

1. Einleitung

1.1 Wilmstumoren: Folge einer gestörten Nierenentwicklung

Entwicklungsvorgänge umfassen u. a. Zellteilung, Musterbildung, Formänderung (Morphogenese), Zelldifferenzierung und Wachstum. Für die Organentwicklung spielt neben der Zellproliferation auch der programmierte Zelltod (Apoptose) eine wichtige Rolle. Störungen in der normalen Kontrolle dieser Prozesse können v. a. bei sich kontinuierlich und schnell teilenden Zellen zu einer inadäquaten Proliferation und dadurch zur Ausbildung von Tumoren führen. Als Paradigma für die Folgen einer gestörten Organentwicklung gelten Wilmstumoren (Hastie, 1994; Rivera & Haber, 2005).

Wilmstumoren (Nephroblastome) sind maligne embryonale Mischtumoren der Nieren, die ca. 7% der soliden Neoplasien des Kindesalters ausmachen und meist vor dem 5. Lebensjahr diagnostiziert werden (Huff, 1998). Sie wurden im Jahre 1899 von Max Wilms beschrieben (Wilms, 1899). Wilmstumoren entstehen vermutlich aus postnatal persistierenden Resten unreifen Nierengewebes (sog. „nephrogenic rests“), in denen anstelle der normalen epithelialen Differenzierung eine unkontrollierte Proliferation mesenchymaler Stammzellen erfolgt (Beckwith et al., 1990; Hastie, 1994). Die Tumoren besitzen zumeist eine triphasische histologische Struktur, die aus undifferenzierten Blastem-, Epithel- und Stromazellen besteht (Beckwith et al., 1990; Hastie, 1994) und Ähnlichkeiten mit der embryonalen Niere aufweist.

Mit einer Inzidenz von 1:10.000 treten Wilmstumoren gewöhnlich sporadisch und unilateral auf, nur in 1-2% der Fälle sind sie familiär bedingt. Bei bestimmten kongenitalen Fehlbildungen findet man eine genetische Prädisposition und somit ein erhöhtes Risiko für Wilmstumoren. Urogenitale Fehlbildungen treten bei ca. 4% der Wilmstumorpationen auf und sind die häufigsten mit Wilmstumoren assoziierten kongenitalen Anomalien (Huff, 1998). Beim sog. WAGR-Syndrom sind Wilmstumoren mit Aniridie, Genitalfehlbildungen und mentaler Retardierung kombiniert (Übersicht in Dome & Coppes, 2002; Huff, 1998; Little & Wells, 1997). Zytogenetische Analysen bei Kindern mit WAGR-Syndrom ergaben Deletionen auf dem kurzen Arm von Chromosom 11 Region p13 (11p13). Mittels positioneller Klonierung wurde 1990 auf 11p13 das Wilmstumorgen *WT1* lokalisiert (Bonetta et al., 1990; Call et al., 1990; Gessler et al., 1990; Haber et al., 1990). Inaktivierende Mutationen im *WT1* Gen sind für 10-15% der sporadischen Wilmstumoren verantwortlich (Huff, 1998; Little & Wells, 1997). Das *WT1* Genprodukt fungiert als Tumorsuppressor. Tumorsuppressoren regulieren das Gleichgewichts zwischen Zellproliferation und Apoptose (sog. Gatekeeper) und sichern die Integrität des

Genoms (sog. Caretaker) (Kinzler & Vogelstein, 1997). Nach dem von Knudson ursprünglich für Netzhauttumoren (Retinoblastome) formulierten „Zwei-Treffer-Konzept“ (Knudson, 1971) ist zur Tumorentstehung die funktionelle Inaktivierung *beider* Allele eines Tumorsuppressorgens erforderlich. Bei sporadischen Tumoren müssen dazu zwei somatische Mutationsereignisse in der gleichen Zelle auftreten. Dagegen gelangt im Falle einer genetischen Prädisposition die erste Mutation bereits über die Keimbahn in alle Körperzellen. Erst nach Inaktivierung des zweiten Tumorsuppressorallels bilden sich Tumoren aus. Die Erfordernis lediglich eines Mutationsereignisses erklärt das frühere Manifestationsalter und die höhere Inzidenz bilateraler und/oder multifokaler Tumoren bei Individuen mit genetischer Prädisposition. Neben dem *WT1* Gen werden mindestens zwei weitere Wilmstumor assoziierte Gene postuliert, deren Identität allerdings bislang noch nicht geklärt werden konnte (Übersicht in Dome & Coppes, 2002; Little & Wells, 1997).

