1. Einführung in die Thematik

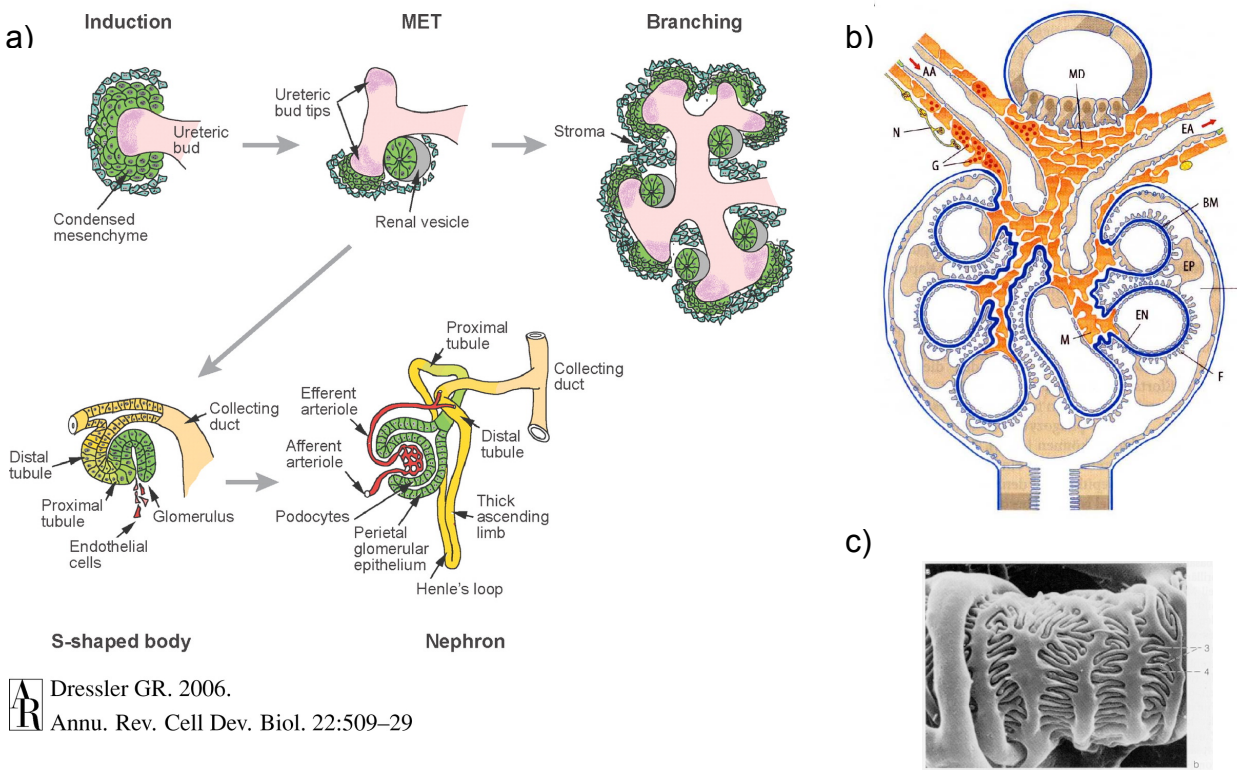
Während der Entwicklung von Nieren und Gonaden, aber auch später bei der Aufrechterhaltung ihrer Funktion, spielt die koordinierte Interaktion zwischen Zellen eine entscheidende Rolle. Diese „Kommunikation" findet nicht nur zwischen gleichen, sondern auch zwischen verschiedenen Zelltypen statt. „Kommunikationsstörungen" können die normale Differenzierung von Zellen beeinträchtigen bis hin zur Entstehung eines Tumors. Die Sprache zu verstehen, derer sich Zellen bedienen, um ihr Dasein im Zellverband zu koordinieren, hilft dabei, molekulare Pathomechanismen einer Erkrankung aufzuschlüsseln. Dies wiederum stellt die Grundlage für das Auffinden neuer und spezifischer therapeutischer Angriffsziele dar.

1.1 Nieren- und Gonadenentwicklung beim Menschen

Das Urogenitalsystem besteht aus den beiden Komponenten, den Harnorganen und dem Genitalsystem. Beide sind embryologisch und anatomisch eng miteinander verflochten und entwickeln sich aus dem intermediären Mesoderm, welches lateral die Urogenitalleiste abfaltet. Der Teil, aus dem die Harnorgane einschließlich dem Wolff-Gang hervorgehen, ist der nephrogene Strang, der Teil, aus dem die Gonaden sowie der Müller-Gang entstehen, ist die Genitalleiste. Dieser Vorgang beinhaltet höchst komplexe Differenzierungsschritte, deren streng kontrollierter Ablauf unabdingbar ist für eine normale Entwicklung. Reguliert wird die Differenzierung über die Expression ganz bestimmter Gene. Zeitlich und zelltypspezifisch kommt es zur Aktivierung oder Hemmung bestimmter Gene, wie z. B. Gene für Transkriptionsfaktoren, Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren. Die enge entwicklungsbiologische Beziehung zwischen Gonaden und Nieren spiegelt sich auch in dem aktiven Gen-Repertoire wider. So wird z.B. in beiden Geweben sowohl während der Entwicklung als auch später im ausdifferenzierten Organ der Transkriptionsfaktor, Wilms-Tumor 1 (WT1), exprimiert.

In Säugern entwickelt sich die definitive Niere (Metanephros) durch die gegenseitige Induktion von Epithel- und Mesenchymzellen (1). Dabei sprosst aus dem Urnierengang (Wolff-Gang) die nach dorsal gerichtete Ureterknospe aus und wächst in den kaudalen Teil des intermediären Mesoderms, das metanephrogene Blastem, ein (siehe Abbildung 1a) (2)). Über komplexe Differenzierungsschritte entstehen die exkretorischen Einheiten der Niere, die sogenannten Nephrone, sowie die Sammelrohre und ableitenden Harnwege. Die Nephrone bestehen aus einem Knäuel an Kapillarschlingen (Glomerulus), der Bowmannschen Kapsel mit ihrem vizeralen und parietalen Blatt und einem Tubulus-System.

Das viszerale Blatt besteht aus hoch spezialisierten Zellen, den Podozyten, welche sich auf die Endothelzellen des Glomerulus legen (Abbildung 1b), c)). Zwischen den Podozyten und den Endothelzellen entsteht dann die von beiden Zelltypen synthetisierte glomeruläre Basalmembran (GBM). Podozyten erinnern mit ihren primären und sekundären Fußfortsätzen an einen Octopus, der mit seinen Fangarmen die Kapillaren umschlingt. Zusammen bilden die Podozytenfußfortsätze, das gefensterte Endothel und die GBM die glomeruläre Filtrationsbarriere. Diese verhindert das Ausschwemmen von Proteinen mit dem Primärharn. Störungen in dieser Barriere führen zu einer Proteinurie.



Dressler GR. 2006.
Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 22:509–29

Abbildung 1: a) Differenzierungsschritte während der Nierenentwicklung: Induktion des metanephrogenen Blastems durch die Ureterknospe und nachfolgende Mesenchym zu Epithel Transformation (MET) und Differenzierung der Nephrone (übernommen aus (3). b) Schematische Darstellung eines Glomerulus mit juxtaglomerulärem Apparat. AA: afferente Arteriole, BM: Basalmembran, EA: efferente Arteriole, EN: gefenstertes Endothel, EP: Podozyten mit Fußfortsätzen (F), G: Granula in glatter Muskulatur, MD: Macula densa, N: symathische Nervenfasern (aus Schmidt, Thews, Lang, *Physiologie des Menschen*, eds., 28. Auflage Springer Berlin, 2000). c) Rasterelektronenmikroskopische Darstellung der primären und sekundären Fußfortsätze von Podozyten (aus Benninghoff, *Anatomie*, Urban & Schwarzenberg Verlag, 1993).

Die Gonadenentwicklung erfolgt im Embryo zunächst bei beiden Geschlechtern bis zum Stadium der indifferenten Gonaden gleich. Die Gonaden werden als Genitalleisten angelegt und differenzieren je nach genetischer Disposition (XX oder XY) in Hoden bzw. Ovar. Auch die Genitalwege (Wolff-Gang und Müller-Gang) werden zunächst bei beiden Geschlechtern angelegt und später unterschiedlich zurückgebildet. Keimzellen wandern in der 6. Woche in die indifferente Gonadenanlage ein. Die Hodenentwicklung ist sehr komplex und vollzieht sich unter dem Einfluss des Transkriptionsfaktors SRY (sex-determining region of the Y chromosome), der wiederum eine Kaskade von Genen aktiviert. Der differenzierte

Hoden enthält die Hodenkanälchen (Tubuli seminiferi), bestehend aus den Sertoli-Zellen und den verschiedenen Keimzell-Stadien (Abbildung 2). Die Sertoli-Zellen sitzen der Basalmembran auf und stützen einerseits die verschiedenen Stadien der Keimzellen und dienen andererseits der Ernährung der reifenden Samenzellen. Sie sind somit maßgeblich an der Spermatogenese beteiligt. Im Interstitium der Tubuli befinden sich die Testosteron synthetisierenden Leydig-Zellen.

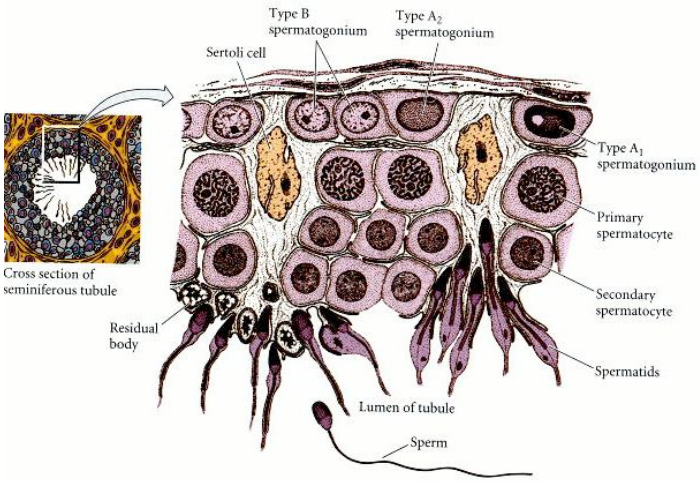


Abbildung 2: Querschnitt eines Hodenkanälchen zur Darstellung der Lage von Sertoli-Zellen und reifenden Samenzellen. Während ihrer Differenzierung wandern Keimzellen Richtung Lumen der Hodenkanälchen (übernommen aus Gilbert, *Developmental Biology*, Eighth Edition, Sinauer Associates, Inc., Publishers, 2006).

1.2 Das Wilms-Tumor 1-Protein

Das Wilms-Tumor 1-Gen (*WT1*) wurde 1990 unabhängig von zwei Gruppen als eines der ersten Tumorsuppressorgene kloniert (4, 5). Hinweise über das Vorhandensein eines Tumorsuppressorgens auf Chromosoms 11p13 lieferten cytogenetisch sichtbare Deletionen in dieser Region bei Patienten mit einem kindlichen Nierentumor (Wilms-Tumor), Aniridie, Genitalfehlbildungen und mentaler Retardierung (WAGR-Syndrom) (6). Das Gen umfasst 10 Exons und kodiert für einen Zinkfinger-Transkriptionsfaktor des Cys_2-His_2-Typs (4, 5). Exons sieben bis zehn kodieren für die vier DNA-bindenden Zinkfinger und Exons eins bis sechs für eine Prolin-Glutamin-reiche Region mit sowohl transkriptionell aktivierender als auch hemmender Domäne (Abbildung 3). Des Weiteren finden sich Motive für Selbst-Assoziierung, Kernlokalisation und RNA-Erkennung. Durch die dualen Bindungseigenschaften an DNA und RNA ist WT1 sowohl transkriptionell als auch vermutlich post-transkriptionell aktiv.

