppressor zinc finger proteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(15): p. 7562-6.
31. Morrison, A.A., et al., *The Wilms tumour suppressor protein WT1 (+KTS isoform) binds alpha-actinin 1 mRNA via its zinc-finger domain*. Biochem Cell Biol, 2006. **84**(5): p. 789-98.
32. Hammes, A., et al., *Two splice variants of the Wilms' tumor 1 gene have distinct functions during sex determination and nephron formation*. Cell, 2001. **106**(3): p. 319-29.
33. Barbaux, S., et al., *Donor splice-site mutations in WT1 are responsible for Frasier syndrome*. Nat Genet, 1997. **17**(4): p. 467-70.
34. Scharnhorst, V., A.J. van der Eb, and A.G. Jochemsen, *WT1 proteins: functions in growth and differentiation*. Gene, 2001. **273**(2): p. 141-61.
35. Natoli, T.A., et al., *A mammal-specific exon of WT1 is not required for development or fertility*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(12): p. 4433-8.
36. Armstrong, J.F., et al., *The expression of the Wilms' tumour gene, WT1, in the developing mammalian embryo*. Mech Dev, 1993. **40**(1-2): p. 85-97.
37. Pelletier, J., et al., *Expression of the Wilms' tumor gene WT1 in the murine urogenital system*. Genes Dev, 1991. **5**(8): p. 1345-56.
38. Baird, P.N. and P.J. Simmons, *Expression of the Wilms' tumor gene (WT1) in normal hemopoiesis*. Exp Hematol, 1997. **25**(4): p. 312-20.
39. Chau, Y.Y., et al., *Visceral and subcutaneous fat have different origins and evidence supports a mesothelial source*. Nat Cell Biol, 2014. **16**(4): p. 367-75.
40. Cohen, P., et al., *Ablation of PRDM16 and beige adipose causes metabolic dysfunction and a subcutaneous to visceral fat switch*. Cell, 2014. **156**(1-2): p. 304-16.
41. Wagner, K.D., et al., *Oxygen-regulated expression of the Wilms' tumor suppressor Wt1 involves hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1)*. FASEB J, 2003. **17**(10): p. 1364-6.
42. Krueger, K., et al., *Deletion of an intronic HIF-2alpha binding site suppresses hypoxia-induced WT1 expression*. Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech, 2019. **1862**(1): p. 71-83.
43. Hastie, N.D., *Wilms' tumour 1 (WT1) in development, homeostasis and disease*. Development, 2017. **144**(16): p. 2862-2872.
44. Burwell, E.A., et al., *Isoforms of Wilms' tumor suppressor gene (WT1) have distinct effects on mammary epithelial cells*. Oncogene, 2007. **26**(23): p. 3423-30.
45. Moore, A.W., et al., *YAC complementation shows a requirement for Wt1 in the development of epicardium, adrenal gland and throughout nephrogenesis*. Development, 1999. **126**(9): p. 1845-57.
46. Martinez-Estrada, O.M., et al., *Wt1 is required for cardiovascular progenitor cell formation through transcriptional control of Snail and E-cadherin*. Nat Genet, 2010. **42**(1): p. 89-93.
47. Beckwith, J.B., *Nephrogenic rests and the pathogenesis of Wilms tumor: developmental and clinical considerations*. Am J Med Genet, 1998. **79**(4): p. 268-73.
48. Klamt, B., et al., *Frasier syndrome is caused by defective alternative splicing of WT1 leading to an altered ratio of WT1 +/-KTS splice isoforms*. Hum Mol Genet, 1998. **7**(4): p. 709-14.
49. Hastie, N.D., *The genetics of Wilms' tumor--a case of disrupted development*. Annu Rev Genet, 1994. **28**: p. 523-58.
50. Park, S., et al., *Inactivation of WT1 in nephrogenic rests, genetic precursors to Wilms' tumour*. Nat Genet, 1993. **5**(4): p. 363-7.
51. Hastie, N.D., *Dominant negative mutations in the Wilms tumour (WT1) gene cause Denys-Drash syndrome--proof that a tumour-suppressor gene plays a crucial role in normal genitourinary development*. Hum Mol Genet, 1992. **1**(5): p. 293-5.

52. Saylam, K. and P. Simon, *WT1 gene mutation responsible for male sex reversal and renal failure: the Frasier syndrome*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2003. **110**(1): p. 111-3.
53. Pritchard-Jones, K., et al., *The candidate Wilms' tumour gene is involved in genitourinary development*. Nature, 1990. **346**(6280): p. 194-7.
54. Oji, Y., et al., *Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in de novo lung cancers*. Int J Cancer, 2002. **100**(3): p. 297-303.
55. Koesters, R., et al., *WT1 is a tumor-associated antigen in colon cancer that can be recognized by in vitro stimulated cytotoxic T cells*. Int J Cancer, 2004. **109**(3): p. 385-92.
56. Oji, Y., et al., *Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in primary thyroid cancer*. Cancer Sci, 2003. **94**(7): p. 606-11.
57. Loeb, D.M., et al., *Wilms' tumor suppressor gene (WT1) is expressed in primary breast tumors despite tumor-specific promoter methylation*. Cancer Res, 2001. **61**(3): p. 921-5.
58. Oji, Y., et al., *Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in head and neck squamous cell carcinoma*. Cancer Sci, 2003. **94**(6): p. 523-9.
59. Ueda, T., et al., *Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in human bone and soft-tissue sarcomas*. Cancer Sci, 2003. **94**(3): p. 271-6.
60. Messen, H.D., et al., *Presence of Wilms' tumor gene (wt1) transcripts and the WT1 nuclear protein in the majority of human acute leukemias*. Leukemia, 1995. **9**(6): p. 1060-7.
61. Yang, L., et al., *A tumor suppressor and oncogene: the WT1 story*. Leukemia, 2007. **21**(5): p. 868-76.
62. Essafi, A., et al., *A wt1-controlled chromatin switching mechanism underpins tissue-specific wnt4 activation and repression*. Dev Cell, 2011. **21**(3): p. 559-74.
63. Schmidt, V., et al., *WT1 regulates HOXB9 gene expression in a bidirectional way*. Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech, 2021. **1864**(11-12): p. 194764.
64. Oka, Y., et al., *Wilms tumor gene peptide-based immunotherapy for patients with overt leukemia from myelodysplastic syndrome (MDS) or MDS with myelofibrosis*. Int J Hematol, 2003. **78**(1): p. 56-61.
65. Kreidberg, J.A., et al., *WT-1 is required for early kidney development*. Cell, 1993. **74**(4): p. 679-91.
66. Michos, O., *Kidney development: from ureteric bud formation to branching morphogenesis*. Curr Opin Genet Dev, 2009. **19**(5): p. 484-90.
67. Kuure, S., R. Vuolteenaho, and S. Vainio, *Kidney morphogenesis: cellular and molecular regulation*. Mech Dev, 2000. **92**(1): p. 31-45.
68. Davies, J.A., et al., *Development of an siRNA-based method for repressing specific genes in renal organ culture and its use to show that the Wt1 tumour suppressor is required for nephron differentiation*. Hum Mol Genet, 2004. **13**(2): p. 235-46.
69. Buckler, A.J., et al., *Isolation, characterization, and expression of the murine Wilms' tumor gene (WT1) during kidney development*. Mol Cell Biol, 1991. **11**(3): p. 1707-12.
70. Mundlos, S., et al., *Nuclear localization of the protein encoded by the Wilms' tumor gene WT1 in embryonic and adult tissues*. Development, 1993. **119**(4): p. 1329-41.
71. Guo, J.K., et al., *WT1 is a key regulator of podocyte function: reduced expression levels cause crescentic glomerulonephritis and mesangial sclerosis*. Hum Mol Genet, 2002. **11**(6): p. 651-9.
72. White, J.T., et al., *Notch signaling, wt1 and foxc2 are key regulators of the podocyte gene regulatory network in Xenopus*. Development, 2010. **137**(11): p. 1863-73.
73. Huff, V., et al., *Evidence for WT1 as a Wilms tumor (WT) gene: intragenic germinal deletion in bilateral WT*. Am J Hum Genet, 1991. **48**(5): p. 997-1003.
74. Iijima, K., et al., *Focal segmental glomerulosclerosis in patients with complete deletion of one WT1 allele*. Pediatrics, 2012. **129**(6): p. e1621-5.
75. Ito, S., et al., *Nephrotic syndrome and end-stage renal disease with WT1 mutation detected at 3 years*. Pediatr Nephrol, 1999. **13**(9): p. 790-1.
76. Swain, A. and R. Lovell-Badge, *Mammalian sex determination: a molecular drama*. Genes Dev, 1999. **13**(7): p. 755-67.

77. Hacker, A., et al., *Expression of Sry, the mouse sex determining gene*. Development, 1995. **121**(6): p. 1603-14.
78. Sekido, R., et al., *SOX9 is up-regulated by the transient expression of SRY specifically in Sertoli cell precursors*. Dev Biol, 2004. **274**(2): p. 271-9.
79. Sekido, R. and R. Lovell-Badge, *Sex determination involves synergistic action of SRY and SF1 on a specific Sox9 enhancer*. Nature, 2008. **453**(7197): p. 930-4.
80. Chassot, A.A., et al., *Genetics of ovarian differentiation: Rspo1, a major player*. Sex Dev, 2008. **2**(4-5): p. 219-27.
81. Bernard, P. and V.R. Harley, *Wnt4 action in gonadal development and sex determination*. Int J Biochem Cell Biol, 2007. **39**(1): p. 31-43.
82. Natoli, T.A., et al., *Wt1 functions in the development of germ cells in addition to somatic cell lineages of the testis*. Dev Biol, 2004. **268**(2): p. 429-40.
83. Schmahl, J., et al., *Colocalization of WT1 and cell proliferation reveals conserved mechanisms in temperature-dependent sex determination*. Genesis, 2003. **35**(4): p. 193-201.
84. Wilhelm, D. and C. Englert, *The Wilms tumor suppressor WT1 regulates early gonad development by activation of Sf1*. Genes Dev, 2002. **16**(14): p. 1839-51.
85. Klattig, J., et al., *Wilms' tumor protein Wt1 is an activator of the anti-Mullerian hormone receptor gene Amhr2*. Mol Cell Biol, 2007. **27**(12): p. 4355-64.
86. Gao, F., et al., *The Wilms tumor gene, Wt1, is required for Sox9 expression and maintenance of tubular architecture in the developing testis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(32): p. 11987-92.
87. Gao, F., et al., *Wt1 functions in ovarian follicle development by regulating granulosa cell differentiation*. Hum Mol Genet, 2014. **23**(2): p. 333-41.
88. Shimamura, R., et al., *The Wilms' tumor gene WT1 can regulate genes involved in sex determination and differentiation: SRY, Mullerian-inhibiting substance, and the androgen receptor*. Clin Cancer Res, 1997. **3**(12 Pt 2): p. 2571-80.
89. Hossain, A. and G.F. Saunders, *The human sex-determining gene SRY is a direct target of WT1*. J Biol Chem, 2001. **276**(20): p. 16817-23.
90. Cen, C., et al., *Inactivation of Wt1 causes pre-granulosa cell to steroidogenic cell transformation and defect of ovary development*. Biol Reprod, 2020. **103**(1): p. 60-69.
91. Boublikova, L., et al., *Wilms tumor gene 1 (WT1), TP53, RAS/BRAF and KIT aberrations in testicular germ cell tumors*. Cancer Lett, 2016. **376**(2): p. 367-76.
92. Hylander, B., et al., *Expression of Wilms tumor gene (WT1) in epithelial ovarian cancer*. Gynecol Oncol, 2006. **101**(1): p. 12-7.
93. Liu, Z., et al., *High levels of Wilms' tumor 1 (WT1) expression were associated with aggressive clinical features in ovarian cancer*. Anticancer Res, 2014. **34**(5): p. 2331-40.
94. Alberta, J.A., et al., *Role of the WT1 tumor suppressor in murine hematopoiesis*. Blood, 2003. **101**(7): p. 2570-4.
95. Loeb, D.M., et al., *An isoform of the Wilms' tumor suppressor gene potentiates granulocytic differentiation*. Leukemia, 2003. **17**(5): p. 965-71.
96. Maurer, U., et al., *The Wilms' tumor gene is expressed in a subset of CD34+ progenitors and downregulated early in the course of differentiation in vitro*. Exp Hematol, 1997. **25**(9): p. 945-50.
97. King-Underwood, L., J. Renshaw, and K. Pritchard-Jones, *Mutations in the Wilms' tumor gene WT1 in leukemias*. Blood, 1996. **87**(6): p. 2171-9.
98. Yamagami, T., et al., *Growth inhibition of human leukemic cells by WT1 (Wilms tumor gene) antisense oligodeoxynucleotides: implications for the involvement of WT1 in leukemogenesis*. Blood, 1996. **87**(7): p. 2878-84.
99. Ito, K., et al., *Antiapoptotic function of 17AA(+)-WT1 (Wilms' tumor gene) isoforms on the intrinsic apoptosis pathway*. Oncogene, 2006. **25**(30): p. 4217-29.
100. Di Stasi, A., et al., *Review of the Results of WT1 Peptide Vaccination Strategies for Myelodysplastic Syndromes and Acute Myeloid Leukemia from Nine Different Studies*. Front Immunol, 2015. **6**: p. 36.

101. Augsberger, C., et al., *Targeting intracellular WT1 in AML with a novel RMF-peptide-MHC-specific T-cell bispecific antibody*. *Blood*, 2021. **138**(25): p. 2655-2669.
102. Inoue, K., et al., *Aberrant overexpression of the Wilms tumor gene (WT1) in human leukemia*. *Blood*, 1997. **89**(4): p. 1405-12.
103. Netinatsunthorn, W., et al., *WT1 gene expression as a prognostic marker in advanced serous epithelial ovarian carcinoma: an immunohistochemical study*. *BMC Cancer*, 2006. **6**: p. 90.
104. Silberstein, G.B., et al., *Altered expression of the WT1 wilms tumor suppressor gene in human breast cancer*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(15): p. 8132-7.
105. Menssen, H.D., et al., *Wilms' tumor gene (WT1) expression in lung cancer, colon cancer and glioblastoma cell lines compared to freshly isolated tumor specimens*. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2000. **126**(4): p. 226-32.
106. Menssen, H.D., et al., *Analysis of Wilms tumor gene (WT1) expression in acute leukemia patients with special reference to the differential diagnosis between eosinophilic leukemia and idiopathic hypereosinophilic syndromes*. *Leuk Lymphoma*, 2000. **36**(3-4): p. 285-94.
107. Ogawa, H., et al., *The usefulness of monitoring WT1 gene transcripts for the prediction and management of relapse following allogeneic stem cell transplantation in acute type leukemia*. *Blood*, 2003. **101**(5): p. 1698-704.
108. Tamaki, H., et al., *Monitoring minimal residual disease in leukemia using real-time quantitative polymerase chain reaction for Wilms tumor gene (WT1)*. *Int J Hematol*, 2003. **78**(4): p. 349-56.
109. Bergmann, L., et al., *High levels of Wilms' tumor gene (wt1) mRNA in acute myeloid leukemias are associated with a worse long-term outcome*. *Blood*, 1997. **90**(3): p. 1217-25.
110. Mayo, M.W., et al., *WT1 modulates apoptosis by transcriptionally upregulating the bcl-2 proto-oncogene*. *EMBO J*, 1999. **18**(14): p. 3990-4003.
111. Herzer, U., et al., *The Wilms tumor suppressor gene wt1 is required for development of the spleen*. *Curr Biol*, 1999. **9**(15): p. 837-40.
112. Wagner, N., et al., *Coronary vessel development requires activation of the TrkB neurotrophin receptor by the Wilms' tumor transcription factor Wt1*. *Genes Dev*, 2005. **19**(21): p. 2631-42.
113. Chau, Y.Y., et al., *Acute multiple organ failure in adult mice deleted for the developmental regulator Wt1*. *PLoS Genet*, 2011. **7**(12): p. e1002404.
114. Wagner, K.D., et al., *The Wilms' tumor gene Wt1 is required for normal development of the retina*. *EMBO J*, 2002. **21**(6): p. 1398-405.
115. Patek, C.E., et al., *A zinc finger truncation of murine WT1 results in the characteristic urogenital abnormalities of Denys-Drash syndrome*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(6): p. 2931-6.
116. Fraizer, G.C., et al., *Expression of the tumor suppressor gene WT1 in both human and mouse bone marrow*. *Blood*, 1995. **86**(12): p. 4704-6.
117. Dame, C., et al., *Wilms tumor suppressor, Wt1, is a transcriptional activator of the erythropoietin gene*. *Blood*, 2006. **107**(11): p. 4282-90.
118. Kirschner, K.M. and H. Scholz, *WT1 in Adipose Tissue: From Development to Adult Physiology*. *Front Cell Dev Biol*, 2022. **10**: p. 854120.
119. Wang, Q.A., et al., *Tracking adipogenesis during white adipose tissue development, expansion and regeneration*. *Nat Med*, 2013. **19**(10): p. 1338-44.
120. Lee, Y.H., et al., *Cellular origins of cold-induced brown adipocytes in adult mice*. *FASEB J*, 2015. **29**(1): p. 286-99.
121. Diaz, M.B., S. Herzig, and A. Vegiopoulos, *Thermogenic adipocytes: from cells to physiology and medicine*. *Metabolism*, 2014. **63**(10): p. 1238-49.
122. Kirschner, K.M., et al., *Wilms tumor protein-dependent transcription of VEGF receptor 2 and hypoxia regulate expression of the testis-promoting gene Sox9 in murine embryonic gonads*. *J Biol Chem*, 2017. **292**(49): p. 20281-20291.
123. Rudigier, L.J., et al., *Ex vivo cultures combined with vivo-morpholino induced gene knockdown provide a system to assess the role of WT1 and GATA4 during gonad differentiation*. *PLoS One*, 2017. **12**(4): p. e0176296.

124. Wagner, N., et al., *Intermediate filament protein nestin is expressed in developing kidney and heart and might be regulated by the Wilms' tumor suppressor Wt1*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2006. **291**(3): p. R779-87.
125. Steege, A., et al., *Wilms' tumor protein (-KTS) modulates renin gene transcription*. *Kidney Int*, 2008. **74**(4): p. 458-66.
126. Kirschner, K.M., L.K. Sciesielski, and H. Scholz, *Wilms' tumour protein Wt1 stimulates transcription of the gene encoding vascular endothelial cadherin*. *Pflugers Arch*, 2010. **460**(6): p. 1051-61.
127. Jacobi, C.L., et al., *Transcriptional regulation by the Wilms tumor protein, Wt1, suggests a role of the metalloproteinase Adamts16 in murine genitourinary development*. *J Biol Chem*, 2013. **288**(26): p. 18811-24.
128. Muller, M., et al., *The Wilms tumor protein WT1 stimulates transcription of the gene encoding insulin-like growth factor binding protein 5 (IGFBP5)*. *Gene*, 2017. **619**: p. 21-29.
129. Kirschner, K.M., et al., *The Wilms' tumor suppressor Wt1 activates transcription of the erythropoietin receptor in hematopoietic progenitor cells*. *FASEB J*, 2008. **22**(8): p. 2690-701.
130. Wu, H., et al., *Generation of committed erythroid BFU-E and CFU-E progenitors does not require erythropoietin or the erythropoietin receptor*. *Cell*, 1995. **83**(1): p. 59-67.
131. Lin, C.S., et al., *Differential effects of an erythropoietin receptor gene disruption on primitive and definitive erythropoiesis*. *Genes Dev*, 1996. **10**(2): p. 154-64.
132. Kieran, M.W., et al., *Thrombopoietin rescues in vitro erythroid colony formation from mouse embryos lacking the erythropoietin receptor*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(17): p. 9126-31.
133. Zon, L.I., et al., *Activation of the erythropoietin receptor promoter by transcription factor GATA-1*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. **88**(23): p. 10638-41.
134. Chiba, T., Y. Ikawa, and K. Todokoro, *GATA-1 transactivates erythropoietin receptor gene, and erythropoietin receptor-mediated signals enhance GATA-1 gene expression*. *Nucleic Acids Res*, 1991. **19**(14): p. 3843-8.
135. Chin, K., et al., *Regulation of transcription of the human erythropoietin receptor gene by proteins binding to GATA-1 and Sp1 motifs*. *Nucleic Acids Res*, 1995. **23**(15): p. 3041-9.
136. Ellisen, L.W., et al., *The Wilms tumor suppressor WT1 directs stage-specific quiescence and differentiation of human hematopoietic progenitor cells*. *EMBO J*, 2001. **20**(8): p. 1897-909.
137. Svedberg, H., J. Richter, and U. Gullberg, *Forced expression of the Wilms tumor 1 (WT1) gene inhibits proliferation of human hematopoietic CD34(+) progenitor cells*. *Leukemia*, 2001. **15**(12): p. 1914-22.
138. Chen, D. and G. Zhang, *Enforced expression of the GATA-3 transcription factor affects cell fate decisions in hematopoiesis*. *Exp Hematol*, 2001. **29**(8): p. 971-80.
139. Pandolfi, P.P., et al., *Targeted disruption of the GATA3 gene causes severe abnormalities in the nervous system and in fetal liver haematopoiesis*. *Nat Genet*, 1995. **11**(1): p. 40-4.
140. Kirschner, K.M., et al., *Wt1 haploinsufficiency induces browning of epididymal fat and alleviates metabolic dysfunction in mice on high-fat diet*. *Diabetologia*, 2022. **65**(3): p. 528-540.
141. Guerra, C., et al., *Emergence of brown adipocytes in white fat in mice is under genetic control. Effects on body weight and adiposity*. *J Clin Invest*, 1998. **102**(2): p. 412-20.
142. Walden, T.B., et al., *Recruited vs. nonrecruited molecular signatures of brown, "brite," and white adipose tissues*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2012. **302**(1): p. E19-31.
143. Kiefer, F.W., et al., *Retinaldehyde dehydrogenase 1 regulates a thermogenic program in white adipose tissue*. *Nat Med*, 2012. **18**(6): p. 918-25.
144. Shao, M., et al., *Zfp423 Maintains White Adipocyte Identity through Suppression of the Beige Cell Thermogenic Gene Program*. *Cell Metab*, 2016. **23**(6): p. 1167-1184.
145. Hepler, C., et al., *Directing visceral white adipocyte precursors to a thermogenic adipocyte fate improves insulin sensitivity in obese mice*. *Elife*, 2017. **6**.
146. Motamedi, F.J., et al., *WT1 controls antagonistic FGF and BMP-pSMAD pathways in early renal progenitors*. *Nat Commun*, 2014. **5**: p. 4444.

147. Cannon, B. and J. Nedergaard, *Brown adipose tissue: function and physiological significance*. *Physiol Rev*, 2004. **84**(1): p. 277-359.
148. Betz, M.J. and S. Enerback, *Targeting thermogenesis in brown fat and muscle to treat obesity and metabolic disease*. *Nat Rev Endocrinol*, 2018. **14**(2): p. 77-87.
149. Choi, S.S., et al., *PPARgamma Antagonist Gleevec Improves Insulin Sensitivity and Promotes the Browning of White Adipose Tissue*. *Diabetes*, 2016. **65**(4): p. 829-39.
150. Kroon, T., et al., *PPARgamma and PPARalpha synergize to induce robust browning of white fat in vivo*. *Mol Metab*, 2020. **36**: p. 100964.
151. Mittaz, L., et al., *Adamts-1 is essential for the development and function of the urogenital system*. *Biol Reprod*, 2004. **70**(4): p. 1096-105.
152. Espey, L.L., et al., *Ovarian expression of a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs during ovulation in the gonadotropin-primed immature rat*. *Biol Reprod*, 2000. **62**(4): p. 1090-5.
153. Robker, R.L., et al., *Progesterone-regulated genes in the ovulation process: ADAMTS-1 and cathepsin L proteases*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(9): p. 4689-94.
154. Madan, P., et al., *Expression of messenger RNA for ADAMTS subtypes changes in the periovulatory follicle after the gonadotropin surge and during luteal development and regression in cattle*. *Biol Reprod*, 2003. **69**(5): p. 1506-14.
155. Pohl, M., et al., *Matrix metalloproteinases and their inhibitors regulate in vitro ureteric bud branching morphogenesis*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2000. **279**(5): p. F891-900.
156. Miller-Hodges, E. and P. Hohenstein, *WT1 in disease: shifting the epithelial-mesenchymal balance*. *J Pathol*, 2012. **226**(2): p. 229-40.
157. Gopalakrishnan, K., et al., *Targeted disruption of Adamts16 gene in a rat genetic model of hypertension*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. **109**(50): p. 20555-9.
158. Roberts, S.G., *In Vitro Transcription to Study WT1 Function*. *Methods Mol Biol*, 2016. **1467**: p. 137-54.
159. Hartwig, S., et al., *Genomic characterization of Wilms' tumor suppressor 1 targets in nephron progenitor cells during kidney development*. *Development*, 2010. **137**(7): p. 1189-203.
160. Kirschner, K.M., et al., *Amine oxidase copper-containing 1 (AOC1) is a downstream target gene of the Wilms tumor protein, WT1, during kidney development*. *J Biol Chem*, 2014. **289**(35): p. 24452-62.
161. Loikkanen, I., et al., *Polyamines are involved in murine kidney development controlling expression of c-ret, E-cadherin, and Pax2/8 genes*. *Differentiation*, 2005. **73**(6): p. 303-12.
162. Abdulhussein, A.A. and H.M. Wallace, *Polyamines and membrane transporters*. *Amino Acids*, 2014. **46**(3): p. 655-60.
163. Sieckmann, T., et al., *Strikingly conserved gene expression changes of polyamine regulating enzymes among various forms of acute and chronic kidney injury*. *Kidney Int*, 2023.
164. Johnson, J.P. and F.G. Grillo, *Thyroid hormone induction of ornithine decarboxylase in ischemic acute renal failure*. *Ren Fail*, 1994. **16**(4): p. 435-44.
165. Zahedi, K., et al., *Spermidine/spermine-N1-acetyltransferase ablation protects against liver and kidney ischemia-reperfusion injury in mice*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2009. **296**(4): p. G899-909.
166. Kim, J., *Spermidine rescues proximal tubular cells from oxidative stress and necrosis after ischemic acute kidney injury*. *Arch Pharm Res*, 2017. **40**(10): p. 1197-1208.
167. Kim, J., *Spermidine is protective against kidney ischemia and reperfusion injury through inhibiting DNA nitration and PARP1 activation*. *Anat Cell Biol*, 2017. **50**(3): p. 200-206.
168. Li, F.C., et al., *Plasma concentration of diamine oxidase (DAO) predicts 1-month mortality of acute-on-chronic hepatitis B liver failure*. *Clin Chim Acta*, 2018. **484**: p. 164-170.
169. Cakmaz, R., et al., *A combination of plasma DAO and citrulline levels as a potential marker for acute mesenteric ischemia*. *Libyan J Med*, 2013. **8**: p. 1-6.
170. Zahedi, K., et al., *Expression of SSAT, a novel biomarker of tubular cell damage, increases in kidney ischemia-reperfusion injury*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2003. **284**(5): p. F1046-55.

171. Zahedi, K., et al., *The role of spermidine/spermine N1-acetyltransferase in endotoxin-induced acute kidney injury*. Am J Physiol Cell Physiol, 2010. **299**(1): p. C164-74.
172. Saito, A., et al., *Serum levels of polyamines in patients with chronic renal failure*. Kidney Int Suppl, 1983. **16**: p. S234-7.
173. Hirota, M., et al., *Quantitative measurement of spliced XBP1 mRNA as an indicator of endoplasmic reticulum stress*. J Toxicol Sci, 2006. **31**(2): p. 149-56.
174. Cippa, P.E., et al., *Transcriptional trajectories of human kidney injury progression*. JCI Insight, 2018. **3**(22).

6. Zusammenfassung

Die Organogenese beschreibt den Prozess der Bildung der verschiedenen Organe und Gewebe in einem Organismus und wird durch verschiedene Signalwege streng kontrolliert. Transkriptionsfaktoren spielen hier für die Regulation der Genexpression eine wichtige Rolle. Die Mechanismen der Organogenese zu verstehen, ist für die Vorbeugung und die Behandlung von Krankheiten, sowie für die Entwicklung regenerativer Therapien, wichtig. Wilms-Tumorprotein (WT1) ist ein Transkriptionsfaktor, der in der Organogenese eine wichtige Rolle einnimmt. WT1 kontrolliert unter anderem die Expression von Genen, die für Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren, Transkriptionsfaktoren, extrazelluläre Proteine und Zellzyklusregulatoren kodieren. WT1 wird während der Embryonalentwicklung in einer Vielzahl von Geweben exprimiert, unter anderem in den Nieren, Gonaden, der Leber, dem Herzen und dem Mesothel. Mutationen im WT1-Gen werden mit verschiedenen Krankheiten in Verbindung gebracht, darunter Wilms-Tumor, Denys-Drash-, Frasier- und WAGR-Syndrom. Neben seiner Rolle in der Entwicklung wurde die WT1 Expression auch in erwachsenen Geweben und Zellen beobachtet, hauptsächlich in den Nieren und im Knochenmark. Aufgrund seiner möglichen Rolle in der Tumorgenese ist WT1 als Ziel therapeutischer Interventionen Gegenstand umfangreicher Forschungsarbeiten.

WT1 wird spezifisch in Vorläuferzellen des viszeralen, nicht aber des subkutanen weißen Fettgewebes exprimiert. Neuere Erkenntnisse deuten darauf hin, dass thermogene Gene, die im braunen Fettgewebe exprimiert werden, vor allem im subkutanen weißen Fettgewebe induziert werden können. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass WT1 dieses thermogene Programm in weißen Fettzellen unterdrückt. WT1 zeigt eine starke Expression in hämatopoetischen Stammzellen und Vorläuferzellen. Es spielt eine wichtige Rolle bei der Bildung und Differenzierung dieser Zellen, indem es die Genexpression während der Zelldifferenzierung reguliert. Mutationen im *WT1*-Gen wurden mit einer Reihe von Blutkrankheiten in Verbindung gebracht, darunter akute und chronische myeloische Leukämie. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass WT1 ein direkter transkriptioneller Aktivator des Erythropoietin-Rezeptor Gens ist und hierdurch die Erythropoese beeinflusst. WT1 reguliert mehrere Schritte der Gonadenentwicklung. Fehlt bei Mäusen die WT1 Expression, dann wird die Gonadenbildung eingeleitet, jedoch degeneriert das Gewebe aufgrund von Apoptose. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass WT1 ein direkter transkriptioneller Aktivator des A Disintegrin-Like And Metalloprotease With Thrombospondin Type 1 Motif 16 (*Adamts16*) Gens ist und wie sich diese Aktivierung auf die Entwicklung der Gonade auswirkt. WT1 hat sich als wichtiger Regulator der Nierenentwicklung erwiesen, der eine entscheidende Rolle bei der Differenzierung und Erhaltung von Nierenvorläuferzellen spielt. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass WT1 ein transkriptioneller

Regulator der kupferhaltigen Aminoxidase 1 (*Aoc1*) ist. AOC1 ist ein Regulator des Polyaminsystems, so dass WT1 über die Regulation des Polyaminsystems Einfluss auf die Nierenentwicklung nimmt. Zudem konnte gezeigt werden, dass *Aoc1* bei verschiedenen experimentellen Nierenschädigungen *Aoc1* in hohem Maße verstärkt exprimiert wird, was zu einer erheblichen Verringerung des Putrescine-Gehalts der Niere führte. Zudem konnte eine bemerkenswert ähnliche Veränderung der Polyamin regulierenden Enzyme in den meisten Nierenpathologien festgestellt werden. Hier zeigte sich eine verringerte Expression von Enzymen, die an der Polyaminsynthese beteiligt sind, zusammen mit einer erhöhten Expression von Polyamin-abbauenden Enzymen.

In dieser Arbeit wurden wichtige Erkenntnisse über die Rolle von WT1 bei der Regulation von Genen gewonnen, die für die Entwicklung verschiedener Gewebe und Organe von Bedeutung sind. Die Ergebnisse dieser Studie können dazu beitragen, die Grundlagen der Organogenese besser zu verstehen und neue Ansätze zur Behandlung von Erkrankungen zu entwickeln, die mit Mutationen im *WT1* Gen in Verbindung gebracht werden.

7. Danksagung

Ich möchte allen Personen, die in meiner wissenschaftlichen Laufbahn eine wesentliche Rolle gespielt und zu meiner persönlichen Entwicklung beigetragen haben, meinen aufrichtigen Dank aussprechen.

Zuerst möchte ich meinem Mentor, Prof. Dr. Holger Scholz, meinen Dank für seine Unterstützung, Anleitung und Ermutigung auf meinem Weg aussprechen. Er war von unschätzbarem Wert für die Entwicklung meiner Forschungsinteressen und Ideen. Sein Interesse und seine Nähe zum Thema war immer eine Inspiration für mich. Auch bin ich ihm für seine Unterstützung bei meinen ersten Schritten in der Lehre zu Dank verpflichtet, seine Foliensätze waren immer unendlich hilfreich bei der Einarbeitung in neue Lehrveranstaltungen.

Mein großer Dank gilt den ehemaligen und aktuellen technischen Mitarbeiterinnen der Arbeitsgruppe Inge Grätsch, Angelika Richter, Ursula Kastner und Ulrike Neumann, die verantwortungsbewusst, verlässlich und engagiert, die praktische und oft herausfordernde Arbeit im Labor mit durchgeführt haben. Sie hatten immer ein offenes Ohr für Probleme und haben immer sehr viel Unterstützung gegeben.

Ich bin den ehemaligen und aktuellen Postdocs der Arbeitsgruppe Anja Bondke-Persson, Katharina Krueger und Simon Kelterborn für ihre Zusammenarbeit und fruchtbaren Diskussionen dankbar. Sie waren ein wesentlicher Bestandteil meiner akademischen Reise, und ich habe viel von ihnen gelernt.

Den Doktoranden Lina Sciesielski, Charlotte Jacobi, Lukas Rudigier, Monique Lau, Julian Braun, Lorenzo Catanese, Valentin Schmidt und Tobias Sieckmann möchte ich von Herzen für ihr unermüdliches Engagement, ihre Unterstützung und ihre harte Arbeit im Labor danken. Zudem für die immer lustige und fröhliche Atmosphäre im Büro aber auch für die vielen spannenden Diskussionen. Auch die gemeinsamen Kongressbesuche waren so viel schöner mit ihnen zusammen.

Meinen Kooperationspartnern Christof Dame und Lina Sciesielski danke ich für Ihren unschätzbaren Beiträge zu meinem Weg. Ihre Unterstützung und Ermutigung waren eine ständige Quelle der Motivation und Inspiration.

Pontus B. Persson für die große Unterstützung meines Projekts im SFB1365 Renoprotection.

Ich möchte mich auch bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) bedanken, die mir bei der Finanzierung meiner Forschungsprojekte behilflich war.

Schließlich schulde ich meinem Ehemann Jörg Kirschner und meiner Tochter Carolina Kirschner Dank für ihre unermüdliche Unterstützung, ihr Verständnis und ihre Ermutigung, die mir die Freiheit gegeben haben, meiner Leidenschaft für Forschung und Lehre in großem Umfang nachzugehen.

8. Erklärung

Erklärung nach § 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, Karin Kirschner, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

Datum

Unterschrift