

1 Einleitung und Fragestellung

1.1. Wilmstumor: Folge einer gestörten Nierenentwicklung

Die Kontrolle von Wachstums- und Differenzierungsprozessen ist sowohl für die Organentwicklung als auch für die Geweberegeneration von zentraler Bedeutung. Sie umfasst komplexe Prozesse wie Zellteilung, Differenzierung und Apoptose. Während der Organogenese erfolgt die Zunahme der Zellmasse häufig aus einem Pool proliferierender pluripotenter Stammzellen. Für die Ausbildung von Geweben ist die Differenzierung der pluripotenten Zellen erforderlich. Bleiben diese Differenzierungsvorgänge aus bzw. erfolgen sie unvollständig, so können sich aufgrund des hohen Proliferationspotenzials der Vorläuferzellen neben Entwicklungsstörungen auch Tumoren ausbilden.

Wilmstumoren (Nephroblastome) gelten als klassisches Beispiel für die Folgen einer gestörten Organentwicklung. Nephroblastome sind maligne Nierentumoren, die im Kindesalter zumeist um das 5. Lebensjahr diagnostiziert werden und mit einer Häufigkeit von etwa 1:10.000 vorkommen (1). Sie entstehen vermutlich aus postnatal persistierenden Resten embryonalen Nierenparenchyms mit gesteigerter Proliferationsbereitschaft (sog. „nephrogenic rests“). Die Malignome weisen eine charakteristische Morphologie auf, die neben tubulären Elementen auch Mesenchymzellen und Stromagewebe beinhaltet, und somit Ähnlichkeit mit den Stadien der normalen Nierenentwicklung besitzt (1). Bei weniger als 1% der betroffenen Kinder wird ein familiäres Auftreten dieser Nierentumoren beobachtet (1). In seltenen Fällen sind Wilmstumoren mit kongenitalen Entwicklungsstörungen assoziiert. Beispiele für die Kombination von Nephroblastomen mit komplexen Anomalien sind u.a. das WAGR-Syndrom, das Denys-Drash Syndrom, und das Frasier-Syndrom (Tabelle 1).

Beim WAGR-Syndrom handelt es sich um einen Symptomenkomplex aus Wilmstumor, Aniridie, Gonadendysgenese und mentaler Retardierung, der sich zwischen dem 1. und 4. Lebensjahr manifestiert. Durch genetische Analysen von Patienten mit WAGR-Syndrom konnten Wilmstumoren auf Defekte im kurzen Arm von Chromosom 11 (11p13) zurückgeführt werden (2, 3).

Syndrom	<i>WT1</i> -Status	Phänotyp	Entstehungsmodus
Denys-Drash	Heterozygote Punktmutation	Diffuse Mesangiumsklerose mit glomerulärer Nephropathie, häufig Wilmstumoren, weiblich: normale Gonaden, männlich: variabler Phänotyp der Gonaden: von "streak"-Gonaden, weiblichen inneren und äußeren Genitalien bis zu Hermaphroditismus	dominant-negativ (Missense-/ Deletionsmutation)
WAGR	Heterozygote Deletion auf Chromosom 11p13	Wilmstumoren: Aniridie, Gonadendysgenese, mentale Retardierung, selten Gonadoblastome, geringer ausgeprägter Phänotyp der Nieren und Gonaden als bei Denys-Drash- und Frasier-Patienten	<i>WT1</i> -Dosiseffekt Beteiligung weiterer Gene (<i>PAX 6</i>)
Frasier	Heterozygote Punktmutation der Splice Donor Site in Intron 9; sporadische Mutation in Exon 9	Glomerulopathie mit unspezifischer fokaler und segmentaler Glomerulosklerose, Gonadendysgenesien: männlich-zu-weibliche Gonadenumwandlung (weibliche äußere Genitalien, „streak“-Gonaden, XY Karyotyp), häufig Gonadoblastome	<i>WT1</i> -Dosis (50% weniger <i>WT1</i> (+KTS) Isoform), Deletionen

Tabelle 1 **Kongenitale, mit *WT1*-Mutationen assoziierte Syndrome** (nach 4)