Das Humangenomprojekt identifizierte eine zunächst geringe Anzahl an Genen. Bald zeigte sich jedoch, dass das Vorhandensein von alternativen Protein-Isoformen die Komplexität des Genoms um ein Vielfaches steigert. WT1 ist hier keine Ausnahme. Aus einer Kombination zweier alternativer Spleißstellen, dreier alternativer Translationsstartstellen, RNA-Editings und eines alternativen Promotors resultieren zahlreiche Protein-Isoformen. Am besten charakterisiert ist die Funktion der Haupt-

Isoformen, die sich durch das Vorhandensein oder Fehlen von 17 Aminosäuren (AS) (Splice I) und durch das Fehlen oder Vorhandensein der drei Aminosäuren Lysin (K), Threonin (T) und Serin (S) zwischen Zinkfinger 3 und 4 (Splice II) ergeben (7).

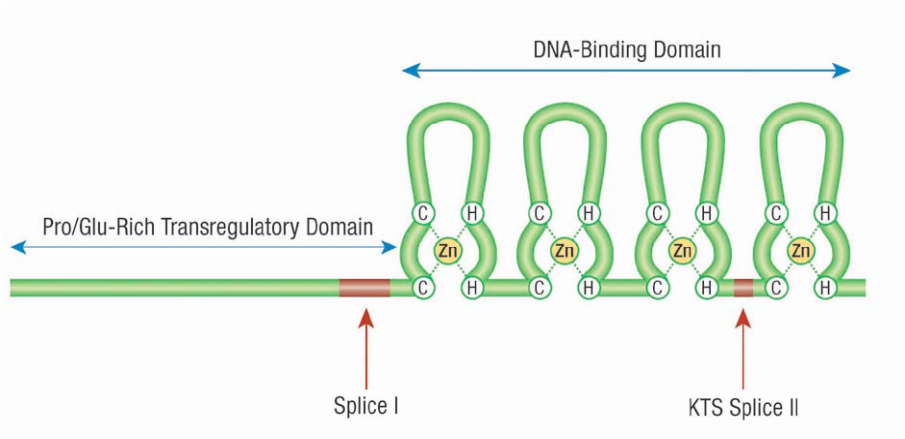


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Zinkfinger-Transkriptionsfaktors WT1. C: Cystein, H: Histidin, Zn: Zink-Ion. Design: Daniel Hartwig, Boston, USA

Computer Modeling und *in vitro*-Studien zeigten, dass die WT1+KTS-Isoformen eine höhere Affinität zu RNA haben als die –KTS-Isoformen (8, 9). Außerdem kolokalisieren die +KTS-Isoformen mit Spleißfaktoren im Kern und binden diese (10-12). Daraus wurde postuliert, dass WT1+KTS im RNA-Metabolismus, möglicherweise im Spleißen, involviert ist. Um die unterschiedlichen Funktionen von WT1 weiter zu spezifizieren, werden nicht nur verschiedene Protein-Isoformen synthetisiert, sondern auch verschiedene Proteinkomplexe gebildet. Je nach zellulärem Kontext interagiert WT1 mit unterschiedlichen Kofaktoren (zusammengefasst in (13)).

Zeitlich und zelltypspezifisch ist die Menge an WT1 genau determiniert. Während der Nieren- und Gonadenentwicklung ist WT1 erstmals im intermediären Mesoderm exprimiert und beschränkt sich später auf die Podozyten der Glomeruli, die Sertoli-Zellen der Hoden und auf die Granulosa-Zellen des Ovars (14). Interessanterweise wird *WT1* während der Entwicklung in Zelltypen exprimiert, die sich im Übergang von Mesenchym (intermediäres Mesoderm) zu Epithel (Podozyten, Sertoli-Zellen, Granulosa-Zellen) befinden. Dass WT1 maßgeblich diesen Prozess induziert, wird durch den Befund unterstützt, dass die Inaktivierung von *Wt1* in Mäusen Apoptose im metanephrogenen Blastem induziert und eine Nierenagenesie zur Folge hat. Daraus kann geschlossen werden, dass WT1 als Überlebensfaktor und Differenzierungsfaktor für das metanephrogene Blastem wichtig ist. Außerdem entwickeln sich die Gonaden *Wt1*-mutierter Mäuse nicht über das Stadium der Genitalleiste hinaus (15).

1.3 *WT1*-assoziierte Erkrankungen beim Menschen

Im Folgenden werden die Erkrankungen beschrieben, welche auf Mutationen im *WT1*-Gen und auf eine funktionelle Inaktivierung des Proteins zurückzuführen sind und Thema der Habilitationsarbeit waren. Nicht eingegangen wird hier auf eine mögliche onkogene Funktion von WT1 bei der Entstehung von Leukämien, Brustkrebs, Hirntumoren, kolorektalem Karzinom und anderen.

Wilms-Tumor

Der Wilms-Tumor (Nephroblastom), benannt nach seinem Erstbeschreiber Max Wilms, ist ein hochmaligner embryonaler Tumor der Niere und gehört zu den häufigsten soliden Tumoren des Kindesalters. Er tritt bei Kindern unter 15 Jahren mit einer Inzidenz von 1:10 000 auf (16). In der Mehrzahl der Fälle tritt der Tumor isoliert, sporadisch und unilateral auf. Familiäre Fälle (2%) und bilaterale Tumoren (5%) findet man dagegen nur sehr selten. Auch das Vorkommen im Kontext mit verschiedenen Syndromen, wie z. B. dem Denys-Drash-Syndrom (siehe unten), dem WAGR Syndrom und dem Beckwith-Wiedemann-Syndrom ist sehr selten. Der Wilms-Tumor ist ein Musterbeispiel dafür, dass weltweit systematisch durchgeführte Studien bemerkenswerte Fortschritte in der Therapie und Prognose erzielt haben und die heutigen 5-Jahres-Überlebensraten bei 80-90% liegen (17). Dies ist auf zwei unterschiedliche Therapiekonzepte zurückzuführen. Bei dem europäischen Konzept (SIOP) erfolgt abhängig vom Alter der Patienten und der Lateralität des Tumors eine präoperative Chemotherapie, operative Entfernung des Tumors, postoperative Chemotherapie und Bestrahlung je nach Tumorhistologie, während die nordamerikanische Studie (NWTS) auf die präoperative Chemotherapie verzichtet (18, 19).

Wilms-Tumoren sind sowohl histologisch als auch genetisch sehr heterogen. Histopathologisch gesehen entsteht der Tumor aufgrund einer Entwicklungsstörung des metanephrogenen Blastems, welches eine Nierenstammzell-Population repräsentiert. Dadurch verbleiben die Zellen in einem frühen Stadium der Differenzierung, proliferieren unangemessen und schalten zum Teil fälschlicherweise alternative Differenzierungsprozesse in Gang, wie z. B. Skelettmuskel-Differenzierung. Auch die Genetik des Wilms-Tumors ist heterogen. So findet man in nur 10-15% aller sporadischer Tumoren Mutationen im Tumorsuppressorgen *WT1* (zusammengefasst in (20)). Dessen funktionelle Inaktivierung ist für die Tumorentstehung erforderlich und erfolgt nach Knudson's „Two Hit"-Hypothese in zwei Schritten (21). Weitere Wilms-Tumor-Gene sind das kürzlich identifizierte *WTX* auf dem X-Chromosom (22), die beiden noch nicht klonierten Gene auf Chromosom 17 und 19, *FWT1* und *FWT2*, für familiäre Tumoren (23) und das bisher noch nicht klonierte *WT2* auf Chromosom 11p15 für Wilms-Tumoren bei Beckwith-Wiedeman-Syndrom .

Denys-Drash-Syndrom

Unter dem Denys-Drash-Syndrom (DDS) fasst man klinisch die Trias Glomerulopathie, männlicher Pseudohermaphroditismus und Wilms-Tumor zusammen (24, 25), wobei diese nicht immer komplett sein muss. Karyotypisch weibliche Patienten haben ein unauffälliges Geschlecht. Das Minimalcharakterstikum des DDS ist eine früh auftretende und rasch progredient verlaufende Glomerulopathie, die vor Vollendung des 3. Lebensjahrs im terminalen Nierenversagen resultiert (26). Histologisch liegt allermeist eine diffuse mesangiale Glomerulosklerose (DMS) vor, die ein steroidresistentes nephrotisches Syndrom mit massiver Proteinurie, Ödeme und Hyperlipoproteinämie verursacht (27).

Das DDS wird durch heterozygote *de novo*-Mutationen im *WT1*-Gen verursacht (28). Diese Keimbahnmutationen betreffen in erster Linie Exon 8 und 9 mit einem Mutations-„Hot spot“ in Exon 9. Im Protein führt dies fast immer zu einem Aminosäureaustausch in den Zinkfingern 3 und 4, wodurch das Protein seine Bindungsfähigkeit an DNA verliert (29) und somit die Transkription seiner Zielgene nicht mehr regulieren kann. Das Vorhandensein von *WT1*-Keimbahnmutationen ist mit einem sehr hohen Risiko (>90%) verbunden, einen Wilms-Tumor zu entwickeln (17).

Frasier-Syndrom

So wie beim Denys-Drash-Syndrom variiert auch beim Frasier-Syndrom die klinische Ausprägung je nach Geschlecht. Während man bei 46,XY-Individuen schwere Formen der Gonadendysgenesie findet, ist die Gonadenentwicklung bei 46,XX-Individuen nicht beeinträchtigt (30). Charakteristisch für beide Geschlechter ist ein steroidresistentes nephrotisches Syndrom mit fokal-segmentaler Glomerulosklerose (FSGS), welche meist erst im frühen Erwachsenenalter zum terminalen Nierenversagen führt. Üblicherweise haben Patienten mit Frasier Syndrom kein erhöhtes Risiko für Wilms-Tumoren, jedoch für Gonadoblastome, eine benigne Vorläuferläsion maligner Keimzelltumoren in dysgenetischen Gonaden.

Genetisch liegt dem Frasier-Syndrom eine heterozygote Keimbahnmutation der Spleißdonor-Stelle im Intron 9 des *WT1*-Gens zugrunde. Dies bewirkt ein verändertes Spleißverhalten mit einer Umkehr der *WT1*-Isoformen +KTS/-KTS von 2:1 nach 1:2 (31, 32) und führt speziell zu einer Verminderung der RNA-bindenden Protein-Isoformen.

1.4 Ziel der eigenen Arbeit

"The amazing thing about mammalian development
is not that it sometimes goes wrong,
but that it ever succeeds"

Veronica van Heyningen (2000)

Die Entwicklung komplexer Organismen ist ein wahres „Meisterwerk" an Präzision. Bedenkt man, dass jede Zelle mit demselben Set an Genen ausgestattet ist, so ist es schier unvorstellbar, dass je nach Zelltyp ein unterschiedliches Repertoire an Genen aktiv ist. Noch komplexer wird das Ganze, wenn man bedenkt, dass Gene nicht einfach nur exprimiert werden oder nicht, sondern dass deren Expressionslevel, letztlich also die Menge an synthetisiertem Protein, genau reguliert wird und Proteine ihrerseits wieder miteinander interagieren. Erst dies garantiert, dass die einzelne Zelle isoliert, aber auch im Zellverband ihre normale Funktion erfüllen kann. Tatsächlich spielt eine geregelte „Kommunikation" innerhalb der Zelle und zwischen Zellen nicht nur bei der Organentwicklung eine wichtige Rolle, sondern auch später bei der Aufrechterhaltung deren Funktion.