1.2 Struktur und Funktion des *WT1* Gens und seiner kodierten Proteine

Das humane Wilmstumorgen *WT1* auf Chromosom 11p13 erstreckt sich über ca. 50 kb genomischer DNA. Es besteht aus 10 Exons und kodiert ein ca. 3 kb langes mRNA-Transkript (Call et al., 1990; Gessler et al., 1990). Die Aminosäuresequenz von humanem und murinem *WT1* Protein weist über 95% Homologie auf (Buckler et al., 1991).

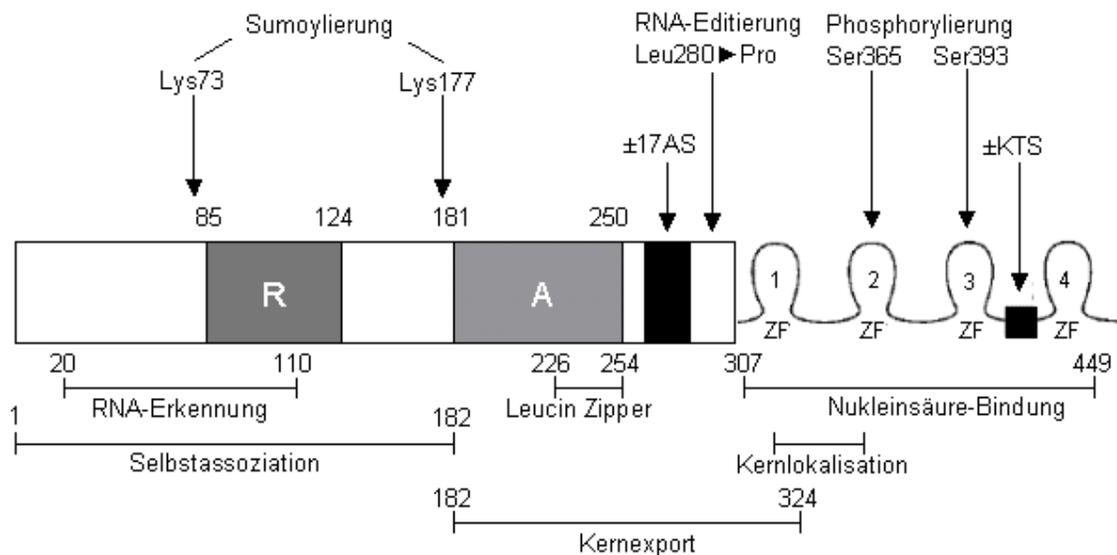


Abb.1: Schematische Darstellung der *WT1* Proteinstruktur (modifiziert nach Mrowka & Schedl, 2000). R, A: Domäne zur transkriptionalen Repression (R) bzw. Aktivierung (A); ZF: Zinkfinger. Einzelheiten s. Text.

Das WT1 Genprodukt besitzt die typische Struktur eines Transkriptionsfaktors. Transkriptionsfaktoren binden mit einer spezifischen DNA-Bindungsdomäne an cis-regulatorische Elemente der DNA (Promotoren, Enhancer, Silencer) und steuern über eine Aktivierungs- und/oder Repressionsdomäne die Transkription nachgeschalteter Gene. Das WT1 Protein enthält in seinem C-Terminus vier Cys₂-His₂ Zinkfinger vom Krüppel-Typ und in seiner N-terminalen Region eine prolin- und glutaminreiche Domäne (Call et al., 1990; Gessler et al., 1990). Die vier Zinkfinger (Aminosäuren (AS) 307-449) können sequenzspezifisch sowohl DNA als auch RNA binden, wobei für die RNA-Bindung vor allem die Zinkfinger 1-3 und für die Bindung von DNA die Zinkfinger 2-4 erforderlich sind (Bardeesy & Pelletier, 1998; Caricasole et al., 1996). In den Zinkfingern 1 und 2 wurden außerdem zwei Kernlokalisationssequenzen identifiziert (Bruening et al., 1996). Konstitutionelle Missense-Mutationen in der WT1 Zinkfingerdomäne sind beim Menschen Ursache des Denys-Drash-Syndroms (Patek et al., 1999; Pelletier et al., 1991a), das sich klinisch mit einer Sklerose der Nierenglomeruli, Wilmstumor und intersexuellem Genitale manifestiert. Das mutierte WT1 Protein hat möglicherweise eine geringere DNA-Bindungsaffinität und wirkt dominant negativ durch Dimerisierung mit dem Wildtyp-Protein (Little et al., 1993).

In der N-terminalen Region des WT1-Proteins wurden verschiedene funktionelle Domänen charakterisiert: eine Selbstassoziationsdomäne (AS 1-182) (Englert et al., 1995a; Moffett et al., 1995; Reddy et al., 1995a), ein potenzielles RNA-Erkennungsmotiv (AS 20-110) (Kennedy et al., 1996), eine Transkriptionsrepressor- (AS 85-124) und eine Transkriptionsaktivator-domäne (AS 181-250) (Wang et al., 1995b), ferner eine Kernexportsequenz (AS 182-324) (Vajjhala et al., 2003) sowie eine transaktivierende Region (AS 226-254) mit einem potenziellen „Leucine-zipper“-Motiv für Protein-Protein-Interaktionen (Madden et al., 1993).

Die primäre *WT1* mRNA unterliegt einer post-transkriptionalen Modifikation durch alternatives Spleißen. Beim alternativen Spleißen werden zusammen mit den Introns auch ausgewählte Exons ganz oder teilweise entfernt. Bei Vertebraten werden die Exons 5 und 9 des *WT1* Gens alternativ gespleißt (Gessler et al., 1992; Haber et al., 1991). Die *WT1* Spleißvarianten mit Exon 5, das für 17 Aminosäuren (± 17 AS) zwischen dem prolin- und glutaminreichen N-Terminus und der Zinkfingerdomäne kodiert, kommen nur bei Säugetieren vor (Kent et al., 1995). Für die normale Embryonalentwicklung, Reproduktion und Laktation ist Exon 5 zumindest bei der Maus wahrscheinlich entbehrlich, da Mäuse mit gezielter Ablation von Exon 5 weder Phänotypveränderungen noch nachweisbare funktionelle Störungen zeigten (Natoli et al., 2002a). Lag zusätzlich zur Inaktivierung von Exon 5 eine Verkürzungsmutation ähnlich wie beim Denys-

Drash-Syndrom vor, so wurde eine Entwicklungsstörung der Nierenglomeruli beobachtet (Natoli et al., 2000b).

Die 17 AS Spleißinsertion von Exon 5 kann die Transkription supprimieren (Wang et al., 1995a) und bei Interaktion mit dem Protein Par4 auch als autonomer Aktivator der Transkription wirken (Richard et al., 2001).

Bei Verwendung der alternativen Spleiß-Donorstelle in Exon 9 werden die drei Aminosäuren Lysin (K), Threonin (T), Serin (S) zwischen den 3. und 4. Zinkfinger eingefügt (\pm KTS). Die WT1(+KTS) Spleißvarianten, welche die KTS Spleißinsertion enthalten, machen ca. 80%, die für Exon 5 kodierenden Transkripte ca. 60% der gesamten zellulären *WT1* mRNA aus (Haber et al., 1991). Die KTS Isoformen von WT1 werden in den meisten Zellen in einem nahezu konstanten Verhältnis zueinander (+KTS/-KTS 1,1-1,5:1) exprimiert (Haber et al., 1991; Hammes et al., 2001). Dagegen ist das Verhältnis der Spleißvarianten von Exon 5 in Abhängigkeit von Spezies, Zelltyp und Entwicklungsstadium unterschiedlich reguliert (Renshaw et al., 1997). Während der Embryogenese sind beide KTS Spleißvarianten für die normale Entwicklung der Nieren und des Urogenitalsystems erforderlich. Mäuse mit selektiver Expression der WT1(+KTS) oder WT1(-KTS) Isoformen zeigen unterschiedlich schwer ausgeprägte Defekte der männlichen Geschlechtsdeterminierung und der Nierenreifung (Hammes et al., 2001). Störungen des normalerweise konstanten Verhältnisses der KTS Spleißvarianten führen beim Menschen zum Frasier-Syndrom, das durch einen Pseudohermaphroditismus masculinus und eine komplette XY Gonadendysgenese, eine Glomerulosklerose und Tumoren der Gonaden charakterisiert ist. Ihm liegen Punktmutationen in der alternativen Spleißdonor-Stelle von Intron 9 zugrunde, die das KTS Verhältnis zugunsten der -KTS Isoform verschieben (+KTS/-KTS ca. 0,5) (Barboux et al., 1997; Klamt et al., 1998).

Weitere WT1 Isoformen resultieren aus der Verwendung alternativer Startcodons 204 bp stromaufwärts (CUG) und 378 bp stromabwärts (AUG127) vom Haupttranslationsstartcodon (Bruening & Pelletier, 1996; Scharnhorst et al., 1999). Durch post-transkriptionale Editierung der primären mRNA (Austausch von Leucin gegen Prolin im Codon 280) werden weitere WT1 Isoformen erzeugt (Sharma et al., 1994). Auf diese Weise entstehen wenigstens 24 unterschiedliche WT1 Proteinvarianten mit Molekulargewichten zwischen 36 kDa und 62 kDa, wobei die vier alternativen Spleißvarianten von Exon 5 und 9 Molekulargewichte zwischen 52 kDa und 54 kDa aufweisen (Morris et al., 1991). Zusätzliche WT1 Transkripte resultieren aus einem alternativen Exon 1 mit eigener Promotorsequenz (Dallosso et al., 2004). WT1 Proteine werden zudem durch post-translationale Modifikationen in ihren DNA-bindenden und/oder transkriptionsregulatorischen Eigenschaften verändert Zwei Serinreste (Serin-365 und Serin-393)

in den WT1 Zinkfingern 2 und 3 können phosphoryliert (Sakamoto et al., 1997; Ye et al., 1996) und zwei Lysinreste (Lysin-73 und Lysin-177) im N-Terminus von WT1 sumoyliert werden (Smolen et al., 2004).

1.3 Transkriptionale und post-transkriptionale Regulation durch WT1

WT1 bindende Nukleotidsequenzen wurden in den Promotoren zahlreicher Gene identifiziert. WT1-responsive Promotoren enthalten häufig das GC-reiche „early growth response 1“ (EGR 1) Element 5'-GCGGGGGCG-3' (Rauscher et al., 1990). Eine hoch affine WT1 Bindungsstelle (WTE) hat die Sequenz 5'-GCGTGGGAGT-3' (Nakagama et al., 1995). Als weiteres WT1-Bindungselement wurde eine 5'-(TCC)_n-3' Wiederholungssequenz beschrieben (Wang et al., 1993). Die verschiedenen WT1 Proteine binden überlappende DNA-Sequenzen mit unterschiedlicher Affinität und Spezifität (Bickmore et al., 1992; Drummond et al., 1994). WT1(-KTS) Isoformen weisen die höchste DNA-Bindungsaffinität auf und sind als Transkriptionsfaktoren wirksam. WT1(-KTS) regulierte Gene gehören zur Gruppe der Wachstumsfaktoren (z. B. Plättchen-abgeleiteter Wachstumsfaktor (PDGF), Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor II (IGFII), Amphiregulin), Wachstumsfaktor-Rezeptoren (z. B. epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR), Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor I (IGFI) Rezeptor), Transkriptionsfaktoren (z. B. EGR-1, PAX-2), Komponenten der extrazellulären Matrix (z. B. Syndecan), Zelladhäsionsmoleküle (z. B. E-Cadherin) und andere (z. B. p21, Bcl-2, Hsp70) (Übersicht in Lee & Haber, 2001; Scharnhorst et al., 2001). Die meisten postulierten Zielgene wurden in transienten Kotransfektionsexperimenten aufgrund ihrer durch WT1 regulierten Promotoren identifiziert. Eine Kontrolle durch WT1 *in vivo*, und damit eine physiologische Relevanz der Kandidatengene, wurde nur in Einzelfällen nachgewiesen (z. B. Englert et al., 1995b; Lee et al., 1999; Mayo et al., 1999).

Nach transientscher Transfektion von WT1 Expressionplasmiden wurde sowohl eine Hemmung als auch, in selteneren Fällen, eine Aktivierung von Promotor-Reporterkonstrukten berichtet. Die WT1 Wirkung war in diesen Fällen von der Wahl des eingesetzten Expressionsvektors, vom verwendeten Reporterkonstrukt und von der transfizierten Zelllinie abhängig (Reddy et al., 1995b). Die physiologisch relevante Funktion von WT1 scheint in einer Transkriptionsaktivierung zu bestehen. Dafür spricht, dass Wilmstumor assoziierte Punktmutationen im *WT1* Gen zwar dessen transkriptionsaktivierende Wirkung verhinderten, nicht jedoch die Repression vermeintlicher WT1 regulierter Promotoren beeinflussten (English & Licht, 1999). Ferner ergab die Analyse von cDNA Microarrays, dass durch WT1(-KTS) die Expression keines der potenziellen Zielgene gehemmt wurde (Lee et al., 1999). Andererseits wirken die Kofaktoren

BASP1 (Carpenter et al., 2004) und WTIP (Srichai et al., 2004) spezifisch als transkriptionale Ko-Suppressoren von WT1 und sprechen für eine Funktion von WT1 bei der Hemmung der Transkription.

Die transregulatorischen Eigenschaften von WT1 werden durch dessen Interaktion mit anderen Kernproteinen (z. B. p53, Par4) moduliert (Übersicht in Lee & Haber, 2001; Scharnhorst et al., 2001). Die zellspezifische Expression dieser Interaktionspartner ermöglicht eine weitere Kontrolle der Funktion von WT1.

Im Unterschied zur WT1(-KTS) Isoform, die als Transkriptionsfaktor wirksam ist, wird dem WT1(+KTS) Protein eine Rolle bei der RNA-Prozessierung und post-transkriptionalen Genregulation zugeschrieben. Mittels Computer-basierender Strukturanalysen wurde ein potenzielles RNA-Erkennungsmotiv im N-terminalen Bereich von WT1 (AS 20-110) identifiziert (Kennedy et al., 1996). Die hohe RNA-Bindungsaffinität der WT1(+KTS) Isoformen (Caricasole et al., 1996) ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass die KTS Spleißinsertion zwischen dem 3. und 4. Zinkfinger die Bindung des 4. Zinkfingers an sein DNA-Erkennungsmotiv verhindert (Laity et al., 2000a, b). WT1(+KTS) Isoformen befinden sich überwiegend in Zellkernkompartimenten, die mit Spleißvorgängen assoziiert sind („speckles“ und „coiled bodies“) (Larsson et al., 1995). Die WT1(-KTS) Isoformen sind dagegen vornehmlich in subnukleären Domänen zu finden, in denen auch andere Transkriptionsfaktoren, z. B. Sp1, Pax6 und TFIIB, lokalisiert sind (Larsson et al., 1995). Die WT1(+KTS) Isoformen sind mit dem Spleißosomprotein U2AF65 assoziiert (Davies et al., 1998) und lassen sich mit Spleißosomkomponenten kopräzipitieren (Englert et al., 1995a; Ladomery et al., 1999). Sie interagieren mit dem Wilmstumor 1-assoziierten Protein WTAP (Little et al., 2000) und binden *IGF2* mRNA (Caricasole et al., 1996).

1.4 Die Rolle von WT1 in der Entwicklung

Die Assoziation von *WT1* Genmutationen mit urogenitalen Fehlbildungen, z. B. im Rahmen des WAGR-Syndroms, deutet bereits auf eine Rolle von WT1 bei der Ausbildung des Urogenitalsystems hin. Weitere Anhaltspunkte für die Bedeutung von WT1 in der Entwicklung ergeben sich aus seiner charakteristischen Expression in unterschiedlichen Geweben des embryonalen Organismus.

WT1 wird zu verschiedenen Entwicklungszeitpunkten in der embryonalen Niere exprimiert. Bei Säugetieren erfolgt die Ausbildung der Nieren über drei Entwicklungsstufen, die als Pronephros (Vorniere), Mesonephros (Urnieren) und Metanephros (Nachnieren) bezeichnet werden. Während sich Pro- und Mesonephros im Verlauf der Embryogenese wieder zurückbilden, entwickelt sich

die definitive Säugerniere aus dem Metanephros. Für die Entwicklung der Nachniere spielt die reziproke Interaktion zwischen der epithelialen Ureterknospe und dem umgebenden metanephrogenen Mesenchym eine wichtige Rolle (Übersicht in Saxen, 1987). Während der Nephrogenese ist WT1 über der Urogenitalleiste sowie in den Pro- und Mesonephroi nachweisbar. Nach Induktion der Mesenchymzellen durch die einsprossende Ureterknospe wird WT1 im kondensierenden Mesenchym sowie in den Komma- und S-förmigen Körperchen, aus denen die Nierenglomeruli entstehen, exprimiert. Während dieser Entwicklungsphase erfolgt die Umwandlung von Mesenchym in polarisierte Epithelzellen (mesenchymal-epitheliale Transformation). Im weiteren Verlauf der Nierenreifung beschränkt sich die WT1 Expression zunehmend auf die Vorläuferzellen der glomerulären Podozyten, die in der adulten Niere normalerweise als einzige Zellen WT1 enthalten (Armstrong et al., 1992; Buckler et al., 1991; Moore et al., 1998; Mundlos et al., 1993; Pelletier et al., 1991b; Pritchard-Jones et al., 1990; Rackley et al., 1993; Sharma et al., 1992).

Bei Säugetieren gehen neben den Nieren auch die Gonaden aus der Urogenitalleiste hervor. Nach Einwanderung der primordialen Keimzellen in die Genitalleiste wird WT1 in den Gonadensträngen (der indifferenten Gonadenanlage) exprimiert (Armstrong et al., 1992 ; Moore et al., 1998 ; Mundlos et al., 1993; Pelletier et al., 1991b; Pritchard-Jones et al., 1990; Rackley et al., 1993). Nach Geschlechtsdeterminierung erfolgt die WT1 Expression beim männlichen Geschlecht in gonadalen Keimzellen und Spermatogonien (Natoli et al., 2004) sowie den Sertolizellen und Oberflächenepithelzellen des Hodens. Beim weiblichen Geschlecht wurde WT1 in Granulosazellen und Oberflächenepithelien der Ovarien nachgewiesen. WT1 wird auch im embryonalen, adulten und graviden Uterus, dem Eileiter und der Brustdrüse exprimiert (Silberstein et al., 1997; Zhou et al., 1993). Über die Funktion von WT1 an diesen Expressionsstellen ist bislang wenig bekannt.

Weitere typische Expressionsorte von WT1 sind epitheliale Gewebe mesodermalen Ursprungs. WT1 kommt im Mesothel vor, das die Organe der Pleuroperikardial- und Peritonealhöhle umgibt (Armstrong et al., 1992; Park et al., 1993; Pritchard-Jones et al., 1990; Rackley et al., 1993). WT1 Expression wurde auch in der Milz, dem Sklerotom und den Somiten der Bauchwand- und Extremitätenmuskulatur gefunden (Armstrong et al., 1993; Moore et al., 1998; Rackley et al., 1993). CD34⁺ hämatopoetische Knochenmarkstammzellen (Alberta et al., 2003; Baird & Simmons, 1997) sowie hepatische und endotheliale Vorläuferzellen der fetalen Leber (Kanato et al., 2005) exprimieren ebenfalls WT1. Im Septum transversum, aus dem das Epikard und subepikardiale Mesenchym (Moore et al., 1998, 1999) als Ursprung glatter Muskel- und Endothelzellen der Koronargefäße hervorgehen (Perez-Pomares et al., 2002), konnte WT1 auch

nachgewiesen werden. Aufgrund dieses charakteristischen Expressionsmusters im embryonalen Organismus wird vermutet, dass WT1 für den reziproken Übergang zwischen einem mesenchymalen und epithelialen Differenzierungszustand notwendig ist (Moore et al., 1998; Pritchard-Jones et al., 1990).

Die Bedeutung von WT1 für eine normale Embryogenese zeigt sich an Mäusen mit gezielter homozygoter Inaktivierung des *Wt1* Gens. *Wt1*^{-/-} Mutanten weisen Entwicklungsdefekte in denjenigen Geweben und Organen auf, die *Wt1* im Wildtyp-Embryo normalerweise exprimieren. *Wt1*-defiziente Embryonen (*Wt1*^{-/-}) vom Stamm C57BL/6 verstarben während eines frühen Stadiums der Embryonalentwicklung zwischen Tag 13 (E13,5) und 15 (E15,5) (Kreidberg et al., 1993). Durch Rückkreuzung der *Wt1*^{-/-} Mutation in Mäuse vom Stamm MF1×B6 konnte in 16% der Fälle der Zeitpunkt der Letalität bis zur Geburt hinausgezögert werden (Herzer et al., 1999). Folglich scheint der genetische Hintergrund, auf dem die Inaktivierung des *Wt1*-Gens vorgenommen wird, die Penetranz des *Wt1*^{-/-} Phänotyps zu beeinflussen. Ursache für die intrauterine Letalität *Wt1*-defizienter Embryonen ist wahrscheinlich ein partieller Epikarddefekt, der zu einem gestörten Myokardwachstum (myokardiale Hypoplasie) mit resultierender kongestiver Herzinsuffizienz führt (Kreidberg et al., 1993; Moore et al., 1998).

Weitere charakteristische Folgen einer *Wt1* Deletion bei der Maus sind die Aplasie von Nieren, Gonaden (Kreidberg et al., 1993), Nebennieren und Milz (Herzer et al., 1999; Moore et al., 1999). Die Aplasie der Nieren beruht auf dem Ausbleiben der Metanephrogenese, weil das metanephrogene Mesenchym (bis E12) durch Apoptose vollständig untergeht und die Ureterknospe nicht aus dem Urnierengang aussprosst (Donovan et al., 1999; Kreidberg et al., 1993). Diese an Mäusen mit inaktiviertem *Wt1*-Gen erhobenen Befunde konnten unter Anwendung der RNA-Interferenztechnik an Nierenorgankulturen bestätigt und erweitert werden. *In vitro* Hemmung der *Wt1* Expression zum Zeitpunkt E11 resultierte anstelle der normalen epithelialen Differenzierung in einer verstärkten Proliferation von Mesenchymzellen (Davies et al., 2004). Aberrante Zelldifferenzierung, Proliferation und Apoptose sind Kennzeichen der neoplastischen Transformation und stützen somit die Funktion von *Wt1* als Tumorsuppressor.

Zusätzlich zur Störung der Nierenentwicklung ist bei *Wt1*-defizienten Embryonen auch die Ausbildung der Gonaden beeinträchtigt. Das gonadale Primordium wird bei *Wt1*^{-/-} Mäusen zwar angelegt, die weitere Gonadalentwicklung bricht aber zum Zeitpunkt E12 ab (Kreidberg et al., 1993). Die gleichzeitige Aplasie von Gonaden und Nebennieren bei *Wt1*^{-/-} Mäusen erklärt sich möglicherweise dadurch, dass Gonaden und Nebennierenrinde aus einem gemeinsamen adrenogonadalen Primordium hervorgehen (Hatano et al., 1996). Dieser Phänotyp bei *Wt1*^{-/-} Mäusen

ähnelt den Defekten bei Mäusen mit homozygoter Inaktivierung von *Sfl*, denen auch die Gonaden und Nebennieren infolge von Apoptose im adreno-gonadalen Primordium fehlen (Luo et al., 1994). Da *Sfl* durch *Wt1* *in vitro* und *in vivo* aktiviert wird (Wilhelm & Englert, 2002), beruht der gonadale Phänotyp von *Wt1*^{-/-} Mäusen möglicherweise auf dem Fehlen der *Sfl* Expression. *Wt1* ist offenbar auch für das Überleben der Keimzellen und die Spermatogenese erforderlich, da adulte Mäuse mit selektiv verminderter *Wt1* Expression in den Sertolizellen einen apoptotisch bedingten Verlust von Keimzellen aufweisen (Rao et al., 2006).

Wt1^{-/-} Mäuse zeigen darüber hinaus eine unvollständige Entwicklung des Zwerchfells mit nur partieller Trennung von Thorakal- und Abdominalhöhle. Weiterhin wurden Mesotheldefekte als Folge einer fehlenden Expression von *Wt1* beschrieben (Kreidberg et al., 1993). Die Bedeutung von *Wt1* für die Ausbildung des hämatopoetischen Systems wird kontrovers diskutiert und bedarf weiterer Abklärung (Alberta et al., 2003; Dame et al., 2006; King-Underwood et al., 2005).

Um die Mechanismen der Regulation und Expression von *WT1* *in vivo* zu analysieren, wurden transgene Mauslinien unter Verwendung unterschiedlich langer Bereiche aus dem humanen *WT1* Gen hergestellt. Die transgenen *WT1*-Konstrukte wurden als künstliche Hefechromosomen (yeast artificial chromosome, YAC) in *Wt1* heterozygoten (*Wt1*^{+/-}) Mäusen exprimiert und auf einen *Wt1*^{-/-} Hintergrund gekreuzt (Guo et al., 2002; Moore et al., 1999). Die beiden verwendeten genomischen DNA-Konstrukte enthielten 280 kb (*WT280*) bzw. 470 kb (*WT470*) des humanen *WT1* Gens. Das *WT280* YAC Konstrukt umfasste den gesamten *WT1* Locus (ca. 50 kb) sowie ca. 220 kb upstream und ca. 10 kb downstream regulatorische Sequenzen, das *WT470* YAC Konstrukt enthielt zusätzlich 190 kb downstream Sequenz. Interessant ist die durch YAC transgene *WT280* bzw. *WT470* Expression erzielte *Wt1* Gendosis: *Wt1*^{-/-}; *WT280*^{+/-} transgene Mäuse exprimierten 10% der normalen Wildtyp *Wt1* mRNA, *Wt1*^{-/-}; *WT470*^{+/-} dagegen 62% und *Wt1*^{-/-}; *WT470*^{+/+} 70%. *Wt1*^{+/-} heterozygote Mäuse exprimierten 95% der normalen Wildtyp *Wt1* mRNA (Guo et al., 2002). Die *Wt1*^{-/-}; *WT280*^{+/-} transgenen Mäusen starben innerhalb von 48 h nach der Geburt. Durch transgene Expression von *WT280* YAC konnten die Defekte von *Wt1*^{-/-} Mäusen an Herz und Zwerchfell vollständig, an Nieren, Gonaden und Nebennieren hingegen nur partiell verhindert werden (Moore et al., 1999). Durch das *WT470* YAC Konstrukt wurden die meisten urogenitalen Entwicklungsdefekte des *Wt1*^{-/-} Phänotyps verhindert, allerdings entwickelten die überlebenden Tiere im postnatalen Verlauf eine rasch progrediente Glomerulonephritis (*Wt1*^{-/-}; *WT470*^{+/-}) oder diffuse mesangiale Sklerose (*Wt1*^{-/-}; *WT470*^{+/+}) mit nephrotischem Syndrom (Guo et al., 2002). Diese Befunde dokumentieren, dass unterschiedliche

cis-regulatorische Abschnitte für die gewebetypische Expression von WT1 im Mesothel und Urogenitalsystem verantwortlich sind. Sie zeigen weiterhin, dass WT1 auch nach Abschluss der Entwicklung für die Integrität der Nierenstruktur und -funktion notwendig ist.

1.5 Ziel der Arbeit, Fragestellung

Außer an den bereits genannten Orten wurde Wt1 auch in umschriebenen Bereichen des zentralen Nervensystems nachgewiesen. Zu den Wt1 exprimierenden Strukturen in Gehirn und Rückenmark gehören u. a. die Netzhaut des Auges, Motoneurone und Ependymzellen der Vorderhörner im Rückenmark sowie eine Region im Dach des 4. Hirnventrikels, die der Area postrema zuzuordnen ist (Armstrong et al., 1993; Rackley et al., 1993; Sharma et al., 1992). Die Bedeutung von WT1 für die Entwicklung und Funktion neuroektodermaler Gewebe wurde bislang nicht untersucht. Indirekte Hinweise auf eine mögliche Rolle von Wt1 bei der neuronalen Entwicklung ergeben sich aus dem Nachweis einer gesteigerten *WT1* Expression nach Retinolsäure (Vitamin A) induzierter *in vitro* Differenzierung embryonaler Karzinomzellen (P19) in Glia bzw. neuronale Zellen (Scharnhorst et al., 1997). Interessanterweise sind Wilmstumoren gelegentlich mit Augenanomalien assoziiert. Eine Aniridie, d. h. das kongenitale Fehlen von Teilen oder der gesamten Iris, kommt bei 1-2% der Patienten mit Wilmstumoren vor und ist in manchen Fällen mit einer Hypoplasie des Sehnerven, Katarakt und kongenitalem Glaukom kombiniert (Huff, 1998). In der Normalbevölkerung sind dagegen nur ca. 1:50.000-100.000 Personen von einer Aniridie betroffen. Die Irisdefekte bei Wilmstumorpatienten wurden auf Mutationen im Aniridie-Gen *PAX6* zurückgeführt, das auf dem kurzen Arm von Chromosom 11 (11p13) in Nachbarschaft zu *WT1* lokalisiert ist (Ton et al., 1991). Ob *WT1*-Defekte unabhängig von begleitenden Mutationen im *PAX6* Gen zu retinalen Entwicklungsstörungen führen können, wurde bislang nicht untersucht.

In der vorliegenden Arbeit sollte zunächst untersucht werden, ob WT1 für die Entwicklung der Netzhaut des Auges notwendig ist. Weiterhin sollte analysiert werden, über welche molekularen Signalmechanismen WT1 gegebenenfalls die Entwicklung der neuronalen Retina und die Differenzierung neuronaler Netzhautzellen steuert. Zur Realisierung dieses Forschungsvorhabens wurden folgende Arbeitsschritte durchgeführt:

1. Es wurde die *Wt1* Expression in der Netzhaut von Mausembryonen zu verschiedenen Entwicklungszeitpunkten analysiert.
2. Es erfolgte ein Vergleich der Netzhautmorphologie von Mausembryonen vom Wildtyp (*Wt1^{+/+}*) und mit *Wt1* Gendefekt (*Wt1^{-/-}*). Anhand dieser Experimente sollte überprüft werden, ob *Wt1* für die normale Netzhautentwicklung notwendig ist.
3. Der dem Phänotyp der *Wt1^{-/-}* Retinae zugrunde liegende Zelldefekt (z. B. Störungen der Zellproliferation, Apoptose) wurde untersucht.
4. Es wurde die Expression retinaler Transkriptionsfaktoren in Wildtyp und *Wt1*-defizienten Embryonen verglichen. Mit diesen Untersuchungen sollten mögliche Signalwege von *Wt1* während der neuronalen Netzhautdifferenzierung erkannt und der molekulare Mechanismus in weiterführenden Experimenten analysiert werden.
5. Es wurde der Versuch unternommen, die normale Netzhautmorphologie in *Wt1*-defizienten Mausembryonen durch transgene Expression eines humanen *WT1* Gens wiederherzustellen.