In nachfolgenden Arbeiten gelang es, ein erstes Gen, das Wilmstumoren *WT1*, auf dem kurzen Arm von Chromosom 11 (11p13) zu lokalisieren und zu klonieren (2, 3). Inaktivierende Mutationen im *WT1*-Gen sind als Ursache für etwa 10-15% der Tumoren verantwortlich. Das *WT1*-Gen kodiert einen Tumorsuppressor, der das Wachstum maligner Neoplasien unterdrückt. Nach der von Knudson ursprünglich für das Retinoblastomgen formulierten „two-hit hypothesis“ können Tumoren bei Inaktivierung beider Allele eines Tumorsuppressors entstehen (5). Eine genetische Prädisposition zum Tumorwachstum resultiert aus der autosomal-dominanten Ererbung eines Gendefektes durch einen Elternteil. Ein zweites somatisches Mutationsereignis („second hit“) mit Verlust der Heterozygotie ist erforderlich, bevor es zur Ausbildung von Tumoren kommt (1, 5). In über 90% der Fälle ist die Genetik der Wilmstumoren ungeklärt, und die verantwortlichen Gendefekte sind noch nicht analysiert.

1.2. Struktur und Funktion des WT1 Gens

Das *WT1*-Gen erstreckt sich auf dem kurzen Arm von Chromosom 11 (11p13) über einen Bereich von ca. 50.000 Basenpaaren (bp). Es besteht aus 10 Exons und kodiert einen Transkriptionsfaktor des Cys₂-His₂ Zinkfingertyps (2, 3). Transkriptionsfaktoren sind Proteine, welche die transkriptionelle Aktivität von Genen steuern. Sie binden an definierte regulatorische Abschnitte auf den Zielgenen (sog. cis-regulatorische Elemente) und bewirken eine Veränderung der Transkriptionsrate. Der WT1-Transkriptionsfaktor bindet GC- und TC-reiche DNA-Konsensussequenzen der allgemeinen Struktur 5'-GNGNGGGNGN-3' bzw. 5'-(TCC)_n-3' (6, 7). Potenzielle WT1-Zielgene kodieren u.a. Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren, Transkriptionsfaktoren, Zelladhäsionsmoleküle und Zellzyklus- bzw. Apoptoseregulatoren. Eine Auswahl von WT1-Zielgenen ist in Tabelle 1.2 enthalten.

WT1-Zielgen	Referenz
<u>Wachstumsfaktoren</u>	
IGF-II	Drummond et al. 1992, Duarte et al. 1998, Madden et al. 1991, Nichols et al. 1995, Warder et al. 1995
PDGF-A	Gashler et al. 1992, Wang et al. 1992, 1993 a,b, 1995 a
Amphiregulin	Lee et al. 1999
MIS	Nachtigal et al. 1998
<u>Wachstumsfaktorrezeptoren</u>	
Insulin R	Wang et al. 1993b, Webster et al. 1997
IGF-I-R	Tajinda et al. 1999, Werner et al. 1993, 1994, 1995
EGF-R	Englert et al. 1995 a,b; Wang et al. 1993b, Liu et al. 2001
RAR- α	Goodyer et al. 1995
<u>Transkriptionsfaktoren</u>	
WT1	Hewitt et al. 1996, Hofmann et al. 1993, Malis et al. 1994, Rupprecht et al. 1994
Pax2	Ryan et al. 1995
Dax-1	Kim et al. 1999
Sry	Hossein and Saunders 2001
<u>extrazelluläre bzw. sezernierte Proteine</u>	
Syndecan 1	Cook et al. 1996
Thrombospondin 1	Dejong et al. 1999
NovH	Martinerie et al. 1996

Andere Faktoren

MDR-1	McCoy et al. 1999
Hsp70	Maheswaran et al. 1998
p21	Englert et al. 1997
Bcl-2	Hewitt et al. 1995, Mayo et al. 1999

Tabelle 2 **Auswahl bekannter WT1-Zielgene** (nach 2)

Die Transkription der meisten bislang identifizierten Zielgene wird durch WT1 stimuliert. Für einige Gene, z.B. für den insulinähnlichen Wachstumsfaktor II (IGF-II), wurde allerdings auch eine Transkriptionshemmung durch WT1 beschrieben (8). In Fällen tumorassoziierter Missense-Mutationen des *WT1*-Gens fand man einen Verlust der WT1-Funktion als Wachstumsinhibitor und Transkriptionsaktivator (9). Hingegen wurden Promotoren, die durch Wildtyp-WT1 negativ reguliert waren, auch durch das mutierte Protein gehemmt (9). Somit besteht die physiologisch relevante Funktion von WT1 wahrscheinlich in einer Transkriptionsaktivierung (9).

Es ist noch nicht abschließend geklärt, welche Mechanismen dafür verantwortlich sind, dass WT1 sowohl als Aktivator als auch als Inhibitor der Genexpression wirksam sein kann. Möglicherweise spielt für die Vermittlung einer hemmenden Wirkung die Interaktion von WT1 mit anderen intrazellulären Proteinen eine Rolle. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass WT1 durch seine Assoziation mit p53 einen inhibitorischen Einfluss an der „*early growth response gene 1*“ (*EGR1*) Bindungsstelle ausübt, während es in Abwesenheit von p53 die Transkription stimuliert (10).

Im WT1 Protein können verschiedene funktionell wichtige Domänen unterschieden werden (Abb. 1). Neben der Zinkfingerdomäne für die Nukleinsäurebindung im C-Terminus ist ein prolin- und glutaminreicher N-terminaler Abschnitt für die transaktivierenden bzw. transinhibierenden Eigenschaften von WT1 wesentlich. Weitere relevante Motive sind für Protein-Protein-Interaktion, RNA-Erkennung und die nukleäre Lokalisation des WT1-Moleküls erforderlich (Abb. 1).

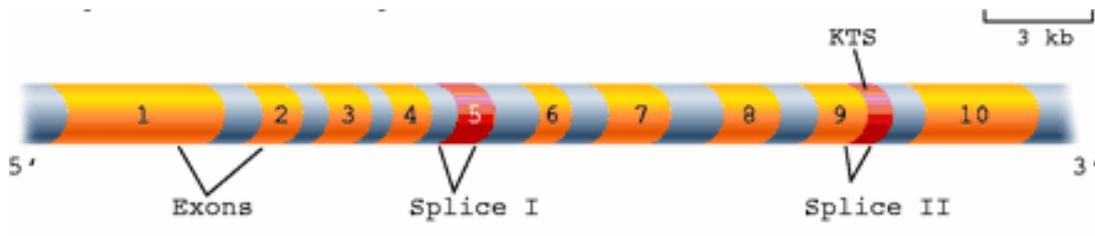
Insgesamt sind über 20 WT1-Proteinisoformen mit molaren Massen zwischen 52 kDa und 62 kDa bekannt. Die verschiedenen WT1-Varianten entstehen durch RNA-Editierung, Proteinsynthese unter Verwendung unterschiedlicher Translationsstartpunkte bzw. alternatives Spleissen (11). Zwei Spleissereignisse sind

von besonderer Bedeutung: Alternatives Spleissen von Exon 5, das 17 Aminosäuren mit N-terminaler Lokalisation relativ zur Zinkfingerdomäne kodiert, sowie die Verwendung zweier unterschiedlicher Spleissdonorstellen am 3'-Ende von Exon 9. Durch alternatives Spleissen von Exon 9 werden drei zusätzliche Aminosäuren (+/- Lysin-Threonin-Serin, +/-KTS) zwischen den dritten und vierten Zinkfinger des WT1-Moleküls eingefügt (12). Die KTS-Spleissinsertion hat eine veränderte DNA-Bindungsspezifität und -affinität des WT1-Moleküls zur Folge (6, 13, 14). Interessanterweise zeigen die WT1(+KTS)-Formen im Unterschied zu den mehr homogen verteilten (-KTS)-Varianten eine „gesprenkelte“ Lokalisation im Zellkern, wo sie mit dem ubiquitären Spleissfaktor U2AF65 kolokalisiert sind (15). Diese und weitere Befunde sprechen dafür, dass die WT1(+KTS)-Formen eher bei der mRNA-Prozessierung als bei der Transkriptionskontrolle eine Rolle spielen (15-18). Die alternative Spleissdonor-Stelle für die (+KTS)-Insertion ist evolutionär hochkonserviert und wird bei allen untersuchten Wirbeltieren gefunden. Das Verhältnis der Expression der (+KTS)- und (-KTS)-Isoformen ist in allen analysierten Geweben konstant. Neuere Befunde dokumentieren, dass transgene Mauslinien mit selektiver Expression entweder der (+KTS)- oder der (-KTS)-Variante Störungen der Nieren- und Gonadenentwicklung aufweisen (19). Dabei zeigten die Defektmutanten deutliche Unterschiede im Phänotyp, so dass aufgrund dieser Resultate auf verschiedene Funktionen der beiden (+KTS)- und (-KTS)-Spleissvarianten geschlossen werden kann (19). Die Bedeutung von alternativ gespleisstem Exon 5, das ausschließlich bei Säugern vorkommt, ist noch unklar (20).

1.3. WT1 in der Embryogenese

Neben seiner Bedeutung in der Pathogenese von Wilmstumoren spielt das *WT1*-Gen eine zentrale Rolle bei der Organentwicklung. Hinweise auf die Relevanz von *WT1* für die Organogenese ergeben sich bereits aus seiner charakteristischen Expression in unterschiedlichen Geweben des embryonalen Organismus. WT1 kommt vor allem in den unreifen Nierenglomeruli und den sich entwickelnden Gonaden vor (22, 23). Weitere Orte der WT1-Expression im Embryo sind mesenchymale Gewebe - z.B. Epikard, Pleura, Peritoneum - sowie Uterus, Milz und umschriebene Regionen im Hirnstamm und Rückenmark (22-25).

A. WT1-Gen



B. WT1-Protein

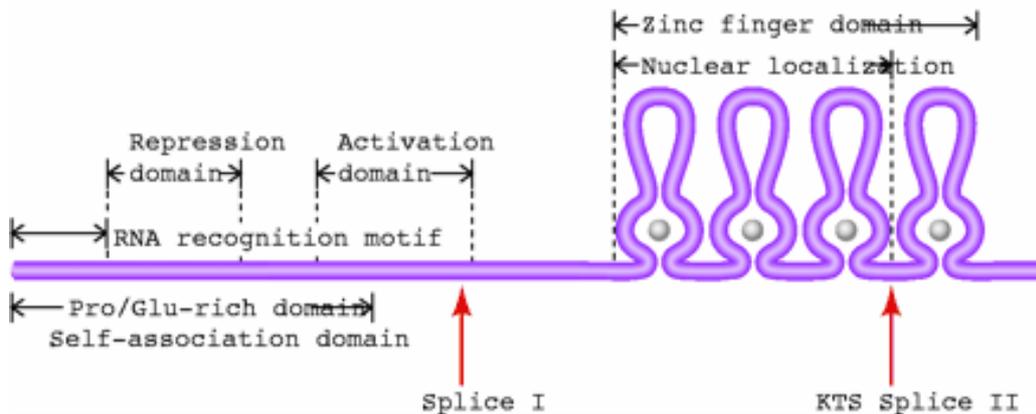


Abb. 1: Organisation des WT1-Genlocus (A) und Grundstruktur des WT1-Proteins (B).

Das WT1 Gen umfasst ca. 50 Kilobasen auf Chromosom 11p13 und besteht aus 10 Exons. Alternativ gespleisstes Exon 5 kodiert 17 Aminosäuren, und der Gebrauch einer alternativen Spleissdonorstelle am Ende von Exon 9 führt zur Insertion von 3 Aminosäuren (Lysin-Threonin-Serin, KTS) zwischen den Zinkfingern 3 und 4 des WT1 Proteins. Während WT1(-KTS) Genprodukte als Transkriptionsregulatoren wirken, spielen die +KTS-Isoformen wahrscheinlich eine noch nicht vollständig geklärte Rolle in der posttranskriptionellen mRNA-Prozessierung. Zusätzliche WT1-Moleküle entstehen durch alternative Translationsstartpunkte, RNA-Edierung und posttranslationale Modifizierung (Abb. nach 21).

Mausembryonen mit homozygot inaktiviertem *Wt1*-Gen (*Wt1*^{-/-}) weisen typische Organdefekte auf, die gut mit der Lokalisation von Wt1 im normalen Embryo korrelieren. Auffallendes Merkmal der *Wt1*^{-/-}-Embryonen, die ab dem 12. Entwicklungstag letal sind, ist die Agenesie von Nieren und Gonaden sowie die gestörte Entwicklung von Milz und Nebennieren (26-29). Neuere Befunde dokumentieren, dass in den *Wt1*-defizienten Embryonen auch die Ausbildung sensorischer Epithelien, z.B. der neuronalen Netzhaut und des Riechepithels, gestört ist (30-32). Weitere Entwicklungsanomalien betreffen das mesotheliale Gewebe, welches in den *Wt1*^{-/-}-Embryonen unvollständig ausgebildet ist (28, 29). Ursache für die intrauterine Letalität der Knockoutembryonen ist vermutlich ein partieller

Epikarddefekt, der eine Störung der normalen Herzmuskelentwicklung mit ausgeprägter ventrikulärer Muskelhypoplasie zur Folge hat (28). Aufgrund des typischen Expressionsmusters in Wildtypen und wegen des charakteristischen Phänotyps der *Wt1*^{-/-}-Embryonen wird vermutet, dass WT1 den Übergang zwischen einem mesenchymalen und epithelialen zellulären Zustand ermöglicht (28).

1.4. *Wt1* und Herzentwicklung

Auffallendes Charakteristikum von Mausembryonen mit inaktiviertem *Wt1*-Gen ist deren extrem dünnes Myokard, welches teilweise nur aus einer einzelnen Zellschicht besteht (26, 28). Weiterhin ist das Epikard der *Wt1*^{-/-}-Embryonen deutlich unterentwickelt und fehlt über weiten Teilen v.a. der kranialen Ventrikel (28). Außerdem wurden subepikardiale und perikardiale Einblutungen beschrieben, welche die kontraktile Insuffizienz des hypoplastischen Myokards zusätzlich verstärken und dadurch das pränatale Absterben der *Wt1*^{-/-}-Embryonen begünstigen.

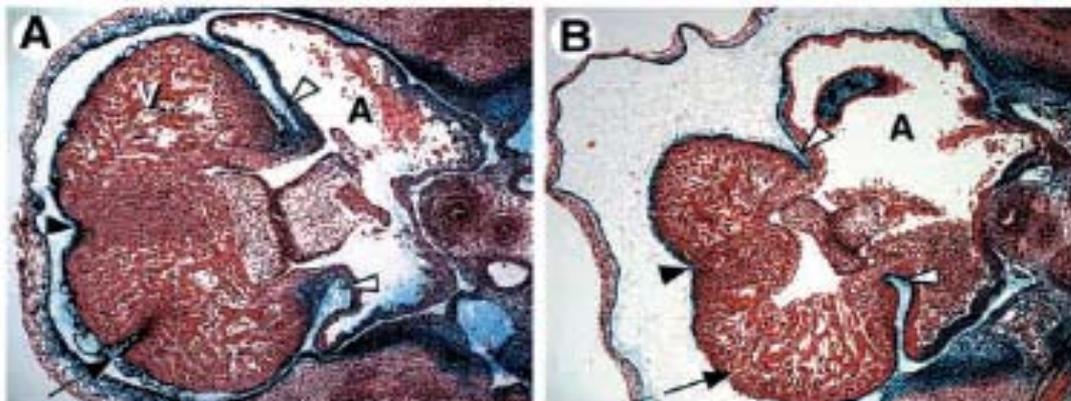


Abb.2. Herzmorphologie eines Mausembryo (E12.5) vom Wildtyp (A) und mit homozygotem *Wt1*-Gendefekt (B) (aus 28)

Beide Embryonen exprimieren einen lacZ Reporter unter der Kontrolle des WT1-Genlocus. Orte der *Wt1*-Expression stellen sich durch Nachweis von β -Galaktosidaseaktivität in blauer Farbe dar.

A: Wildtypembryo mit normal ausgebildetem Ventrikelmuskel (V) und Vorhöfen (A). Das die Herzoberfläche umgebende Epikard ist intakt (Pfeil→).

B: *Wt1*^{-/-}-Embryo mit hypoplastischem Ventrikelmuskel (V). Infolge der myokardialen Hypoplasie ist die Perikardhöhle deutlich erweitert. Das Epikard weist einen partiellen Defekt auf (Pfeil).

Während der Herzentwicklung ist *Wt1* zunächst im proepikardialen Organ, aus dem sich das Epikard differenziert, nachweisbar (28, 33). Später wird *Wt1* in den Epikardzellen exprimiert (28). In den Kardiomyozyten ist *Wt1* zu keinem Zeitpunkt während der Embryonalentwicklung nachweisbar. Folglich beruht die Herzmuskelhypoplasie der *Wt1*^{-/-}-Embryonen eher auf einem gestörten Signaltransfer

zwischen Epikard und Myokard als auf einem zellautonomen Wachstumsdefekt der Kardiomyozyten.

Hinsichtlich der Funktion des Epikards für die normale Herzmuskelentwicklung können folgende zwei Hypothesen formuliert werden:

Zum einen ist denkbar, dass das Epikard durch Sekretion trophischer Faktoren einen wachstumsfördernden Einfluss auf die Kardiomyozyten ausübt. Tatsächlich konnte an in vitro-Präparaten von Hühnerembryonenherzen nachgewiesen werden, dass aus dem Epikard freigesetztes Erythropoietin und Retinolsäure die Proliferation von Kardiomyozyten stimulieren (34). Übereinstimmend zeigten Embryonen mit Inaktivierung der Gene für Erythropoietin (35) bzw. den Retinolsäurerezeptor $RXR\alpha$ (36) eine ausgeprägte Myokardhypoplasie. Folglich scheint WT1 die Synthese trophischer Signalmoleküle im Epikard direkt zu aktivieren, und/oder es ist aufgrund seiner strukturerhaltenden Wirkung am Epikard zur Bildung und Freisetzung proliferationsfördernder Faktoren notwendig.

Eine zweite mögliche Erklärung für den kardialen Phänotyp der $Wt1^{-/-}$ -Embryonen ergibt sich aus der Rolle des Epikards bei der Gefäßbildung im Herzmuskel. Verschiedene Untersuchungen belegen, dass die Koronargefäßzellen (Endothelzellen, glatte Muskelzellen, Fibroblasten) ursprünglich vom Epikard abstammen (37, 38). Im Verlauf der Herzentwicklung lösen sich einzelne Zellen aus dem epikardialen Verband und durchlaufen eine mesenchymale Transformation (39, 40). $Wt1$ -positive mesenchymale Zellen wandern in das Herzmuskelgewebe ein, wo sie Kapillarplexus ausbilden und sich in verschiedene vaskuläre Zelltypen differenzieren (28). Diese Differenzierung der mesenchymalen Zellen ist mit einem Verlust der Expression von WT1 verbunden, das postnatal normalerweise ausschließlich im Epikard (und nicht in den Koronargefäßen) vorkommt (28). Es erscheint daher plausibel, dass WT1 aufgrund seiner Rolle bei der Epikardentwicklung eine zentrale Bedeutung für die Gefäßbildung im Herzmuskel hat. Demzufolge könnte eine noch nachzuweisende Störung der Myokardvaskularisation für die beeinträchtigte Herzmuskelentwicklung von $Wt1^{-/-}$ Embryonen verantwortlich sein. Die Rolle von WT1 im adulten Herzmuskel wurde bislang nicht untersucht.

1.5. Aufgabenstellung

Es war Gegenstand der Arbeit, erstmalig die Regulation und Funktion des Wilmstumor-Transkriptionsfaktors WT1 im adulten Herzmuskel zu analysieren. Insbesondere sollte die Arbeitshypothese überprüft werden, dass WT1 in der Pathogenese der Herzmuskelhypertrophie eine Rolle spielt. Dazu wurde zunächst der zeitliche und regionale Verlauf der Expression von WT1 bei verschiedenen Formen der Herzmuskelhypertrophie und myokardialen Ischämie im Rattenmodell untersucht.

Dieser experimentellen Vorgehensweise liegen folgende Überlegungen zugrunde: Da WT1 für das normale Herzmuskelwachstum während der Embryogenese notwendig ist, könnte bei einer Größenzunahme des adulten Herzens, d.h. im Fall einer Myokardhypertrophie, eine Positivregulation der WT1-Expression erfolgen. Bemerkenswerterweise wurde in verschiedenen Studien eine Aktivierung „fetaler Gene“, u.a. von atrialem natriuretischem Peptid (41), im hypertrophierten Herzmuskel beschrieben. Es gilt deshalb als plausibel, dass die Reaktivierung eines fetalen genetischen Programms, die auch das *WT1*-Gen einschließen könnte, für die Entwicklung einer Myokardhypertrophie bedeutsam ist (42). Durch einen Vergleich des WT1-Expressionsmusters im normalen und hypertrophierten bzw. post-ischämischen Herzmuskelgewebe lassen sich deshalb möglicherweise erste Erkenntnisse über die WT1-Funktion gewinnen.

Die Untersuchungen wurden an folgenden Tiermodellen mit myokardialer Hypertrophie durchgeführt:

1. Spontan hypertensive Ratten (SHR) mit vergrößertem Herzgewicht.
2. Ratten mit aktiviertem kardialem Renin-Angiotensin-System infolge transgener Überexpression der humanen Gene für Angiotensinogen und Renin (43).

Als Kontrollen zu den Versuchsgruppen dienten normale Wistar-Kyoto (WKY)-Ratten ohne Myokardhypertrophie. Weiterhin wurden Ratten zu verschiedenen Zeitpunkten nach induziertem Myokardinfarkt infolge Ligatur der linken Koronararterie analysiert.

Entgegen der ursprünglichen Hypothese ergaben die Untersuchungen keine direkte Korrelation der WT1-Expression mit einem gesteigerten Herzmuskelwachstum (Myokardhypertrophie). Interessanterweise wurde aber im Rahmen der Experimente nach Myokardinfarkt eine *de novo* Expression von WT1 in den Blutgefäßen im Randbereich der Nekrosezone festgestellt.

Aus diesem erstmalig erhobenen Befund ergaben sich folgende weiterführenden Aufgaben: Zunächst stellte sich die Frage nach den ursächlichen Mechanismen für die gesteigerte WT1-Expression im post-ischämischen Herzmuskel. Da regionaler Sauerstoffmangel die unmittelbare Folge einer Gewebeischämie ist, war zu untersuchen, ob es sich bei der ischämiebedingten WT1-Expression im Herzen um die Auswirkungen einer myokardialen Hypoxie handelte. Weiterhin war zu überprüfen, ob Sauerstoffmangel einen generellen Stimulus für WT1 in verschiedenen Geweben darstellt. Zu diesem Zweck wurden Ratten über unterschiedlich lange Zeiträume gegenüber 8% inspiratorischer Sauerstoffkonzentration (normobare Hypoxie) exponiert. Als Vergleichsgruppen dienten Ratten, die bei normalen atmosphärischen Bedingungen (21% O₂) gehalten wurden. Die Expression von WT1 wurde mittels RNase-Protectionassay und Immunhistochemie in den Organen normoxischer und hypoxischer Versuchstiere analysiert. Dabei stellte sich heraus, dass Hypoxieexposition ebenso wie regionale Ischämie eine de novo Expression von WT1 in Herzmuskelgefäßen zur Folge hatte. In einem weiteren Versuchsabschnitt sollte der molekulare Mechanismus für die Stimulation der *WT1* Genexpression unter Sauerstoffmangel analysiert werden. Dabei wurde vor allem die Möglichkeit einer transkriptionellen Aktivierung von *WT1* durch hypoxieinduzierbaren Faktor-1 (HIF-1) überprüft. HIF-1 ist ein heterodimerer Transkriptionsfaktor, der als zentraler molekularer Mediator der Genexpression bei Hypoxie gilt (44). Indirekte Hinweise auf eine mögliche Regulation der WT1-Expression durch HIF-1 ergeben sich aus dem Vorhandensein zweier HIF-1 Konsensuselemente (5'-RCGTG-3') im proximalen *WT1*-Promotor.