Ziel der hier vorgestellten Projekte war es, neue Einblicke in die Wirkungsweise von Mutationen im Wilms-Tumor 1 (*WT1*)-Gen bei der Pathogenese von Nieren- und Gonadenerkrankungen im Menschen zu gewinnen. Dies sollte dem Auffinden neuer Therapie-Angriffsziele dienen und Rückschlüsse auf die Funktion des wildtypischen Proteins bei der Nieren- und Gonadenentwicklung und der Aufrechterhaltung deren Funktion erlauben. Dafür wurden folgende humane Erkrankungen untersucht:

1. Wilms-Tumor: Rolle von WT1 bei der Wilms-Tumor-Pathogenese und Rückschlüsse auf seine Funktion während der frühen Nierenentwicklung

2. Denys-Drash-Syndrom: Rolle von WT1 bei der Pathogenese der Glomerulosklerose und Rückschlüsse auf seine Funktion während der späten Nierenentwicklung (Glomerulogenese)

3. Frasier-Syndrom: Rolle von WT1 bei der Pathogenese der Hodendysgenesie und Rückschlüsse auf seine Funktion während der Hodenentwicklung

2. Ergebnisse und Einordnung in das wissenschaftliche Umfeld

2.1 Untersuchungen zur Rolle von WT1 bei der Wilms-Tumor-Pathogenese und Rückschlüsse auf seine Funktion während der frühen Nierenentwicklung

Wilms-Tumoren stellen bezüglich klinischer und histopathologischer Parameter eine heterogene Tumorentität dar. Die bisher durchgeführten interdisziplinären Behandlungsstudien konnten einerseits durch Therapieintensivierung die Prognose verbessern und andererseits durch risikoadaptierte Therapiereduktion die Therapienebenwirkungen reduzieren. Das Bestreben der künftigen Therapiestudien ist eine individuellere Stratifizierung der Patienten in unterschiedliche prognostische Gruppen und eine weitere Optimierung einer am Erkrankungsrisiko adaptierten Therapie. Da die histologische Variationsbreite der Tumoren sehr groß ist, ist die diagnostische Einordnung und die Erkennung des biologischen Verhaltens dieser Tumoren teilweise erschwert. Aus diesem Grund ist es von großem Interesse, neue Klassifikationsmarker zu finden. Wegen ihrer Eindeutigkeit gelten molekulargenetische Marker, wie die An- oder Abwesenheit von Mutationen in einem bestimmten Gen, als besonders geeignet.

Ein Teil der Wilms-Tumoren wird durch Mutationen im Tumorsuppressorgen Wilms-Tumor 1 (*WT1*) verursacht. Es galt hier die Eigenschaften *WT1*-assoziierter Tumoren zu charakterisieren. Im Einzelnen sollte das Tumorspektrum, welches mit *WT1*-Mutationen assoziiert ist, bestimmt und getestet werden, ob Tumoren mit *WT1*-Mutationen bestimmte biologische und klinische Eigenschaften gemeinsam haben und sich in diesen von Tumoren ohne *WT1*-Mutationen unterscheiden. Letztlich sollte damit geprüft werden, ob sich *WT1*-Mutationen als molekulargenetische Marker eignen, einen bestimmten Tumorsubtyp zu identifizieren. Außerdem sollten Tumoren mit *WT1*-Mutationen histopathologisch und immunhistochemisch charakterisiert werden und die Interaktion von WT1 mit anderen Proteinen untersucht werden, um mögliche Rückschlüsse auf die Funktion des wildtypischen WT1-Proteins bei der frühen Nierenentwicklung ziehen zu können.

Wilms-Tumoren mit Mutationen im *WT1-Gen* haben häufig eine stromareiche Histologie und sind oft bilateral

V. Schumacher, S. Schneider, A. Figge, G. Wildhardt, D. Harms, D. Schmidt, A. Weirich, R. Ludwig, B. Royer-Pokora. Correlation of germ-line mutations and two-hit inactivation of the *WT1* gene with Wilms tumors of stromal-predominant histology. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 94: 3972-3977, 1997
V. Schumacher, S. Schuhen, S. Sonner, A. Weirich, I. Leuschner, D. Harms, J. Licht, S. Roberts, B. Royer-Pokora. Two molecular subgroups of Wilms tumors with or without *WT1* mutations. *Clin. Cancer Res.,* 9(6):2005-14, 2003
B. Köhler, **V. Schumacher**, U. Schulte-Overberg, W. Biewald, D. l'Allemand, B. Royer-Pokora, A. Grüters. Bilateral Wilms tumor in a boy with severe hypospadias and cryptorchidism due to a heterozygote mutation in the *WT1* gene. *Pediatr. Res.,* 45: 187- 190, 1999

Zu Beginn der Studie war bekannt, dass 10-15% aller sporadischen Wilms-Tumoren durch Mutationen im *WT1*-Gen verursacht werden. In einem Gesamtkollektiv von 87 Patientenproben, bestehend aus Tumorgewebe und/oder Blut, wurde der *WT1*-Mutationsstatus ermittelt und mit verschiedenen klinischen sowie histopathologischen Parametern korreliert. Das Kollektiv stammte hauptsächlich aus der deutschen SIOP9/GPOH-Studie. Die histologischen Subtypen verteilten sich folgendermaßen: 30% stromareich, 26% Mischtyp, 17% regressiv, 16% blastemreich, 4% epithelreich, zwei Tumoren unbekannter Histologie, vier Tumoren mit Anaplasie. 79 Proben stammten von Patienten mit unilateralen Tumoren und acht von Patienten mit bilateralen Tumoren.

In dieser Studie konnte eine positive Korrelation zwischen dem Vorhandensein einer Mutation im *WT1*-Gen und einer stromareichen Tumorhistologie gefunden werden. Von den insgesamt 22 identifizierten Mutationen/Deletionen waren 16 mit stromareichen, drei mit mischtypischen und eine mit einem blastemreichen Tumor assoziiert. Von zwei Tumoren war die Histologie nicht bekannt. Bis auf zwei Missense-Mutationen handelte es sich sonst immer um Nonsense-Mutationen, die über das ganze Gen verteilt lagen (siehe Abbildung 4; hier nur die Mutationen aus Schumacher et al., 1997 gezeigt).

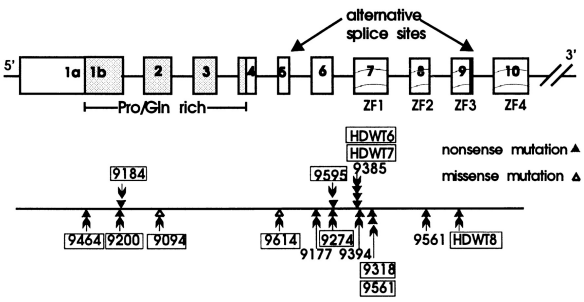


Abbildung 4: Lokalisation der Mutationen im *WT1*-Gen. Mit Boxen markiert sind die Keimbahnmutationen, ohne Boxen somatische Mutationen.

Die drei in die Studie eingeschlossenen Patienten mit WAGR-Syndrom hatten erwartungsgemäß eine Deletion des gesamten *WT1*-Gens.

Von den insgesamt 22 Mutationen lagen unerwartet viele, nämlich 17 (77%), in der Keimbahn vor und nur vier waren somatisch. Von einem Patienten stand für diese Analyse kein Blut zur Verfügung. In 13/22 Fällen war es möglich, Knudson's „Two-Hit"-Hypothese im Tumor zu testen. Bei 62% waren tatsächlich beide *WT1*-Allele inaktiviert.

In unserer Studie war neben einer positiven Korrelation von *WT1*-Mutationen und einer stromareichen Histologie weiterhin aufgefallen, dass der Anteil an bilateralen Tumoren bei Patienten mit einer *WT1*-Keimbahnmutation höher ist als in der Gesamtheit aller Wilms Tumoren. Treten bilaterale Tumoren normalerweise mit einer Häufigkeit von 5% auf, so lag der Prozentsatz bei Patienten mit *WT1*-Keimbahnmutationen bei 37%. Dies wird in einer größer angelegten Studie mit insgesamt 282 Fällen, wovon 117 eine Keimbahnmutation im *WT1*-Gen hatten und 165 keine, bestätigt (33). Auch hier hatten 38% aller Patienten mit *WT1*-Keimbahnmutationen einen bilateralen Tumor entwickelt. Interessanterweise zeigte diese Studie, dass sich nicht alle Mutationstypen gleich verhalten. Vor allem Kettenabbruchsmutationen scheinen ein besonders hohes Potential für die Entstehung bilateraler Tumoren zu haben.

Schlußfolgernd zeigen unsere Ergebnisse, dass sich *WT1*-Mutationen als molekulare Marker eignen, einen bestimmten Tumorsubtyp bezüglich histopathologischer als auch klinischer Eigenschaften zu identifizieren. Die Anwesenheit einer *WT1*-Mutation korreliert mit einer stromareichen Tumor-Histologie. Da speziell diese zu den Tumoren zählen, die zwar eine schlechte Response bezüglich Tumorvolumenreduktion nach präoperativer Chemotherapie aufweisen, aber dennoch eine gute Prognose haben (kein Rezidiv in SIOP9/GPOH-Studie) (34)), sind wir momentan dabei zu testen, ob sich *WT1*-Mutationen generell als zuverlässige molekulare Marker eignen, Tumoren zu identifizieren, die eine schlechte Response auf Chemotherapie zeigen. Bei ihnen könnte dann in Zukunft eine individualisierte Therapieoptimierung erfolgen. Weiterhin konnten wir zeigen, dass Keimbahnmutationen im *WT1*-Gen einen Risikofaktor für die Genese bilateraler Tumoren darstellen. Demnach sollten diese Patienten in einem verlängerten Nachsorgeprogramm verbleiben. Zusätzlich könnte auch die prä- und postoperative Therapiestrategie dahingehend optimiert werden, die Entstehung von metachronen Tumoren zu verhindern. Letztlich geht es darum auf die biologischen Eigenschaften der *WT1*-mutierten Tumoren gezielte Therapieansätze zu entwickeln.

Multipotente mesenchymale Wilms-Tumor-Zellen mit *WT1*-Mutationen differenzieren fälschlicherweise in Skelettmuskelzellen

V. Schumacher, S. Schuhen, S. Sonner, A. Weirich, I. Leuschner, D. Harms, J. Licht, S. Roberts, B. Royer-Pokora. Two molecular subgroups of Wilms tumors with or without *WT1* mutations. *Clin. Cancer Res.,* 9(6):2005-14, 2003

Wilms-Tumoren imitieren Strukturen der normalen Nierenentwicklung und sind daher histologisch sehr heterogen. Je nachdem, welcher Zelltyp überwiegt, werden sie in epithelreiche, blastemreiche oder stromareiche Tumoren subtypisiert. Überwiegt keiner dieser Zelltypen, so spricht man von dem triphasischen Tumor oder auch Mischtyp. Tumoren ahmen nicht nur die normale Entwicklung nach, sondern schalten auch gelegentlich, im Falle einer stromareichen Histologie, fälschlicherweise alternative mesenchymale Differenzierungswege, wie z. B. Skelettmuskel-, Fett- und Knorpeldifferenzierung, ein. Dies spricht dafür, dass der Tumor aus einer multipotenten mesenchymalen Nierenzellpopulation hervorgeht. Diese alternative Differenzierung wird durch die Behandlung mit Chemotherapeutika noch begünstigt. Im Vergleich zu unbehandelten Tumoren nimmt der Stroma-Anteil einschließlich Skelettmuskelzell-Anteil nach präoperativer Chemotherapie zu (34). Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass einerseits undifferenzierte Blastemzellen für Chemotherapeutika sensitiv sind und absterben, andererseits Stromazellen zu Muskelzellen ausdifferenzieren können und dann resistent gegenüber der eingesetzten Agenzien werden. Tumoren mit massiver Muskelzelldifferenzierung werden als „fetal rhabdomyomatöse“ Tumoren bezeichnet. Sie treten meist sehr früh auf, sind häufig bilateral und sprechen auf Chemotherapie schlecht an.

Unsere vorherigen Ergebnisse haben ergeben, dass Mutationen im *WT1*-Gen vor allem Tumoren mit einem großen Anteil an Stromazellen verursachen und dass Patienten mit Keimbahnmutationen in diesem Gen ein erhöhtes Risiko für bilaterale Tumoren haben (siehe 2.1.1). Außerdem treten Tumoren bei Patienten mit *WT1*-Keimbahnmutationen signifikant früher auf als bei Patienten ohne *WT1*-Keimbahnmutationen (33). Diese klinischen und histopathologischen Eigenschaften ähneln denen „fetal rhabdomyomatöser“ Tumoren sehr. Aus diesem Grund testeten wir, ob Tumoren mit einer Mutation im *WT1*-Gen vermehrt aus Muskelzellen bestehen. Wenn dem so wäre, würde dies darauf hinweisen, dass WT1 normalerweise eine Skelettmuskeldifferenzierung in Nierenstammzellen unterdrückt. Außerdem könnte bei einer positiven Korrelation die Skelettmuskeldifferenzierung in Zukunft einen histopathologischen Marker für die Identifikation von Patienten mit hohem Risiko für bilaterale Tumoren und einem schlechten Ansprechen auf Chemotherapie darstellen.

Wir untersuchten zunächst, ob in Tumoren mit *WT1*-Nonsensmutationen das mutierte Transkript vorhanden ist, und wo das mutierte Protein in der Zelle lokalisiert ist. Es zeigte

sich, dass mutiertes Transkript tatsächlich exprimiert wird und nicht einem „Nonsense mediated decay“ unterliegt, und dass das verkürzte Protein im Cytoplasma statt im Kern lokalisiert ist (siehe Abbildung 5a)). Dieser Befund ist speziell für die Fälle von Bedeutung, bei denen im Tumor kein Verlust der Heterozygotie (LOH) und somit immer noch ein wildtypisches Allel vorliegt. In diesen Fällen könnte eine Dimerisierung von wildtypischem und verkürztem Protein und die Fehllokalisation im Cytoplasma letztlich den gleichen Effekt haben wie ein LOH, nämlich das komplette Fehlen von funktionellem WT1-Protein im Kern.

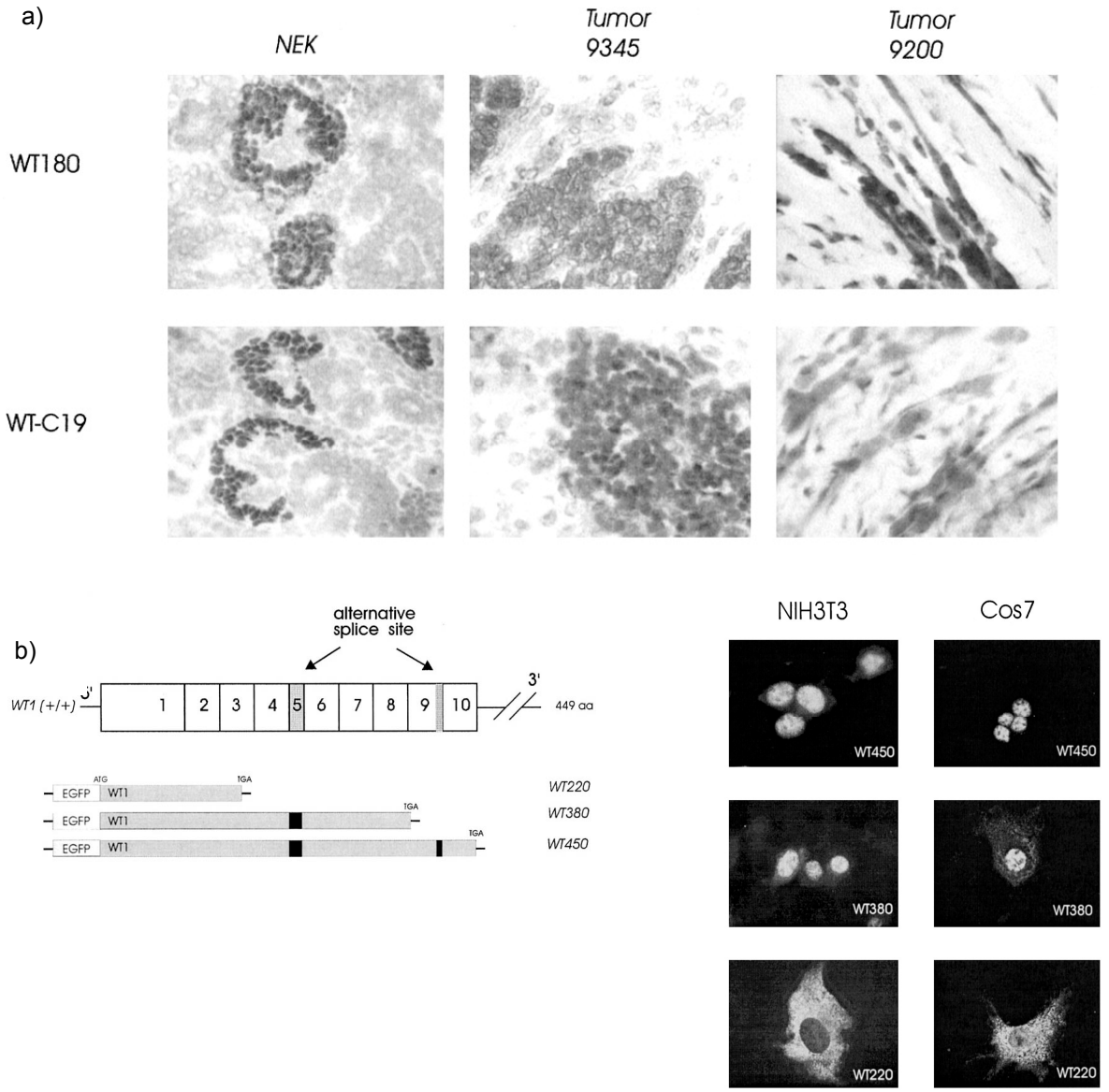


Abbildung 5: Lokalisation von verkürztem WT1-Protein. a) *in vivo* in embryonaler Niere (NEK), einem stromareichen Wilms-Tumor mit *WT1*-Mutation (9200) und einem blastemreichen Tumor ohne *WT1*-Mutation (9345). b) Lokalisation verschieden langer EGFP-WT1 Fusionsproteine in NIH373 und Cos7-Zellen.

Die Fehllokalisation von verkürztem Protein im Cytoplasma wurde *in vitro* bestätigt. Dafür wurden verschiedene EGFP-WT1-Fusionskonstrukte hergestellt und in Cos7 und

NIH3T3-Zellen transfiziert. Wie in Abbildung 5b) zu sehen ist, ist nur das wildtypische WT1-Protein im Kern lokalisiert. Die beiden verkürzten Proteine liegen, je nachdem, wie viel des Carboxy-Terminus deletiert ist, im Kern und Cytoplasma oder ausschließlich im Cytoplasma. Dies hängt davon ab, wie viele der im Carboxy-Terminus lokalisierten Kernlokalisationssequenzen fehlen oder noch vorhanden sind.

Um herauszufinden, welchem Differenzierungsstadium Tumoren mit *WT1*-Mutationen im Vergleich zu solchen ohne Mutationen entsprechen, wurden immunhistochemische Analysen mit verschiedenen Markern durchgeführt (zusammengefasst in Tabelle 1).

	Kidney differentiation markers						Other markers			
	Cytokeratin	Vimentin	Laminin A	Collagen IV	Collagen I	Fibronectin	WT1	Desmin	Sarcomeric actin	Myogenin
The kidney development database (31)										
UMM	−	+	−	−	+	+	+	−	−	−
Early-induced MM	−	+	−	−	+	+	+	−	−	−
Condensed MM	+	Goes	+	+	−	−	+	−	−	−
Stroma	−	+	−	+	?	+	−	−	−	−
Stromal predominant WTs with *WT1* mutations										
9200	−	−	+	+	−	(+)	+	+	+	+
9614	−	−	+	+	−	(+)	+	+	+	+
9177	−	(+)	+	+	−	−	+	+	+	+
9385	−	−	+	+	−	(+)	+	+	+	+
9318	−	−	+	+	−	(+)	+	+	+	+
Blastemal predominant WTs without *WT1* mutations										
9345	(+)	+	+	+	−	(+)	+	−	−	−
9168	−	+	+	+	−	(+)	+	−	−	−
9545	(+)	+	+	+	−	(+)	+	−	−	−
9474	−	+	−	+	(+)	(+)	+	−	−	−
9497	(+)	(+)	+	+	−	(+)	+	−	−	−
9254	(+)	+	+	+	+	(+)	+	−	−	−

Tabelle 1: Zusammenfassung der immunhistochemischen Ergebnisse zur Bestimmung des Differenzierungsgrades von Tumorzellen

Durch die Kombination verschiedener Marker konnte ermittelt werden, dass Tumorzellen mit *WT1*-Mutationen früh induziertem metanephrogenen Blastem entsprechen und fälschlicherweise in Skelettmuskelzellen (positiv für Desmin, Sarcomeric actin und Myogenin) differenzieren.

Zusammengefasst hat diese Studie ergeben, dass Tumoren mit *WT1*-Mutationen keinerlei funktionelles WT1-Protein im Kern enthalten, und dies wiederum metanephrogene Blastemzellen (multipotente Zellen) induziert fälschlicherweise in Skelettmuskelzellen zu differenzieren (Abbildung 6). Im Umkehrschluss kann daraus gefolgert werden, dass WT1 für die frühe Nierenentwicklung bei der Differenzierung von Mesenchym in Epithel notwendig ist. Außerdem legt die positive Korrelation zwischen *WT1*-Mutation und Muskelzelldifferenzierung den Schluss nahe, dass in Zukunft Skelettmuskeldifferenzierung als histopathologischer Marker dienen könnte, um 1. Patienten mit *WT1*-Keimbahnmutationen und somit hohem Risiko für bilaterale Tumoren zu identifizieren, und 2.

um Tumoren zu identifizieren, die auf Chemotherapie schlecht ansprechen (dies wird gerade an einem großen Kollektiv evaluiert).

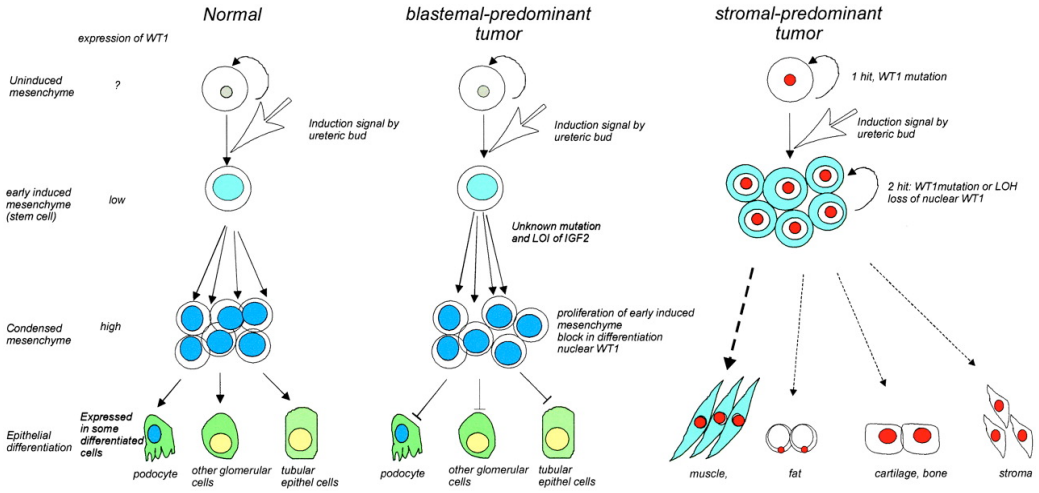


Abbildung 6: Modell für die Entstehung stromareicher Wilms-Tumoren mit *WT1*-Mutationen und blastemreicher Tumoren ohne *WT1*-Mutationen.

Unterschiedliches *WT1*-Mutationsspektrum bei adulten Wilms-Tumoren?

R.U. Trappe, H. Riess, F. Lippek, M. Plotkin, **V. Schumacher**, B. Royer-Pokora, B. Hildebrandt, J. Zuber, M.Y. Mapara, S. Oertel, B. Dorken. Effective Use of High-Dose Chemotherapy and Autologous Stem Cell Rescue for Relapsed Adult Wilms' Tumor and a Novel Alteration in Intron 1 of the WT1 Gene. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.,* 26(12):820-823, 2004

Meistens treten Wilms-Tumoren vor dem 15. Lebensjahr auf (35). Adulte Formen des Wilms-Tumors stellen mit nur 1% aller adulten Nierentumoren eine sehr seltene Entität mit noch unbekannter genetischer Ursache dar. Histologisch präsentieren sich die adulten Tumoren den kindlichen ganz ähnlich und werden in Deutschland entsprechend der Richtlinien der SIOP/GPOH-Studie behandelt.

Wir untersuchten bei einem 47 Jahre alten Patienten mit einem triphasischen Wilms Tumor, ob eine Mutation im *WT1*-Gen an der Genese des Tumors beteiligt gewesen sein könnte. Tatsächlich fanden wir eine heterozygote Keimbahnmutation. Dabei handelte es sich um eine auch in Kindern noch nicht beschriebene Veränderung im Intron 1: IVS1-6 C>A. Aufgrund der Nähe zu der Spleiß-Akzeptor-Stelle wurde unter Zuhilfenahme eines Algorithmus von der University of California, Berkeley, (http//www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html) berechnet, ob sich das Vorhandensein der Mutation auf die Spleiß-Effizienz auswirkt. Im Falle der Mutation nimmt die Effizienz von 0.96 auf 0.77 ab. Dieses Verhältnis entspricht dem der +/-KTS-Isoformen (0.94 vs 0.76). Auf

Proteinebene führt dies bei den +/-KTS-Isoformen zu einem Verhältnis 2:1. Die IVS1-6 C>A Veränderung resultiert demnach möglicherweise durch einen Spleißing-Defekt in einem Verlust von Exon2-haltigen Transkripten. Da in dieser Region die Erkennungssequenzen für die Dimerisierung von WT1 liegen, könnte der Verlust tatsächlich pathologische Konsequenzen haben. Dies wird durch den Befund unterstützt, dass eine etablierte Wilms-Tumor-Zelllinie (RM1) und manche kindliche Wilms-Tumoren Spleißdefekte, die zu dem Verlust von Exon 2 im *WT1*-Transkript und zu einem veränderten Protein führen, als einzige Veränderung aufweisen (36).

Die hier vorgelegten Ergebnisse deuten möglicherweise darauf hin, dass sich das Mutationsspektrum bei adulten Wilms-Tumoren von dem kindlicher Tumoren unterscheidet. Die hier vorgestellte *WT1*-Mutation verhält sich vermutlich auf zellulärer Ebene anders als die bei Kindern häufig beobachteten Nonsense-Mutationen. Dies könnte das späte Manifestationsalter erklären.

Mutationen im Exon 5 des *WT1*-Gens verhindern die Interaktion des WT1-Proteins mit Par4 und unterbinden die Transkriptionsaktivierung durch WT1

DJ. Richard, **V. Schumacher**, B. Royer-Pokora, SG. Roberts. Par4 is a coactivator for a splice isoform-specific transcriptional activation domain in WT1. *Genes Dev.,* 15: 328-339, 2001

Das *WT1*-Gen gehört zu den Genen, bei denen die „Ein Gen-ein Protein"-Hypothese nur bedingt zutrifft. Durch das Vorhandensein zweier alternativer Spleißstellen werden vier funktionell unterschiedliche Haupt-Isoformen synthetisiert. Während über die Funktion der drei Aminosäuren Lysin, Threonin, Serin (KTS) zwischen Zinkfinger 3 und 4 schon Einiges bekannt ist (zusammengefasst in (37)), sind die 17 Aminosäuren (17 AS), die von Exon 5 kodiert werden, funktionell noch wenig charakterisiert. Es gibt Hinweise dafür, dass die 17 AS je nach zellulärem Kontext die WT1-vermittelte Transkription aktivieren oder hemmen (38-40), sowie Zellzyklus und Apoptose regulieren (zusammengefasst in (41)). Die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen sind jedoch bisher noch nicht erforscht.

Ziel der hier vorgestellten Studie war es zu untersuchen, wie die 17 AS und die umliegenden Regionen die transkriptionelle Aktivität von WT1 modulieren. Die Ergebnisse zeigen, dass erst die Anwesenheit der 17 AS für eine maximale transkriptionelle Aktivierung durch WT1 sorgt. Eine in einem Wilms-Tumor gefundene Exon 5 Missense-Mutation (G253A) bewirkt, dass das mutierte Protein im Vergleich zum wildtypischen Protein nicht mehr in der Lage ist, die Transkription *in vitro* zu aktivieren. Diese transkriptionelle

Aktivierung ist abhängig von der Bindung des „prostate apoptosis response factor Par4“ an die 17 AS-Domäne und unterbleibt in der Gegenwart der G253A-Mutation. In der wildtypischen Zelle fungiert Par4 speziell nach Apoptose-Induktion als Koaktivator der WT1+17 AS-Isoformen und verhindert somit Apoptose. Dies unterbleibt ebenfalls im Falle des mutierten WT1-Proteins.

Zusammenfassend geht aus der Studie hervor, dass die Interaktion der 17 AS des WT1-Proteins mit Par4 transkriptionsaktivierend wirkt und das Zell-Wachstum und Überleben unterstützt. Diese Funktion ist vermutlich während der Nierenentwicklung zum Zeitpunkt der Induktion des metanephrogenen Blastems durch die Ureterknospe von großer Bedeutung. Fehlt WT1 in knockout-Mäusen, so wird im metanephrogenen Blastem Apoptose induziert, was zu Nierenaplasie führt. Auf der anderen Seite kann eine Überexpression der WT1+17 AS-Isoformen, wie man sie in einigen Wilms-Tumoren sieht, einen tumorigenen Effekt haben.

2.2 Untersuchungen zur Rolle von WT1 bei der Pathogenese der Glomerulosklerose und Rückschlüsse auf seine Funktion während der späten Nierenentwicklung

Für eine geregelte Nierenfunktion in Säugern bedarf es der koordinierten Differenzierung und Aufrechterhaltung spezifischer Zelltypen innerhalb eines präzisen Netzwerks, um so den Flüssigkeitshaushalt im Körper aufrechtzuerhalten. Verschiedene Tiermodelle und die Identifizierung von Krankheitsgenen für humane Nierenerkrankungen haben in den letzten Jahren erheblich zum Verständnis der molekularen Prozesse während der Nierenentwicklung beigetragen (zusammengefasst in (3)). Neben neu gewonnener Erkenntnisse in der frühen Nierenentwicklung wird momentan vor allem die Entwicklung des Glomerulus (Glomerulogenese) und die Aufrechterhaltung seiner Funktion intensiv erforscht. Dies liegt vor allem daran, dass die Integrität dieser Struktur unabdingbar ist für die Erzeugung einer glomerulären Filtrationsbarriere. Defekte in deren Entwicklung oder später auftretende Läsionen können eine Proteinurie bis hin zum terminalen Nierenversagen verursachen. Dabei scheint speziell die Schädigung von Podozyten eine zentrale Rolle einzunehmen (42). Die Integrität des glomerulären Filters hängt von der korrekten Differenzierung glomerulärer Podozyten und Endothelzellen ab, welche gemeinsam die glomeruläre Basalmembran (GBM) synthetisieren. Die glomeruläre Filtrationsbarriere wird durch das gefensterte Endothel, die GBM und die interdigitierenden Podozytenfußfortsätze mit der dazwischen liegenden Schlitzmembran gebildet (siehe Abbildung 7).

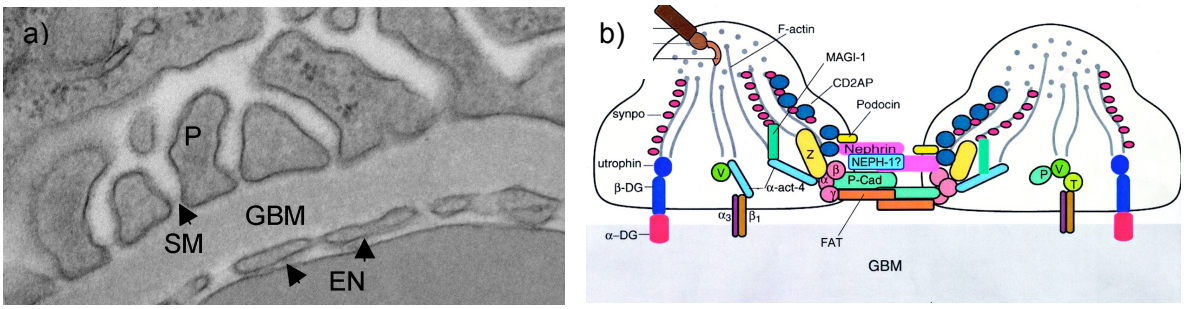


Abbildung 7: a) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Podozytenfußfortsätze (P), des gefensterten Endothels (EN), der glomerulären Basalmembran (GBM) und Markierung, wo sich die Schlitzmembran (SM) befindet, 13 000x. b) schematische Darstellung derselben Strukturen unter Angabe der involvierten Proteine (übernommen aus (43)) .

Im Glomerulus ist die Expression von WT1 auf die Podozyten beschränkt. Sowohl im Mausmodell als auch im Menschen führt der Verlust von funktionellem WT1-Protein in den Podozyten aufgrund einer Glomerulosklerose zu Proteinurie. Im Menschen sind es vor allem Missense-Mutationen in Exon 8 und 9, die zu einer diffusen mesangialen Sklerose mit nephrotischem Syndrom (massive Proteinurie) im Rahmen des Denys-Drash-Syndroms (DDS) führen. Dieses steroidresistente, nicht therapierbare nephrotische Syndrom verläuft rasch progredient und führt meist vor dem 3. Lebensjahr zu terminalem Nierenversagen. Die

molekularen Mechanismen, denen zu Folge eine Mutation im Transkriptionsfaktor WT1 letztlich in terminalem Nierenversagen resultieren, sind weitgehend unerforscht. Gerade aber die Tatsache, dass die Erkrankung nicht konventionell therapierbar ist, sondern der Dialyse oder einer Nierentransplantation bedarf, macht es umso dringlicher, neue Therapiestrategien zu entwickeln. Dafür ist es wichtig, die molekularen Pathomechanismen zu ergründen. Patienten mit Missense-Mutationen im *WT1*-Gen verlieren nicht nur ihre Nierenfunktion, sondern haben zudem ein Risiko von >90%, einen Wilms-Tumor zu entwickeln (17).

Ziel der hier vorgestellten Arbeiten war es, das histpathologische Spektrum früh auftretender nephrotischer Syndrome zu erfassen, welche mit *WT1*-Mutationen assoziiert sind. Dies sollte zur Identifikation von Patienten mit einer therapieresistenten Erkrankung und einem hohen Risiko für Wilms-Tumor führen. Außerdem sollten neue Einblicke in die Wirkungsweise von mutiertem WT1 bei der Pathogenese der Glomerulosklerose gewonnen werden, um mögliche neue therapeutische Angriffsziele zu finden und Rückschlüsse auf die Funktion des wildtypischen WT1-Proteins bei der Glomerulogenese und der Aufrechterhaltung der Nierenfunktion ziehen zu können.

Missense-Mutationen im *WT1*-Gen als Marker zur Identifikation von Patienten mit einem steroidresistenten nephrotischen Syndrom und erhöhtem Wilms-Tumor-Risiko

V. Schumacher, K. Schärer, E. Wühl, H. Altrogge, KE Bonzel, M. Guschmann, J. Neuhaus, RM. Pollastro, E. Kuwertz-Bröking, M. Bulla, AM. Tondera, P. Mundel, U. Helmchen, R. Waldherr, A. Weirich, B. Royer-Pokora. Spectrum of early onset nephrotic syndrome associated with *WT1* missense mutations. *Kidney Int.,* 1594-1600, 1998
M. Guschmann, M. Vogel, **V. Schumacher**, B. Royer-Pokora, H. Neitzel, T. Lennert. Früher neonataler Tod bei Drash-Syndrom. *Monatsschrift Kinderheilkunde* 146: 683-686, 1998
B. Köhler*, **V. Schumacher***, l'Allemand D, Royer-Pokora B, Grüters A. Germline Wilms tumor suppressor gene (*WT1*) mutation leading to isolated genital malformation without Wilms tumor or nephropathy. *J. Pediatr.,* 138: 421-424, 2001. * gleichwertige Erstautorenschaft
P. Kaltenis*, **V. Schumacher***, A. Jankauskienė, A. Laurinavičius, B. Royer-Pokora. Slow progressive FSGS associated with a F392L *WT1*-mutation. *Pediatr. Nephrol.,* 19(3):353-6, 2004. * gleichwertige Erstautorenschaft

Moderne Therapiekonzepte zielen darauf ab, Therapiestrategien zu entwickeln, die möglichst auf den einzelnen Patienten zugeschnitten, d. h. individualisiert sind. Dabei steht eine höchstmögliche Effizienz bei Minimierung der Nebenwirkungen im Vordergrund. Molekulare Marker sollen in Zukunft helfen, Risiken abzuschätzen, Prognosen zu stellen und die bestmögliche Therapie auszuwählen und anzuwenden.

Bestimmte Formen des nephrotischen Syndroms lassen sich mit Corticosteroiden und anderen Immunsuppressiva behandeln, andere sind resistent. Dies hängt davon ab, ob die Ursache immunologischer Natur ist oder auf Mutationen in bestimmten Genen, wie z.B. *WT1*, zurückzuführen ist. Patienten mit Missense-Mutationen im *WT1*-Gen entwickeln im Rahmen des Denys-Drash-Syndroms (DDS) ein steroidresistentes nephrotisches Syndrom, welches früh im terminalen Nierenversagen endet und einer Nierenersatztherapie bedarf. Erfolgt dies nicht, versterben die Kinder, wie der Fall unserer Kasuistik (Guschmann *et al*., 1998).

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit war bekannt, dass DDS-Patienten Missense-Mutationen im *WT1*-Gen haben. Ziel war es nun, auch andere Varianten des kogenitalen/infantilen nephrotischen Syndroms zu identifizieren, welche mit Mutationen im *WT1*-Gen assoziiert sind und folglich nicht mit Steroiden behandelbar sind und ein hohes Risiko für Wilms-Tumor haben. Das Kollektiv umfasste 17 Patienten mit einem kongenitalen/infantilen und steroidresistenten nephrotischen Syndrom. Davon hatten acht ein DDS, vier ein isoliertes nephrotisches Syndrom mit diffuser mesangialer Sklerose und fünf ein isoliertes nephrotisches Syndrom anderer Nierenhistologie. Erwartungsgemäß fand sich bei allen acht DDS-Fällen eine Missense-Mutation in Exon 8 oder 9. Nierenhistologisch lag bei sechs dieser Patienten eine diffuse mesangiale (siehe Abbildung 8) und bei zwei Patienten eine fokal segmentale Glomerulosklerose vor. Von acht Fällen hatten vier einen

Wilms-Tumor entwickelt, zwei waren wegen Ausbleibens einer Nierenersatztherapie sehr früh verstorben, ein Patient wurde zum Zeitpunkt der Nierentransplantation nephrektomiert und ein Patient war zum Zeitpunkt der Arbeit erst etwas älter als drei Jahre. Außerdem fanden sich bei zwei der vier untersuchten Fälle mit isolierter diffuser mesangialer Sklerose ebenfalls Missense-Mutationen in Exon 8 und 9. Dabei handelte es sich um karyotypisch weibliche Patienten. Im Gegensatz dazu fanden sich bei keinem der Patienten mit einem langsam progredient verlaufenden nephrotischen Syndrom und einer anderen Nierenhistologie, wie z.B. mesangioproliferativer Glomerulonephritis oder "minimal change disease", Mutationen im *WT1*-Gen.

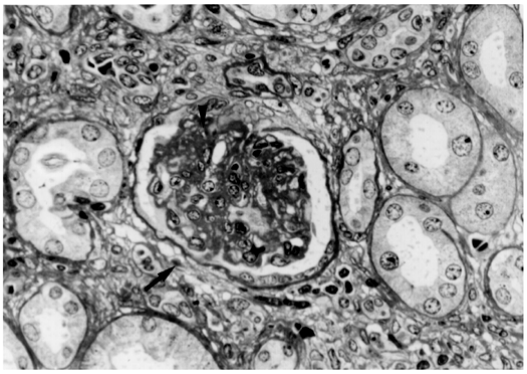


Abbildung 8: Lichtmikroskopische Aufnahme eines Glomerulus mit diffuser mesangialer Sklerose.

Aus dieser Studie kann geschlussfolgert werden, dass Patienten mit einer diffusen mesangialen oder fokal segmentalen Glomerulosklerose und einem kongenitalen/infantilen, rasch progressiven nephrotischen Syndrom wahrscheinlich eine Missense-Mutation im *WT1*-Gen tragen. Diese Patientengruppe sollte immer auf *WT1*-Mutationen untersucht werden, um das Ansprechen auf Immunsuppressiva vorhersagen zu können bzw. eine bereits laufende Behandlung mit Immunsuppressiva bei Nichtansprechen abzubrechen. Wie bereits erwähnt spricht diese Patientengruppe für gewöhnlich nicht an. Etwas anders scheint es sich mit den Fällen einer kongenitalen/infantilen fokal segmentalen Glomerulosklerose mit langsam progredienter Verschlechterung der Nierenfunktion und dem Vorliegen einer *WT1*-Missense-Mutation zu verhalten. Der Fall unserer Kasuistik (Kaltenis und Schumacher *et al*., 2004) und ein Fall aus der Literatur (44) haben beide dieselbe F392L Missense-Mutation in Exon 9. Beide zeigen eine ungewöhnlich langsame Verschlechterung der Nierenfunktion, die sich in unserem Fall unter Cyclosporin A deutlich verbesserte. Ob spezifisch diese Mutation mit einem milden Verlauf und einem Ansprechen auf Immunsuppressiva assoziiert ist, wird die Zukunft zeigen, wenn mehr Fälle mit dieser Mutation beschrieben worden sind.

Das Vorhandensein einer *WT1*-Mutation ist nicht nur mit einem gewöhnlich schlechten Ansprechen auf Immunsuppressiva assoziiert, sondern auch mit einem erhöhten Risiko (>90%) für die Entwicklung von Wilms-Tumoren. Die Penetranz liegt nicht bei 100%, da für die Entstehung des Wilms-Tumors nicht nur eine heterozygote Mutation im *WT1*-Gen

ausreicht, sondern es nach Knudson eines zweiten „Hits“ bedarf. Tatsächlich gibt es Patienten, die zwar eine Keimbahn-Mutation in *WT1* tragen, aber dennoch keinen Wilms-Tumor entwickelt haben (siehe der Fall unserer Kasuistik in Köhler und Schumacher *et al.*, 2001). Generell gilt für den Wilms-Tumor wie auch für alle anderen Tumoren, dass die frühstmögliche Erkennung die Heilungschancen erhöht. Aus diesem Grund ist es von größter Bedeutung, Hochrisiko-Patienten durch das Vorliegen einer *WT1*-Mutation zu identifizieren. Haben diese Patienten noch eine Restfunktion der Niere, dann sollten sie einem engmaschigen Tumorscreening unterliegen. Im Falle einer terminalen Niereninsuffizienz sollte zur Tumorprävention eine Nephrektomie in Erwägung gezogen werden.

Beeinträchtigte glomeruläre Differenzierung und gestörter VEGF-Signalweg beim Denys-Drash-Syndrom

V. Schumacher, S. Jeruschke, F. Eitner, Jan Becker, G. Pitschke, Y. Ince, J. Miner, I. Leuschner, R. Engers, A. Schulze Everding, M. Bulla, B. Royer-Pokora. Impaired glomerular maturation and lack of VEGF165b in Denys-Drash Syndrome. *J. Am. Soc. Nephrol.,* 18:719-29, 2007

Missense-Mutationen im *WT1*-Gen verursachen das Denys-Drash-Syndrom, dessen Hauptmerkmal ein kongenitales/infantiles nephrotisches Syndrom ist. Typischerweise verläuft dieses rasch progressiv und endet, aufgrund einer Therapieresistenz gegen Immunsuppressiva, meist vor dem 3. Lebensjahr im terminalen Nierenversagen. Die Patienten können dann nur noch mit einer Nierenersatztherapie in Form von Dialyse oder Nierentransplantation behandelt werden. Demzufolge besteht ein gesteigertes Interesse, neue Angriffsziele für eine Therapie zu finden. Dies jedoch ist ohne die Aufklärung der zugrunde liegenden molekularpathologischen Veränderungen nicht möglich. Obgleich in den letzten Jahren potenzielle WT1-Zielgene durch *in vitro*-Verfahren identifiziert wurden (zusammengefasst in (37)), sind die wenigsten *in vivo* bestätigt, geschweige denn in Zusammenhang mit der Entwicklung einer Glomerulosklerose gebracht worden. Eine morphologische Begutachtung der Glomeruli durch Habib et al. (27) hatte den Befund erbracht, dass die Glomeruli bei DDS in zweifacher Hinsicht einem corticomedullären Gradienten folgen, zum einen bezüglich ihres Differenzierungsstadiums und zum anderen bezüglich des Grades der Glomerulosklerose. Während subcortical gelegene Glomeruli deutlich in ihrer Entwicklung retardiert, aber wenig sklerotisiert sind, weisen die differenzierteren Glomeruli in Richtung Medulla eine fortgeschrittene Glomerulosklerose auf (26, 27).

Mit diesen Vorbefunden galt es nun, diese Entwicklungsstörungen auf molekularer Ebene genauer zu charakterisieren und mögliche Ursachen hierfür zu identifizieren. Unsere Analysen mit verschiedenen molekularen Markern haben ergeben, dass der Reifegrad von Podozyten, Mesangiumzellen und der glomerulären Basalmembran (GBM) einem fetalen Stadium, nämlich dem des “capillary loop”, entspricht. Es zeigte sich, dass DDS-Podozyten dasselbe Isoformen-Verhältnis für *WT1*-Transkripte zeigen wie auch fetale Nieren (siehe Abbildung 9). Hierbei scheint es besonders zum Verlust der Isoform C (-Exon5/+KTS) zugunsten der Isoform D (+Exon5/+KTS) zu kommen.

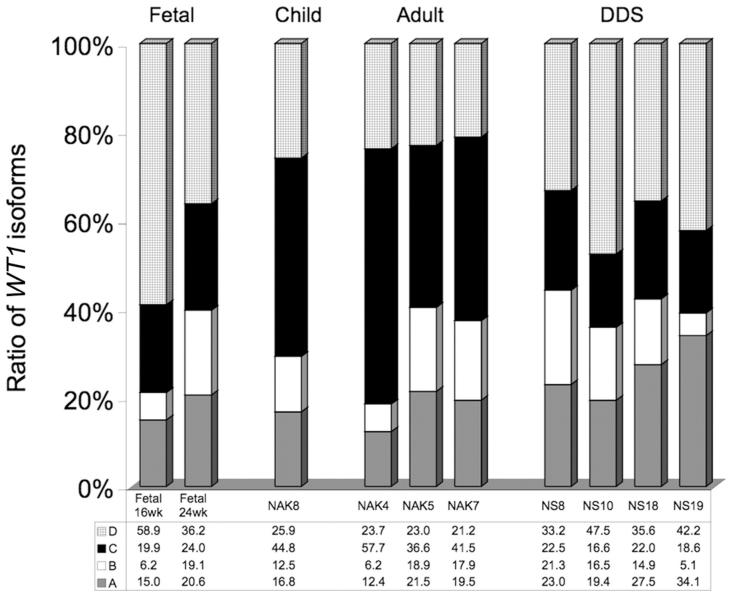


Abbildung 9: Verhältnis der vier Haupt-Isoformen des WT1-Proteins. A: (-17AS/-KTS); B: (+17AS/-KTS); C: (-17AS/+KTS); D: (+17AS/+KTS); wk: Wochen.

Auch der Reifegrad der GBM entspricht dem fetaler Nieren. Der sich während der Entwicklung vollziehende Switch von Collagen 4 α1 zu Collagen 4 α4 und von Laminin ß1 zu Laminin ß2 unterbleibt, sodass es zum Fehlen von Collagen 4 α4 und Laminin ß2 kommt (siehe Abbildung 10). Wie wichtig aber gerade diese beiden Komponenten für eine funktionelle Filtrationsbarriere sind, zeigt sich an zwei Krankheitsbildern, die durch Mutationen in den entsprechenden Genen *Coll4A4* und *LAMB2* verursacht werden. Eine massive Proteinurie wird beim Alport-Syndrom durch *Coll4A4*-Mutationen verursacht (zusammengefasst in (45)). Beim Pierson-Syndrom sowie bei manchen Formen des kongenitalen nephrotischen Syndroms ohne Augenanomalien sind es *LAMB2*-Mutationen, die den Phänotyp verursachen (46, 47).

Abschließend scheinen auch Mesangiumzellen in ihrer Differenzierung gestört zu sein, da sie den fetalen Marker „smooth muscle actin“ exprimieren (siehe Abbildung 10).

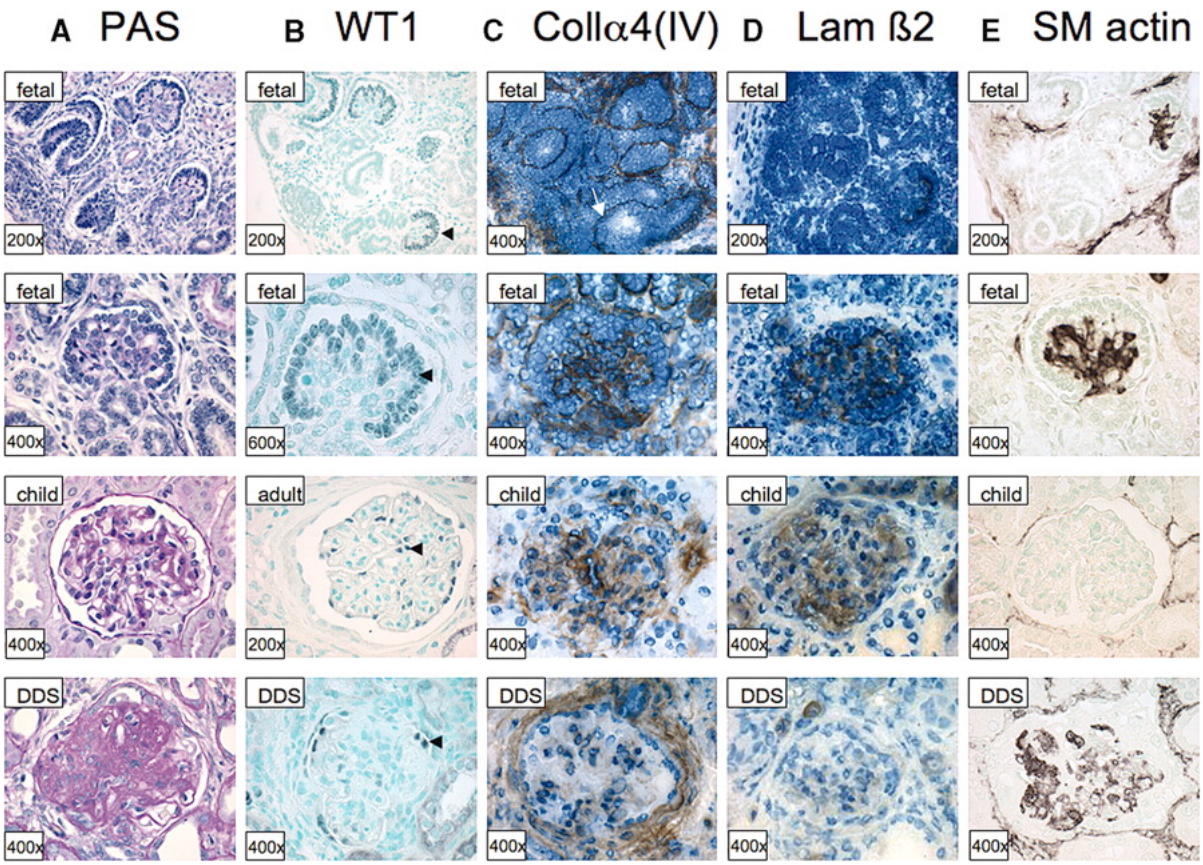


Abbildung 10: Immunhistochemische Analysen an einer fetalen, einer kindlichen und einer DDS-Niere. SM: smooth muscle.

Am Aufbau der GBM sind Podozyten und Endothelzellen gleichermaßen beteiligt. Beide synthetisieren eine Basalmembran, die dann miteinander fusioniert. Der in DDS auftretende GBM-Defekt hängt sehr wahrscheinlich mit einer Differenzierungsstörung der Podozyten zusammen. Inwieweit aber auch die Endothelzelldifferenzierung beeinträchtigt ist, wurde rasterelektronenmikroskopisch evaluiert. Tatsächlich wiesen die Endothelzellen schwerste Anomalien, in Form eines Verlustes der Fenestrierung und einer Endotheliose, auf. Dieser Phänotyp ähnelt sehr stark dem von Patienten mit Präeklampsie (48). Da diese mit einer gestörten VEGF-Signaltransduktion zusammenhängt und konditionale VEGFA-knockout-Mäuse ebenfalls diesen Endothelzell-Phänotyp zeigen (49), testeten wir, ob auch bei dem DDS-Phänotyp VEGFA beteiligt ist. VEGFA wird von Podozyten sezerniert und von Rezeptoren auf Endothelzellen gebunden. In der Tat lag eine Störung im VEGFA-Signalweg vor, die darin bestand, dass die in ausgereiften Podozyten predominierende angiogenetisch inhibierende Isoform, *VEGF165b*, vollständig fehlte (siehe Abbildung 11) und die aktivierende Form überexprimiert wurde.

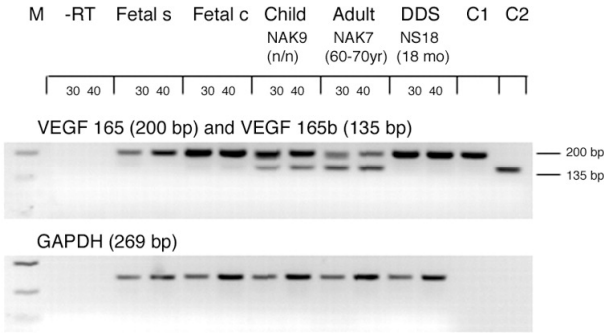


Abbildung 11:
Ergebnis der RT-PCR zur Bestimmung des Verhältnis der *VEGF165* und der *VEGF165b*-Isofromen in fetaler, einer kindlichen, einer adulten und einer DDS-Niere. Aufgetragen ist ein Aliquot aus der Reaktion nach jeweils 30 und 40 Zyklen. C1 und C2: Positivkontrollen; s: "S-shaped body"; c: "capillary loop"; n/n: Alter unbekannt.

Abschließend lässt sich festhalten, dass es sich beim DDS um eine Entwicklungsstörung der Glomeruli handelt, die nicht terminal ausdifferenzieren, sondern vielmehr auf einer Stufe zwischen "S-shape body" und "capillary loop" verbleiben. Verursacht wird dies vermutlich mitunter durch eine "Kommunikationsstörung" zwischen Podozyten und Endothelzellen durch das Fehlen von VEGF165b. Während der normalen Glomerulogenese exprimieren die Podozytenvorläufer des "S-shape body" die angiogenetisch aktivierende VEGF165-Isoform, um Angioblasten anzulocken. Sobald diese sich im "Capillary loop" Stadium zu Kapillaren formieren, findet ein Switch zu der angiogenetisch inhibierenden Isoform VEGF165b statt, was wahrscheinlich für die terminale Differenzierung der Endothelzellen notwendig ist. In einem Feedback-Mechanismus, dessen Mediator noch unbekannt ist, differenzieren dann auch Podozyten terminal aus. Erst die Ausdifferenzierung beider Zelltypen garantiert die Synthese einer reifen GBM. Unterbleibt dieser VEGF165-Isoformen-Switch, so verbleiben Podozyten, Endothelzellen und die GBM in einem unreifen Stadium und sind nicht in der Lage, die glomeruläre Filtrationsbarriere aufzubauen. Dies resultiert dann in einer Proteinurie. Diese neu gewonnenen Einblicke in einen gestörten VEGFA-Signalweg bieten eventuell neue Angriffsziele für eine Therapie.

Extrarenale Manifestation einer *WT1*-Missense-Mutation bei einem Patienten mit Denys-Drash-Syndrom: Hinweis auf eine Podozyten-Neuronen-Verbindung?

V. Schumacher, J. Thumfart, M. Drechsler, M. Essayie, B. Royer-Pokora, U. Querfeld und D Müller: A novel *WT1* missense mutation presenting with Denys-Drash Syndrome and cortical atrophy. *Nephrol. Dial.. Transplant.,* 21:518-521, 2005

Die Tatsache, dass WT1 während der Entwicklung nicht nur im Urogenitalsystem exprimiert wird, sondern unter anderem auch im zentralen Nervensystem (ZNS), lässt die Spekulation zu, dass sich Keimbahn-Mutationen in diesem Gen möglicherweise auch extrarenal manifestieren. Bislang sind in der Literatur nur zwei DDS-Fälle mit assoziierten neurologischen Anomalien beschrieben (Little, 1993). Bei einem Patienten ist eine psychomotorische Retardierung und Cerebellum-Atrophie, beim anderen eine schwere

motorische Retardierung beschrieben. Auch in *Wt1*-knockout Mäusen findet man Defekte im ZNS in Form eines Verlustes retinaler Ganglien und des olfaktorischen Epithels durch Apoptose (50, 51). Eine Beteiligung von WT1 bei der Neuronenentwicklung scheint aus entwicklungsbiologischer Sicht besonders interessant, da viele in Podozyten exprimierte Gene auch in Neuronen zu finden sind. Dies gilt auch für den WT1-Interaktionspartner Par4. Die verblüffende Ähnlichkeit zwischen Podozyten und Neuronen wird vor allem in der Morphologie dieser beiden Zellen mit ihren langen Fußfortsätzen sichtbar (52, 53). Vermutlich liegt diesem Konzept ein ganz ähnliches Repertoire an aktiven Genen zugrunde, wovon eines *WT1* ist.

Wir stellen in unserer Kasuistik einen Patienten mit Denys-Drash-Syndrom und progressiver psychomotorischer Retardierung vor. Computertomographie und Magnetresonanztomographie deckten eine kortikale Atrophie und Verschmälerung des Corpus callosum auf (siehe Abbildung 12).

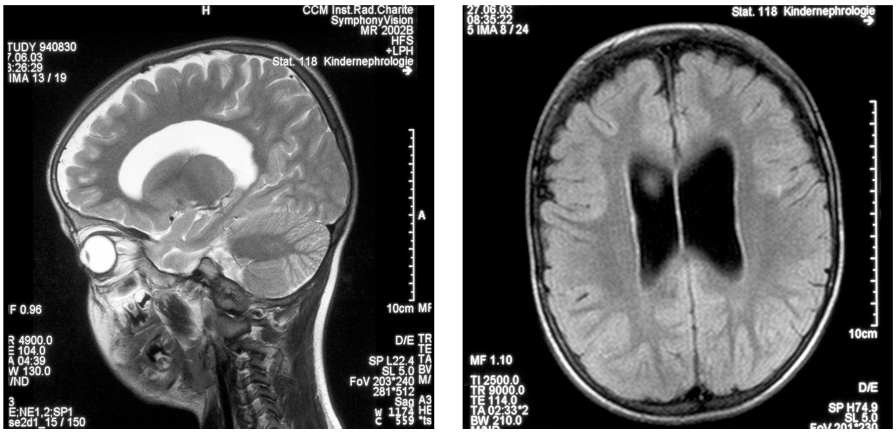


Abbildung 12: Magnetresonanztomographie zur Darstellung der kortikalen Atrophie und Verschmälerung des Corpus callosum im Alter von 5 Jahren.

Eine Mutationsanalyse des *WT1*-Gens erbrachte den Befund einer bisher noch nicht beschriebenen Missense-Mutation in Exon 8, die im Protein zu einem Aminosäureaustausch in Zinkfinger 2 führt (Q369H). Mittels eines Algorithmus (sequNNPREDICT) wurde berechnet, dass das Vorhandensein dieser Mutation die Sekundärstruktur von WT1 verändert, und dass dies dann vermutlich Konsequenzen auf sein Bindungsverhalten an DNA hat. Aufgrund des komplexen Phänotyps wurde zum Ausschluss weiterer Abberationen eine hoch auflösende Chromosomenanalyse (500 Banden) und ein Screening für submikroskopische Deletionen der WAGR-Region auf Chromosom 11 durchgeführt. Beides war unauffällig.

Diese Daten lassen spekulieren, dass die Cerebellum-Atrophie ein Zeichen einer gestörten neuronalen Entwicklung ist, und dass dies mit einem Funktionsverlust von WT1 zusammenhängt. Diese Hypothese wird durch die Befunde der Wt1-knockout-Maus unterstützt, in welcher bestimmte Neuronen durch Apoptose degenerieren.

2.3 Untersuchungen zur Rolle von WT1 bei der Pathogenese der Hodendysgenesie und Rückschlüsse auf seine Funktion während der Hodenentwicklung

Die Hodenentwicklung beim Menschen ist sehr komplex und unterliegt der strengen Kontrolle vieler Proteine wie z. B. der Transkriptionsfaktoren WT1, SRY und SOX9. Bis zu dem Zeitpunkt, an dem die Expression von SRY zum ersten Mal angeschaltet wird, unterscheidet sich das aktive Gen-Set in der indifferenten Gonade zwischen karyotypisch männlichen und weiblichen Individuen nicht. Der Aktivierung von SRY vom Y-Chromosom folgt in einer Kaskade die Aktivierung anderer Gene (z. B. SOX9), und damit die Differenzierung des Hodens (siehe Abbildung 13). Wie aus zahlreichen Tierexperimenten bekannt, scheinen SRY und SOX9 zur Induktion der Hodendifferenzierung notwendig und ausreichend zu sein. Fehlen diese in einem XY-Individuum, so differenziert die indifferente Gonade in Ovar, und umgekehrt führt deren Expression in einem XX-Individuum zur Differenzierung in Hoden. Auch WT1 ist an der Gonadenentwicklung beteiligt, und Mutationen im *WT1*-Gen sind mit XY Gonadendysgenesien verbunden (zusammengefasst in (54)).

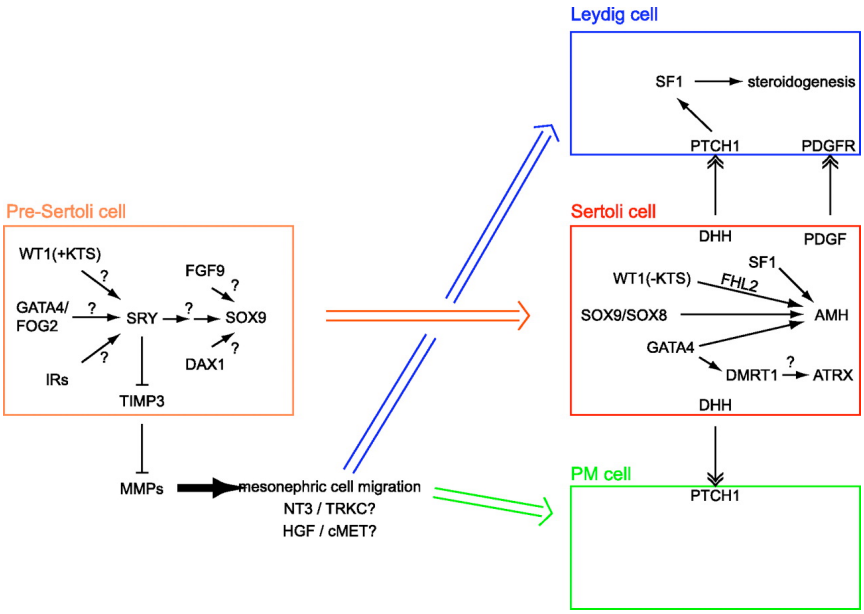


Abbildung 13: Postulierte Interaktionen molekularer Faktoren bei der frühen Hodenentwicklung (übernommen aus (54)).

Alle drei Transkriptionsfaktoren, SRY, SOX9 und WT1 werden während der frühen Hodenentwicklung in Sertoli-Zell-Vorläufern exprimiert. Speziell SOX9 scheint dann auch für die terminale Differenzierung dieser Zellen besonders wichtig zu sein (55), was wiederum für die Reifung anderer Zelltypen im Hoden, wie der Testosteron-produzierenden Leydig-Zellen, notwendig ist. Außerdem sezernieren reife Sertoli-Zellen das „anti-Mullerian hormone“ (AMH), welches die Regression des Müller-Ganges bewirkt. Später unterstützen die Sertoli-

Zellen als Nähr- und Stützzelle die reifenden Keimzellen (56). Somit nehmen sie zwei funktionell unterschiedliche Funktionen ein, nämlich die Hodendifferenzierung zu fördern und die Spermatogenese zu unterstützen. Störungen in der Reifung von Sertoli- und Leydig-Zellen sind vermutlich die Ursache für das „testicular dysgenesis syndrome“ (TDS), welches sich durch einen Spermatogenesearrest, Hodenhochstand, Hypospadien und Keimzelltumoren charakterisiert (57). Obwohl diese Entität histopathologisch gut beschrieben ist, sind die zugrunde liegenden Pathomechanismen weitgehend unbekannt. Vermutet werden sowohl umweltbedingte als auch genetische Faktoren, die eine verzögerte Sertoli- und Leydig-Zell-Reifung verursachen.

Es galt hier die Hypothese zu testen, dass WT1 für die terminale Differenzierung von Sertoli-Zellen notwendig ist und Mutationen im *WT1*-Gen einen TDS-Phänotyp verursachen.

Mutationen im *WT1*-Gen sind mit einer verringerten Expression von *SRY* und *SOX9* und mit Merkmalen des „testicular dysgenesis syndroms“ assoziiert

V. Schumacher, B. Gueler, L. HJ Looijenga, J. Ulrich Becker, K. Amann, R. Engers, J. Doetsch, H. Stoop, W. Schulz, B. Royer-Pokora. Characteristics of Testicular Dysgenesis Syndrome and Decreased Expression of *SRY* and *SOX9* in Frasier Syndrome. *Mol. Reprod. Dev.*, zur Publikation angenommen.

Keimbahnmutationen im *WT1*-Gen führen in 46,XY-Individuen zu unterschiedlich schweren Gonaden- und Genitalfehlbildungen. Interessanterweise scheint der Mutationstyp den Phänotyp zu diktieren. Während Nonsense-Mutationen zu leichten Genitalfehlbildungen wie Hypospadien führen können, sind Missense-Mutationen bei Denys-Drash-Syndrom Patienten mit Gonadendysgenesien unterschiedlichen Schweregrades und meist intersexuellem Genitale assoziiert. Eine komplette XY-Gonadendysgenesie und Sexumkehr wird bei Frasier-Syndrom-Patienten mit einer Spleißdonor-Mutation im Intron 9 beobachtet. Diese bewirkt eine Verminderung der RNA-bindenden WT1+KTS-Isoformen. Speziell Patienten mit Frasier-Syndrom haben ein hohes Risiko, ein Gonadoblastom zu entwickeln (Melo, 2002). Dabei handelt es sich um eine nicht invasive Vorläuferläsion maligner Keimzelltumoren in dysgenetischen Gonaden. Wegen des hohen Risikos für Keimzelltumoren wird fast immer eine prophylaktische Gonadektomie veranlasst.

Wir stellen hier einen Patienten mit einem Frasier-Syndrom und ungewöhnlich milden Genitalfehlbildungen in Form einer Hypospadie vor. Ein ähnlich milder Phänotyp ist bisher nur bei drei weiteren Patienten beschrieben. Wegen eines hypergonadotropen Hypogonadismus wurde zur Induktion sekundärer Geschlechtsmerkmale Testosteron

verabreicht. Im Alter von 15 Jahren wurden per Ultraschall des Hodens bilaterale Mikrokalzifikationen, welche ein Risikofaktor für die Entartung von Keimzellen darstellen, entdeckt. Dies zusammen mit der später identifizierten *WT1*-Spleißmutation (IVS9+5G>A) und dem damit verbundenen hohen Risiko für Gonadoblastome begründete die Durchführung einer bilateralen Orchiektomie. Histopathologisch zeichnete sich das Hodengewebe durch eine Atrophie aus. