

5. Zusammenfassung

Das Wilmstumorgen *WT1* kodiert einen Zinkfinger-Transkriptionsfaktor und wurde ursprünglich aufgrund seiner durch Mutationen bedingten Inaktivierung bei 10-15% sporadischer Nierentumoren bei Kindern (Wilmstumoren, Nephroblastome) identifiziert. Neben seiner Bedeutung als Tumorsuppressor ist WT1 auch für die normale Entwicklung des Urogenitalsystems und epithelialer Gewebe mesodermalen Ursprungs erforderlich. Die Expression von WT1 in neuroektodermalen Geweben und die Assoziation von Wilmstumoren mit Fehlbildungen des Auges (Aniridie) warfen die Frage auf, ob WT1 auch für die Entwicklung neuronaler Zellen der Retina bedeutsam sein könnte.

Mausembryonen mit homozygoter Inaktivierung des *Wt1* Gens (*Wt1*^{-/-}) hatten im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen zellärmere Retinae mit einem Verlust von ca. 40% der retinalen Ganglienzellen und ein gestörtes Sehnervenwachstum. Das Fehlen retinaler Ganglienzellen war bedingt durch eine Proliferationsstörung neuronaler Progenitorzellen in einer frühen Phase der Embryonalentwicklung (E12) und durch Apoptose von Ganglienzellvorläufern in späteren Stadien (E18). Der retinale Phänotyp *Wt1*-defizienter Mäuse ähnelte der Retinamorphologie von Mäusen mit homozygoter Inaktivierung des POU-Domänen Transkriptionsfaktors *Pou4f2*. *Pou4f2* ist für die terminale Differenzierung und das Überleben retinaler Ganglienzellen erforderlich. Während *Wt1* und *Pou4f2* in retinalen Ganglienzellen von Wildtyp-Mäusen kolokalisiert waren, fehlte *Pou4f2* in den *Wt1*^{-/-} Retinae. Der Verlust der retinalen *Pou4f2* Expression und der Retinadefekt bei *Wt1*^{-/-} Embryonen waren durch transgene Expression eines 280 kb humanen *WT1* Genkonstrukts partiell kompensierbar. *Wt1* war damit für die Expression von *Pou4f2* in der embryonalen Retina erforderlich. Stabile Expression der *Wt1*(-KTS) Isoform, die als Transkriptionsregulator fungiert, in humanen embryonalen Nierenzellen resultierte in einer signifikanten Zunahme von endogenem *Pou4f2* Protein und mRNA. In U2OS Osteosarkomzellen mit induzierbarer *Wt1*(-KTS) Expression wurde ebenfalls eine Korrelation beider Faktoren nachgewiesen. Um den Mechanismus der Regulation von *Pou4f2* durch *Wt1* weiter zu untersuchen, wurde zunächst ein *POU4F2* Promotor-Reporterkonstrukt hergestellt, in dem die 5' regulatorische Region des humanen *POU4F2* Gens enthalten war. Bei transienter Kotransfektion in U2OS Zellen aktivierte die *Wt1*(-KTS) Isoform ein ca. 3,8 kb langes *POU4F2* Promotor-Reporterkonstrukt, während die *Wt1*(+KTS) Spleißvariante, die bei der posttranskriptionellen mRNA Prozessierung beteiligt ist, den *POU4F2* Promoter nicht induzierte. Durch sukzessive Verkürzung des Promotor-Reporterkonstrukts wurde der *Wt1*-responsive

Bereich im *POU4F2* Promoter eingegrenzt und mittels Sequenzanalyse eine mögliche Wt1 Bindungsstelle identifiziert, die Ähnlichkeit mit einer Wt1 Konsensusstelle in bereits beschriebenen Wt1 Zielgenen hatte. Gezielte Deletion dieser potenziellen Wt1 Bindungsstelle verhinderte die Transaktivierung des *POU4F2* Promoters durch Wt1(-KTS). Die Spezifität der Wt1 Bindung an das identifizierte Element wurde durch Elektrophorese Mobilitätsgelshiftassay (EMSA) und Konkurrenzexperimente bestätigt. Anhand dieser Ergebnisse wurde *Pou4f2* als ein neues Zielgen von Wt1 charakterisiert. Immundoppelfärbungen ergaben eine nukleäre Koexpression von Wt1 und Pou4f2 nicht nur in der neuronalen Retina, sondern auch in Podozyten der Nierenglomeruli sowie im Epithel von Gallenblase und Magen adulter Mäuse. Diese Befunde lassen vermuten, dass die Aktivierung von Pou4f2 durch Wt1 möglicherweise auch für die Entwicklung epithelialer Gewebe eine Rolle spielt.

Abstract

The Wilms' tumor gene WT1 encodes a zinc finger transcription factor and was initially identified by its mutational inactivation in 10-15% of sporadic kidney tumors in children (Wilms' tumors, nephroblastomas). In addition to its role as a tumor suppressor WT1 is essential for normal development of the urogenital tract and epithelial tissues derived from the mesoderm. WT1 expression in neural tissues and eye abnormalities (aniridia) in Wilms' tumor patients led to the assumption that WT1 may be required for the formation of the embryonic retina as well. Compared to their normal littermates, mouse embryos with targeted deletion of the *Wt1* gene (*Wt1*^{-/-}) had remarkably thinner retinas lacking approx. 40% of the retinal ganglion cells. Furthermore, the growth of the optic nerve was severely disturbed in *Wt1*^{-/-} embryos. Loss of ganglion cells in the developing retina was due to impaired proliferation of neural progenitor cells in the early embryonic stage (e12) and increased apoptosis of retinal ganglion cell precursors during the later phases of embryonic development (e18). The retinal phenotype of *Wt1* deficient mice was reminiscent of the retinal abnormalities that were seen in mice lacking the POU-domain transcription factor *Pou4f2*. Pou4f2 is essential for the terminal differentiation and survival of retinal ganglion cells as well as the outgrowth, guidance and fasciculation of their axons. Wt1 and Pou4f2 were co-localized in developing retinal ganglion cells of wild-type mice, and expression of Pou4f2 was lost in *Wt1*^{-/-} retinas. The lack of Pou4f2 expression and the

defects in *Wt1*^{-/-} retinas were partially complemented by transgenic delivery of a yeast artificial chromosome (YAC) containing approx. 280 kb of the human *WT1* gene. These findings indicated that *Wt1* is necessary for *Pou4f2* expression in the embryonic retina. *Pou4f2* protein and mRNA were significantly enhanced in human embryonic kidney cells with stable expression of the *Wt1(-KTS)* isoform, which functions as a transcriptional regulator. Likewise, U2OS osteosarcoma cells with inducible expression of the *Wt1(-KTS)* splice variant had increased *Pou4f2* levels compared to uninduced cells. These findings suggested that *Wt1(-KTS)* can stimulate the expression of *Pou4f2*. To investigate the underlying mechanism a *POU4F2* promoter-reporter construct was generated, which contained approx. 3.8 kb of the human *POU4F2* promoter sequence. This construct was transiently transfected into U2OS osteosarcoma cells together with *Wt1* expression vectors encoding either the *Wt1(-KTS)* or the *Wt1(+KTS)* isoform. The *Wt1(-KTS)* splice variant significantly stimulated transcription from the *POU4F2* promoter whereas the *Wt1(+KTS)* isoform, which is presumably involved in post-transcriptional mRNA processing rather than transcriptional control, had no significant effect. Truncated *POU4F2* promoter-reporter constructs were co-transfected to narrow-down the responsible *Wt1* sensitive element. Sequence analysis revealed a predicted *Wt1* consensus site that was similar to a previously defined high affinity *Wt1* binding sequence. Targeted deletion of this element abolished activation of a *POU4F2* promoter-reporter construct by *Wt1(-KTS)*. Binding of *Wt1(-KTS)* to the identified element was demonstrated by electrophoresis mobility shift assay (EMSA) and competition experiments. These findings indicate that *Pou4f2* is a novel transcriptional downstream target gene of *Wt1*. Double-immunofluorescent labelling revealed a cellular co-expression of *Wt1* and *Pou4f2* not only in developing retinal ganglion cells of mouse embryos but also in the renal podocytes and the epithelial layer of gall bladder and stomach in adult wild-type mice. In conclusion, transcriptional activation of *Pou4f2* by *Wt1* could also play a role in the formation of certain epithelial tissues.