

4. Diskussion

Unter den Tumorsuppressoren nimmt das Wilmstumorgen *WT1* aufgrund seiner Rolle bei der Embryogenese eine Sonderstellung ein. *WT1* ist u. a. für die Entwicklung des Urogenitalsystems und Mesothels notwendig. Der Nachweis von *WT1* in umschriebenen Regionen des zentralen Nervensystems deutet auf eine bislang nicht näher untersuchte Relevanz bei der neuronalen Differenzierung hin. In dieser Arbeit sollten exemplarisch die Bedeutung von *WT1* für die Entwicklung von Neuronen in der Netzhaut des Auges untersucht und zugrunde liegende Signalmechanismen identifiziert werden.

4.1 Die Rolle von *Wt1* für die Netzhautentwicklung in frühen Embryonalstadien (E12)

Die ausdifferenzierte Retina besteht hauptsächlich aus Stäbchen und Zapfen (Photorezeptoren), horizontalen, bipolaren und amakrinen Interneuronen, Ganglienzellen und Müller-Gliazellen. Die verschiedenen Zellarten der adulten Retina entstehen aus multipotenten Vorläuferzellen (Neuroblasten) in einer festgelegten Reihenfolge und in einem für sie charakteristischen Zeitintervall (Sidman, 1961; Livesey & Cepko, 2001; Young, 1985). In vielen Spezies differenzieren zuerst die Ganglienzellen (bei der Maus zwischen E11 und P3, Maximum bei E13-16), dicht gefolgt von Horizontalzellen, Zapfen, amakrinen Zellen, Stäbchen, Bipolarzellen und zuletzt die Müller-Zellen (zwischen E17 und P10). Dabei breitet sich die Zelldifferenzierung in der Retina konzentrisch von zentral nach peripher aus (Prada et al., 1991).

Wt1 mRNA war mittels *in situ* Hybridisierung bei Wildtyp-Mäusen ab dem Zeitpunkt E12 in neuronalen Progenitorzellen der Netzhaut und in der Augenlinse nachweisbar. Die Retinae *Wt1*-defizienter E12 Embryonen wiesen im Vergleich zu altersidentischen normalen Mäusen eine signifikant verringerte Zahl neuronaler Vorläuferzellen auf. Der Verlust neuronaler Progenitorzellen bei *Wt1*^{-/-} Mausembryonen war mit einer verminderten Zellproliferation assoziiert, die immunhistologisch über eine abgeschwächte Expression des Proliferationsmarkers PCNA und über einen reduzierten BrdU-Einbau nachgewiesen wurde. Diese Befunde lassen die Schlussfolgerung zu, dass *Wt1* zu frühen Entwicklungszeitpunkten für die normale Proliferation neuronaler Progenitorzellen in der embryonalen Retina erforderlich ist.

Der Einfluss von *WT1* auf die Regulation von Zellproliferation und Zellzyklus wurde v. a. an immortalisierten Tumorzelllinien untersucht und erbrachte widersprüchliche Ergebnis. Bei manchen Zellsystemen führte die Hemmung der endogenen *WT1* Expression mit Antisense-Oligonukleotiden zum Stopp des Zellzyklus in der G₁- (Tuna et al., 2005) oder auch in der

G₂/M-Phase (z. B. Algar et al., 1998; Yamagami et al., 1998) mit nachfolgender Apoptose. Dieser Befund deutet darauf hin, dass WT1 für die normale Zellzyklusprogression erforderlich sein könnte. Allerdings resultierte in anderen Zellsystemen auch die ektopische WT1 Expression in einem Proliferationsstopp in der G₁-Phase mit anschließender Apoptose (z. B. Englert et al., 1995b; Kudoh et al., 1995). In primären hämatopoetischen Zellen zeigte WT1 zusätzlich einen direkten Effekt auf die zelluläre Differenzierung (Ellisen et al., 2001). Offenbar ist die Wirkung von WT1 auf Zellproliferation und Apoptose abhängig vom Zelltyp und von der Interaktion mit weiteren Kofaktoren (z. B. p53, Par4), die zellspezifisch exprimiert werden (Maheswaran et al., 1995; Richard et al., 2001). Durch den variablen Effekt auf Zellproliferation und Apoptose lässt sich auch die Doppelrolle von WT1 erklären, das einerseits für die normale Entwicklung notwendig ist und andererseits seine Inaktivierung zum Tumorwachstum führen kann.

Interessanterweise waren die retinalen Phänotypveränderungen *Wt1*-defizienter Mausembryonen mit gemischtem MF1×B6 Hintergrund weniger stark ausgeprägt als bei Mäusen vom Stamm C57BL/6 (B6). Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass die Penetranz des *Wt1*^{-/-} Phänotyps in der Netzhaut des Auges dem modifizierenden Einfluss anderer, bislang nicht identifizierter Gene unterliegt. Ähnliche Erkenntnisse wurden zuvor bei der gestörten Milzentwicklung von *Wt1*^{-/-} Embryonen gewonnen, die in ihrem Schweregrad ebenfalls von der genetischen Ausstattung der Versuchstiere abhängig war (Herzer et al., 1999).

4.2 Die Rolle von Wt1 für die Netzhautentwicklung in späteren Embryonalstadien (E18)

Am 18. Embryonaltag (E18) wurde *Wt1* bei Wildtyp-Mäusen in der sich entwickelnden Ganglienzellschicht der Retina exprimiert. In der Netzhaut der Maus erfolgt die Ausbildung und Reifung von Ganglienzellen normalerweise zwischen dem 11. Embryonaltag (E11) und dem 3. Postnataltag (P3) (Sidman 1961; Young, 1985). Charakteristisch für *Wt1*-defiziente E18 Mausembryonen waren die im Vergleich zu normalen Embryonen deutlich dünnere und zellärmere Ganglienzellschicht und ein blind endender Sehnerv. Die innerste Netzhautschicht besteht bei adulten Mäusen zu 50-60% aus retinalen Ganglienzellen und zu 40-50% aus verlagerten amakrinen Zellen (Drager & Olsen, 1981; Jeon et al., 1998). Aus Mangel an zelltypspezifischen Antikörpern konnte keine direkte Unterscheidung getroffen werden, ob die retinale Entwicklungsstörung bei *Wt1*^{-/-} Embryonen auf einen Defekt der Ganglienzellen und/oder der amakrinen Zellen zurückzuführen war. Allerdings sprechen der blind endende Sehnerv und die fehlende Expression des Ganglienzellmarkers *Pou4f2* in den *Wt1*^{-/-} Retinae dafür, dass vom Zellverlust in der innersten Netzhautschicht vornehmlich Ganglienzellen betroffen waren. Entsprechend ist anzunehmen, dass *Wt1* bei Wildtyp-Mäusen in den retinalen

Ganglienzellen exprimiert wird. Diese Annahme wird gestützt durch Beobachtungen bei Ratten, bei denen am Tag der Geburt (P0) 90-100% der Neuronen in der Ganglienzellschicht Ganglienzellen waren und ihre Zahl im Verlauf der Postnatalentwicklung (auf 53%) abnahm, während die Zahl der amakrinen Zellen in der Ganglienzellschicht zunahm (Perry et al., 1983).

Das Fehlen von ca. 40% der retinalen Ganglienzellen bei *Wt1*-defizienten Mausembryonen war mit einer im Vergleich zu Wildtypen signifikant höheren Zahl TUNEL-positiver, d. h. apoptotischer, Zellen zum Zeitpunkt E18 korreliert. Der programmierte Zelltod (Apoptose) ist neben der Zellproliferation und -differenzierung ein wichtiger Vorgang während der normalen Embryonalentwicklung. In den Retinae von Wildtyp-Mäusen tritt Apoptose normalerweise erst im Perinatal- bzw. frühen Postnatalstadium auf. Dabei erfolgt der Untergang von ca. 40-50% der retinalen Ganglienzellen zwischen P0 und P11 (Young, 1984). In vergleichbarer Weise wie die Zelldifferenzierung beginnt die Apoptose retinaler Zellen vornehmlich in den zentralen Retina-Abschnitten und verlagert sich zunehmend in die Peripherie (Young, 1984). Bei *Wt1*^{-/-} Mäusen findet der durch Apoptose bedingte Verlust retinaler Ganglienzellen offensichtlich bereits im Embryonalstadium statt und erfolgt damit zeitlich vor dem „physiologischen“ postnatalen Zelltod bei Wildtyp-Tieren. Diese Resultate sprechen dafür, dass *Wt1* während der späteren Entwicklungsstadien (E18) den programmierten Zelltod retinaler Ganglienzellen hemmt. Entsprechend konnten durch transgene Expression des humanen *WT1* Gens in *Wt1*-defizienten Mausembryonen die morphologischen Defekte an Retina und Sehnerv zumindest teilweise verhindert werden. Die retinale Apoptoserate in den transgenen Mäusen und Wildtyp-Embryonen war nicht signifikant verschieden. In Übereinstimmung mit den Beobachtungen in der sich entwickelnden Retina wurde auch in anderen Geweben *Wt1*-defizienter Embryonen, z. B. im Primordium der Milz (Herzer et al., 1999) und im Nierenmesenchym (Kreidberg et al., 1993), vermehrt Apoptose nachgewiesen. Eine wichtige Funktion von *Wt1* während der Embryonalentwicklung scheint folglich darin zu bestehen, Zellen vom programmierten Untergang zu retten. Die Apoptosehemmung ist vermutlich Voraussetzung dafür, dass differenzierungsfördernde Signale wirksam werden können. Bei adulten Mäusen war eine retinale *Wt1* Expression nicht nachweisbar. *Wt1* scheint somit keine entscheidende Rolle beim Erhalt der ausgereiften Netzhautstruktur zu spielen.

4.3 Die Familie der Pou4f Transkriptionsfaktoren

Es stellte sich die Frage, über welche Signalmechanismen WT1 die Entwicklung der Retina kontrolliert. In der Netzhaut des Auges werden zahlreiche Transkriptionsfaktoren exprimiert, von denen die meisten in neuronalen Zellen, einige wenige auch in nichtneuronalen Geweben

vorkommen (Übersicht in Freund et al., 1996; Jean et al., 1998). Von besonderem Interesse erschien der POU Transkriptionsfaktor Pou4f2, da Mäuse mit homozygoter *Pou4f2* Inaktivierung einen ähnlichen retinalen Phänotyp wie *Wt1*^{-/-} Mausembryonen aufweisen (s. u.).

Die Familie der POU Transkriptionsfaktoren wurde aufgrund eines gemeinsamen DNA-Bindungsmotivs definiert, das ursprünglich in den Transkriptionsfaktoren Pit-1, Oct-1 und Oct-2 bei Säugetieren und Unc-86 bei der Nematode *Caenorhabditis elegans* identifiziert wurde. Die DNA-Bindungsdomäne der POU Protein umfasst 150-160 Aminosäuren und besteht aus zwei hoch konservierten Subdomänen (Übersicht in Ryan & Rosenfeld, 1997). POU-Domänen Transkriptionsfaktoren werden vor allem im peripheren und zentralen Nervensystem exprimiert und regulieren neuronale Proliferation und Differenzierung.

Die drei Klasse IV POU-Domänen Transkriptionsfaktoren Pou4f1 (ehemals Brn-3a, Brn-3.0), Pou4f2 (Brn-3b, Brn-3.2) und Pou4f3 (Brn-3c, Brn-3.1) von Säugetieren sind strukturell eng verwandt, haben ähnliche molekulare Eigenschaften und zeigen charakteristische, überlappende Expressionsmuster in peripheren sensorischen Neuronen und sensomotorischen Hirnstammarealen (Xiang et al., 1995). Die DNA-bindende POU-Domäne der drei Pou4f Transkriptionsfaktoren ist zu 95% identisch, die Regionen außerhalb der POU-Domäne zu 70% (Xiang et al., 1995). Alle drei Pou4f Proteine binden die gleichen spezifischen DNA Konsensussequenzen (A/G)CTCATTA(T/C) (Xiang et al., 1995) und CAT(N)₃TAAT (Turner et al., 1994).

Durch alternatives Spleissen von *Pou4f2* entstehen eine lange 46 kDa Pou4f2(l) und eine kurze 35 kDa Pou4f2(s) Polypeptid-Isoform (Theil et al., 1993). Beide Pou4f2 Spleißvarianten wirken über Bindung an die Pou4f Konsensusstelle verschiedener Promotoren als transkriptionale Aktivatoren (z. B. Martin et al., 2005; Plaza et al., 1999; Trieu et al., 1999).

Bei Mäusen wird Pou4f2 in den Neuronen sensorischer Ganglien, Rückenmark, Mittel- und Rautenhirn, Innenohr, Retina und Mitteldarm exprimiert (Gan et al., 1996, 1999; Turner et al., 1994; Xiang, 1998; Xiang et al., 1993, 1995). Darüber hinaus wurde Pou4f2 auch in einigen nicht-neuronalen Zellen von Brustdrüse, Hoden, Uterus und Ovarien nachgewiesen (Budhram-Mahadeo et al., 1999, 2001).

In der embryonalen Retina wird Pou4f2 ab E11,5 in undifferenzierten postmitotischen Ganglienzellvorläuferzellen exprimiert, die aus der äußeren Neuroblastenschicht in die entstehende Ganglienzellschicht migrieren. Die Pou4f2 Expression fällt zeitlich mit der Entstehung retinaler Ganglienzellen ab E11 zusammen. Vereinbar mit einer Reifung der Retina vom Zentrum in Richtung Peripherie ist die Expression von Pou4f2 zunächst auf die zentralen Netzhautbereiche beschränkt. Die Zahl Pou4f2-exprimierender Vorläuferzellen nimmt parallel zur Entwicklung der meisten Ganglienzellen zwischen E13,5 und E16,5 zu und zwischen E18,5

und P3 wieder ab. Nach Abschluss der Ganglienzellbildung ist Pou4f2 ab P3 ausschließlich in differenzierten retinalen Ganglienzellen nachweisbar (Turner et al., 1994; Gan et al., 1996, 1999; Xiang, 1998; Xiang et al., 1995). Die Transkriptionsfaktoren Pou4f1 und Pou4f2 werden in nahezu allen, Pou4f3 in ca. 50% der Ganglienzellen exprimiert (Gan et al., 1999).

Um die biologische Funktion von Pou4f2 zu studieren, wurden Mäuse mit homozygoter Inaktivierung des *Pou4f2* Gens erzeugt. Bei *Pou4f2*-defizienten Mäusen (*Pou4f2*^{-/-}) waren ab P0 bis in die Adoleszenz 60-70% weniger retinale Ganglienzellen als bei den altersentsprechenden Wildtypen nachweisbar. Die Sehnerven von *Pou4f2*^{-/-} Mäuse hatten eine im Vergleich zu normalen Tieren deutlich geringere Querschnittsfläche mit signifikant weniger Axonbündeln. Der Verlust retinaler Ganglienzellen war mit verstärkter Apoptose in der *Pou4f2*^{-/-} Ganglienzellschicht zwischen E15,5 und P1 vergesellschaftet (Erkman et al., 1996; Gan et al., 1996, 1999; Xiang, 1998). *Pou4f2*-defiziente Mausembryonen (ab E13) zeigten ausgeprägte Defekte des axonalen Wachstums *in vivo* und *in vitro*. Anstelle normaler Axonen bildeten *Pou4f2*^{-/-} retinale Ganglienzellen dendritische Nervenfortsätze aus (Gan et al., 1999; Wang et al., 2000). Es wurde daher vermutet, dass *Pou4f2* normalerweise die Ausbildung von Dendriten supprimiert. Für diese Annahme spricht auch, dass stabile Überexpression von *Pou4f2* in neuronalen ND7 Zellen das Auswachsen von Nervenfortsätzen und weitere neuronale Zelldifferenzierungsvorgänge hemmte (Smith et al., 1997). Die Neuriten der verbleibenden *Pou4f2*^{-/-} retinalen Ganglienzellen bildeten keine regulären Axonbündel aus und zeigten ausgeprägte Projektionsdefekte innerhalb der Netzhaut sowie im Sehnerven und entlang der Sehbahn (Erkman et al., 2000; Gan et al., 1999). Die Störung des Axonwachstums wird als Ursache für die Apoptose der *Pou4f2*^{-/-} retinalen Ganglienzellen angenommen (Erkman et al., 2000; Gan et al., 1999; Wang et al., 2000). Zusammengefasst lässt sich feststellen, dass *Pou4f2* offenbar für Wachstum, Wegfindung und Bündelung der Axone sowie für die terminale Differenzierung und das Überleben retinaler Ganglienzellen erforderlich ist.

Neuere Befunde dokumentieren, dass die beiden verwandten Transkriptionsfaktoren Pou4f1 und Pou4f3 den Verlust von Pou4f2 in der embryonalen Retina zumindest teilweise funktionell kompensieren können. *Pou4f2/Pou4f3* Doppel-Knockout-Mäuse zeigten einen weiteren Verlust von Axonen und retinalen Ganglienzellen verglichen mit *Pou4f2*^{-/-} Mäusen. Durch *in vitro* Expression von *Pou4f3* mittels eines viralen Amplicon Vektors in *Pou4f2*^{-/-} retinalen Zellen wurden die Defekte *Pou4f2*-defizienter Axone abgeschwächt und das Axonwachstum partiell wiederhergestellt (Wang et al., 2002). Knock-in einer *Pou4f1* Expressionskassette in den *Pou4f2*

Locus korrigierte die retinalen und axonalen Defekte und resultierte in einer gesteigerten Expression von Pou4f2 Zielgenen (Pan et al., 2005). In der Retina unterliegt die Pou4f2 Expression wahrscheinlich einer Kreuzaktivierung durch Pou4f1 und Pou4f3 sowie einer Autoregulation (Liu et al., 2001; Trieu et al., 1999, 2003). Andererseits scheint Pou4f2 für die Expression von Pou4f1 und Pou4f3 erforderlich zu sein. Denn in der *Pou4f2*^{-/-} Retina war die Zahl Pou4f1- und Pou4f3-positiver Zellen signifikant vermindert (Gan et al., 1996; Xiang, 1998). Pou4f2 reguliert die Expression von Pou4f1 und Pou4f3 wahrscheinlich direkt. Die Transaktivierung des *Pou4f1* Promotors durch Pou4f2 konnte bereits nachgewiesen werden (Trieu et al., 1999).

4.4 Wt1 ist für die Expression von Pou4f2 in retinalen Ganglienzellen erforderlich

Verschiedene Befunde legen einen engen Zusammenhang von Wt1 und Pou4f2 in den Ganglienzellen der Netzhaut nahe. Zum einen waren Wt1 und Pou4f2 zu verschiedenen Entwicklungszeitpunkten in retinalen Ganglienzellen kolokalisiert. Weiterhin wiesen *Wt1*-defiziente Embryonen ähnliche Netzhautanomalien auf wie *Pou4f2*^{-/-} Mutanten. Ferner wurde Pou4f2 in den retinalen Ganglienzellen von E18 Mausembryonen mit homozygoter Inaktivierung des *Wt1* Gens nicht exprimiert. Schließlich konnten die normale Struktur von Netzhaut und Sehnerv einschließlich der Expression von *Pou4f2* durch ein humanes *WT1* YAC Transgen in Mausembryonen mit endogenem *Wt1*-Defekt weitgehend wiederhergestellt werden. Mit dem gleichen *WT280* Expressionskonstrukt gelang die vollständige Wiederherstellung der Entwicklungsdefekte von *Wt1*^{-/-} Mäusen an Herz und Zwerchfell (Moore et al., 1999). Hingegen konnten, ähnlich wie in der Retina, die Entwicklungsstörungen an Nieren und Nebennieren nur unvollständig verhindert werden (Moore et al., 1999). Durch YAC transgene Expression eines größeren *WT470* Konstrukts wurden die meisten Entwicklungsdefekte *Wt1*-defizienter Mäuse kompensiert (Guo et al., 2002). Folgende Gründe für die inkomplette Wiederherstellung der *Wt1*^{-/-} Entwicklungsdefekte durch *WT280* kommen in Frage: Durch den *WT280* YAC Transfer (Genotyp *Wt1*^{-/-}; *WT280*^{+/-}) wird nur ca. 10% des normalen *Wt1* mRNA Expressionsniveaus erreicht (Guo et al., 2002), so dass die erzielte Gendosis möglicherweise zu gering ist. Außerdem fehlen dem *WT280* Konstrukt möglicherweise wichtige regulatorische Elemente. Zudem könnten die humanen und murinen WT1 Proteine trotz >95% identischer Aminosäuresequenz (Buckler et al., 1991) funktionelle Unterschiede aufweisen und auch ihre Transkription könnte verschieden reguliert werden. Da die Kreuzung von *Wt1* heterozygoten und YAC transgenen Mäusen auf einem heterogenen genetischen Hintergrund erfolgte, spielt vielleicht auch die unterschiedliche genetische Ausstattung der Versuchstiere eine Rolle. Es bliebe deshalb zu überprüfen, ob durch

transgene Expression des humanen *WT470* oder eines murinen *Wt1* Konstrukts die vollständige Wiederherstellung der normalen Retinastruktur in Mausembryonen mit endogenem *Wt1*-Gendefekt (*Wt1*^{-/-}) möglich wäre.

4.5 Retinaler Phänotyp von *Pou4f2*^{-/-} und *Wt1*^{-/-} Mäusen: Gemeinsamkeiten und Unterschiede

Der retinale Phänotyp von *Pou4f2* und *Wt1* Knockout Mäusen weist mit dem apoptotisch bedingten Verlust retinaler Ganglienzellen und dem gestörtem Wachstum ihrer Axone bemerkenswerte Gemeinsamkeiten auf. Dennoch bestehen auch Unterschiede. So ist bei postnatalen *Pou4f2*^{-/-} Mäusen (ab P0) der Verlust von 60-80% retinaler Ganglienzellen deutlich ausgeprägter als die um 40% verringerte Zellzahl in der Ganglienzellschicht bei *Wt1*-defizienten E18 Mausembryonen. Diese Unterschiede sind umso deutlicher, als die Ganglienzellschicht der Maus nur zu 50-60% aus Ganglienzellen besteht und daneben auch andere Zelltypen, z. B. amakrine Zellen, enthält (Drager & Olsen, 1981; Jeon et al., 1998). Beim Vergleich der Netzhautmorphologie ist allerdings zu berücksichtigen, dass *Wt1*^{-/-} und *Pou4f2*^{-/-} Mutationen an verschiedenen Mausstämmen erzeugt wurden, so dass der unterschiedliche Einfluss modifizierender Gene auf die Penetranz des jeweiligen Phänotyps nicht ausgeschlossen werden kann. Zudem ist davon auszugehen, dass *Wt1* neben *Pou4f2* vermutlich noch weitere Gene in der Retina reguliert, die den Verlust der *Pou4f2* Funktion möglicherweise partiell kompensieren und/oder unabhängig von *Pou4f2* zur Ausbildung eines abgeschwächten Phänotyps führen. Bereits die *Pou4f* Proteine selbst können durch Auto- und Kreuzaktivierung ihre Expression wechselseitig regulieren. Im Einklang mit dieser Annahme konnten in *Wt1*^{-/-} Retinae trotz des Verlustes von *Pou4f2* keine Veränderungen der Expression von *Pou4f1* und *Pou4f3* festgestellt werden. Andererseits mag die intrauterine Letalität der *Wt1*^{-/-} Embryonen dazu führen, dass das Fehlen von *Pou4f2* und der retinalen Ganglienzellen in *Wt1*^{-/-} Retinae nicht voll wirksam werden. Im Unterschied zu *Pou4f2*, das die terminale Differenzierung und das Überleben retinaler Ganglienzellen reguliert (Gan et al., 1999; Pan et al., 2005), ist *Wt1* offensichtlich zusätzlich für die Proliferation neuronaler Vorläuferzellen in der Retina erforderlich.

In *Wt1*^{-/-} Retinae wurde am 18. Embryonaltag (E18) eine signifikant höhere Apoptoserate als bei Wildtyp-Mäusen nachgewiesen. In ähnlicher Weise hatten *Pou4f2*^{-/-} Mausembryonen im Perinatalstadium (E18,5, P0, P1) in der Ganglienzellschicht im Mittel 60% mehr TUNEL-positive Zellen. Zu früheren embryonalen (E12,5-E15,5) sowie späteren postnatalen (P4, P7) Entwicklungszeitpunkten war kein signifikanter Unterschied in der Apoptoserate verglichen mit Wildtyp-Mäusen feststellbar (Xiang, 1998). In einer anderen Studie war zwischen E15,5 und

E18,5 die Zahl apoptotischer Zellen in den Retinae transgener Mäuse mit Knock-in eines *lacZ* Reportergens in den *Pou4f2* Locus im Vergleich zu Wildtypen signifikant erhöht (Gan et al., 1999). Diese Daten von *Pou4f2*^{-/-} Mäusen entsprechen gut den Befunden bei *Wt1*^{-/-} Mutanten. Bei *Pou4f2*^{-/-} Mäusen wurden eine Hypoplasie des Sehnerven und Defekte der retinokollikulären Projektion von Ganglienzellaxonen nachgewiesen. Das gestörte Axonwachstum wird als Ursache für den Ganglienzellverlust angesehen (Erkman et al., 2000; Gan et al., 1999; Wang et al., 2000). *Wt1*^{-/-} Embryonen (E18) besitzen einen blind endenden Sehnerv, dessen morphologischer Defekt gravierender erscheint als die Veränderungen bei *Pou4f2*^{-/-} Mäusen.

Die Gemeinsamkeiten im retinalen Phänotyp *Wt1*- und *Pou4f2*-defizienter Embryonen legen die Vermutung nahe, dass die Effekte von *Wt1* während der normalen Netzhautentwicklung in erheblichem Umfang durch *Pou4f2* vermittelt werden. Um das zweifelsfrei zu bestätigen, müsste nachgewiesen werden, dass die Retinadefekte in *Wt1*^{-/-} Mäusen durch transgene Expression von *Pou4f2* kompensierbar sind.

4.6 *Wt1* reguliert die Transkription von *Pou4f2* *in vitro* und *in vivo*

Die Abwesenheit von *Pou4f2* in der Netzhaut *Wt1*-defizienter Embryonen zeigt, dass *Wt1* offenbar für die retinale Expression von *Pou4f2* notwendig ist. Es galt deshalb zu klären, ob *Pou4f2* in den *Wt1*^{-/-} Retinae als Folge des Ganglienzellverlustes fehlte, oder ob die Expression von *Pou4f2* durch *Wt1* direkt oder indirekt reguliert wird. Dazu wurden Zelllinien mit forcierter Expression der transkriptionskompetenten *Wt1*(-KTS) Isoform etabliert. Die positive Korrelation des Expressionsniveaus von *Wt1*(-KTS) und *Pou4f2* in diesen Zelllinien deutet darauf hin, dass zwischen beiden Faktoren ein regulatorischer Zusammenhang besteht. Um den Mechanismus der Aktivierung der *Pou4f2* Expression durch *Wt1*(-KTS) zu analysieren, wurde der Promotor des humanen *POU4F2* Gens kloniert und gemeinsam mit *Wt1* Expressionskonstrukten transient kotransfiziert. Durch gezielte Mutagenese der Promotor-Reporterkonstrukte wurde das cis-regulatorische Element für die Transaktivierung des *POU4F2* Promotors durch *Wt1*(-KTS) identifiziert und die Spezifität der Bindung in Elektrophorese Mobilitätsgelshiftassays bestätigt. Die *Wt1*-Bindungsstelle im *POU4F2* Promotor (5'-CGAGGGTGTG-3') zeigte Ähnlichkeit mit dem *Wt1* sensitiven Element WTE (5'-GCGTGGGAGT-3') (Nakagama et al., 1995), das u. a. in den Promotoren von *Bcl-2*, *Amphiregulin* und *Vitamin D* Rezeptor gefunden wurde. Die Bindungssequenz WTE hat eine 20-30 mal höhere Affinität für die *WT1*(-KTS) Isoform als die *WT1*/*EGR1* Konsensusbindungsstelle 5'-GCGGGGCG-3' (Mayo et al., 1999). Im Gegensatz zur *Wt1*(-KTS) Isoform hatte die *Wt1*(+KTS) Spleißvariante keinen signifikanten Einfluss auf die Aktivität des *POU4F2* Promotors. Diese Befunde bestätigen die Funktion der *Wt1*(-KTS)

Isoformen als Transkriptionsfaktoren, während für die *Wt1(+KTS)* Spleißvarianten eine Rolle bei der post-transkriptionalen Regulation vermutet wird (s. 1.3). Zusammengefasst dokumentieren die Resultate, dass *Wt1(-KTS)* die Transkription des *POU4F2* Gens direkt stimuliert.

Die Augendefekte *Wt1*-defizienter Mäuse könnten auch im Hinblick auf genetische Anomalien beim Menschen relevant sein. Patienten mit Wilmstumoren besitzen ein erhöhtes Risiko für Aniridie. Der Irisdefekt bei Wilmstumorpatienten wird auf Deletionen im Aniridie-Gen *PAX6* auf Chromosom 11p13 zurückgeführt (Ton et al., 1991). Da die transkriptionalen Mechanismen der Retinaentwicklung zwischen verschiedenen Spezies teilweise konserviert sind (Übersicht in Jean et al., 1998), könnten Retinadefekte bei Wilmstumorpatienten durch den Mangel an *WT1* selbst verursacht sein. Vorstellbar wäre auch eine indirekte Regulation von *PAX6* durch *WT1* via *Pou4f2*. Tatsächlich stimulierte *Pou4f2* den *PAX6* Promotor bei transienter Transfektion in neuroretinalen Zellen (Plaza et al., 1999). Andererseits fanden sich retinale Defekte nur bei Mäusen mit Inaktivierung *beider Wt1* Allele und nicht bei heterozygot *Wt1* mutierten Tieren. Ferner ist die Zahl *Wt1* exprimierender Zellen in der embryonalen Retina verglichen mit anderen Organen (z. B. der Nieren) relativ klein und daher die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten inaktivierender *Wt1* Mutationen eher gering. Das könnte einer der Gründe dafür sein, dass ein Zusammenhang zwischen isolierten *WT1* Gendefekten und einer gestörten Netzhautentwicklung beim Menschen bislang nicht berichtet wurde.

4.7 *Wt1* und *Pou4f2* in nicht-neuronalen Geweben

Pou4f2 spielt wie *Wt1* nicht nur bei der neuronalen Entwicklung eine Rolle, sondern wurde auch in Epithelzellen von Mammae, Zervix und Testes entdeckt (Budhram-Mahadeo et al., 2001). In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals die Expression von *Pou4f2* mittels Immunhistochemie und mRNA *in situ* Hybridisierung in den glomerulären Podozyten adulter Nieren nachgewiesen. Von besonderem Interesse ist, dass *Pou4f2* und *Wt1* Protein in den Podozyten kolokalisiert waren. Podozyten sind die einzigen Zellen, die in der adulten Niere *WT1* exprimieren (Mundlos et al., 1993). Sie bilden mit ihren Fußfortsätzen die glomeruläre Filtrationsbarriere und kontrollieren die renale Ultrafiltration (Übersicht in Pavenstädt, 2000). Ihre Schädigung spielt beim Fortschreiten chronischer Nierenerkrankungen eine zentrale Rolle. Mutationen im *WT1* Gen, wie sie z. B. bei Patienten mit Denys-Drash-Syndrom auftreten, sind mit Funktionsstörungen der Podozyten (diffuse mesangiale Sklerose) assoziiert (Patek et al., 1999). *WT1* Mutationen wurden auch bei Patienten mit isolierter diffuser mesangialer Sklerose und kongenitalem nephrotischen Syndrom gefunden (Ito et al., 1999). Zudem war eine verminderte Expression von *WT1* mit einem Verlust der normalen Podozytenstruktur, insbesondere mit einer

Verschmelzung der Fußfortsätze, verbunden (Guo et al., 2002). Podozyten sind hoch differenzierte Zellen, deren Fußfortsätze strukturelle, biologische und molekulare Ähnlichkeiten mit den Neuriten von Neuronen aufweisen. Die gemeinsame Expression von Struktur- und Regulationsproteinen für Signaltransduktion, Transmembrantransport und die Ausbildung von Interzellularkontakten lässt ähnliche transkriptionale Regulationsmechanismen in beiden Zelltypen vermuten (Kobayashi et al., 2004). So wird z. B. Nephtrin sowohl in den Schlitzmembranen der Podozyten als auch in Neuronen des zentralen Nervensystems exprimiert. Die Transkription von *Nephtrin* wird durch *Wt1* aktiviert (Guo et al., 2004; Wagner et al., 2004). Eine mögliche Regulation von *Nephtrin* durch *Pou4f2* wurde bisher noch nicht untersucht. Es erscheint aber nahe liegend, dass *WT1* durch Stimulation der *Pou4f2* Expression für die Ausbildung hoch differenzierter Zellfortsätze in Podozyten und Neuronen erforderlich sein könnte.

Pou4f2 wurde außerdem in epithelialen Zellen von Mamma und Zervix nachgewiesen (Budhram-Mahadeo et al., 2001). Für *Pou4f2* wird ebenso wie für *Wt1* eine Rolle in der Pathogenese des Mammakarzinoms diskutiert. *WT1* kommt in Myoepithel- und duktalem Zellen von normalem Brustdrüsengewebe vor (Silberstein et al., 1997) und wird in primären Brustdrüsenkarzinomen verstärkt exprimiert (Loeb et al., 2001). In ca. 8% der duktalem Carcinoma-in-situ und in ca. 21% der infiltrativ wachsenden Mammakarzinome wurden Defekte im *WT1* Genlocus mit Verlust der Heterozygotie nachgewiesen (Fabre et al., 1999). In Übereinstimmung mit diesen Befunden bewirkte antisense-Hemmung von *WT1* eine verminderte Proliferation von Brustkrebszellen *in vitro* (Tuna et al., 2005; Zapata-Benavides et al., 2002). Eine verstärkte *WT1* Expression wurde besonders in biologisch aggressiven Östrogen-Rezeptor negativen Mammakarzinomen festgestellt (Silberstein et al., 1997), und es konnte die direkte Interaktion von *WT1* und dem Östrogen-Rezeptor- α gezeigt werden (Reizner et al., 2005). *Pou4f2* mRNA kommt ebenfalls in normalem Brustdrüsengewebe vor, und die Expression ist in malignen Mammatumoren verstärkt. Die *Pou4f2* Expression korreliert invers mit der des Brustkrebs Tumorsuppressorgens *BRCA1* (Budhram-Mahadeo et al., 1999). Das *BRCA1* Antionkogen ist durch Keimzellmutationen bei 15-45% aller hereditären Mammakarzinome inaktiviert, und 60-85% aller Frauen mit *BRCA1* Mutationen entwickeln ein Mammakarzinom (Nathanson et al., 2001). In Kotransfektionsexperimenten wurde gezeigt, dass *Pou4f2* in humanen Brustkrebszellen die Promotoraktivität von *BRCA1* supprimiert (Budhram-Mahadeo et al., 1999). *Pou4f2* interagiert auch mit dem Östrogen-Rezeptor und aktiviert den Östrogen-Rezeptor Promotor (Budhram-Mahadeo et al., 1998). Stabile Überexpression von *Pou4f2* führte

in humanen Brustkrebszellen zu einem gesteigertem Wachstum, gesteigerter Proliferation und verstärkter Kolonienbildung. Antisense-Hemmung hatte die entgegengesetzten Effekte zur Folge (Dennis et al., 2001). Der eigene Versuch, eine mögliche Koexpression von Wt1 und Pou4f2 in den Mammae von Mäusen nachzuweisen, scheiterte an der schwierigen Präparation murinen Brustdrüsengewebes. Die Kolokalisation von WT1 und Pou4f2 in weiteren Epithelien, z. B. der Gallenblase und der Magenmuskosa, deutet darauf hin, dass beide Proteine nicht nur bei der neuronalen Differenzierung, sondern auch bei der Entwicklung epithelialer Gewebe synergistisch wirksam sein könnten. Aufgrund der möglichen Rolle in der Tumorphogenese besteht auch aus klinischer Perspektive ein Interesse, die molekulare Interaktion von WT1 und Pou4f2 näher zu charakterisieren.

4.8 Update

Seit Abschluss der experimentellen Untersuchungen zu dieser Arbeit wurden weitere Befunde publiziert, welche die eigenen Ergebnisse unterstützen und die Rolle von WT1 bei der neuronalen Differenzierung bestätigen. An Mausembryonen mit selektiven Defekt der Wt1(-KTS) bzw. Wt1(+KTS) Isoformen wurden vergleichende Analysen der Netzhautmorphologie durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, dass die retinalen Entwicklungsstörungen bei Mäusen mit Fehlen der Wt1(-KTS) Isoform deutlich stärker ausgeprägt waren als bei Embryonen mit selektivem Verlust von Wt1(+KTS) (Wagner et al., 2005). Frühere Untersuchungen hatten bereits ergeben, dass die Entwicklung des Urogenitalsystems bei Wt1(-KTS) defizienten Mäusen schwerer gestört war als bei Wt1(+KTS) defizienten Embryonen (Hammes et al., 2001).

Außer in der Retina wurde Wt1 bei der Maus auch in Basalzellen des Riechepithels, aus denen sich die sensorischen Riechzellen entwickeln, nachgewiesen (Wagner et al., 2005). Im olfaktorischen Epithel von $Wt1^{-/-}$ Mäusen waren, ähnlich wie in der Retina, vermehrt apoptotische Zellen nachweisbar. Somit ist Wt1 offenbar nicht nur in der Netzhaut, sondern auch im olfaktorischen Epithel für die Proliferation und das Überleben neuronaler Vorläuferzellen erforderlich. Die Resultate deuten darauf hin, dass Wt1 generell für die Entwicklung sensorischer Epithelien von Bedeutung sein könnte.

Neben seiner Rolle bei der neuronalen Entwicklung und Differenzierung im normalen Organismus scheint Wt1 auch für pathophysiologische Prozesse relevant zu sein. So wurde WT1 auch in malignen Netzhauttumoren (Retinoblastomen) (Wagner et al., 2002) und malignen neuronalen Tumoren (Dennis et al., 2002) nachgewiesen. Das Retinoblastom ist der häufigste intraokuläre maligne Tumor im Kindesalter und tritt mit einer Inzidenz von 1:18.000-30.000 auf.

Es entsteht, wenn beide Allele des Retinoblastomgens *RB* durch Mutationen inaktiviert sind (Knudson, 1971; Übersicht in Classon & Harlow, 2002). Der Tumor geht aus embryonalen, unvollständig differenzierten Netzhautzellen hervor (Übersicht in Dyer & Bremner, 2005). Die Tumorgenese von Retinoblastomen erinnert an die Pathologie bei Wilmstumoren. In Übereinstimmung mit der postulierten Rolle von WT1 bei der normalen Netzhautentwicklung verhinderte antisense-Hemmung von *WT1* die neuronale Differenzierung humaner Y-79 Retinoblastomzellen *in vitro*, und in soliden Retinoblastomen wurde WT1 v. a. in Regionen mit verstärkter Zellproliferation nachgewiesen (Wagner et al., 2002).

Interessanterweise wird WT1 vermehrt in apoptotischen Neuronen beim Morbus Alzheimer exprimiert (Lovell et al., 2003). Durch Hemmung von *WT1* wurde der Apoptose von Nervenzellen entgegengewirkt (Lovell et al., 2003). Zukünftigen Arbeiten bleibt es vorbehalten, die mögliche Rolle von WT1 bei neurodegenerative Erkrankungen abzuklären.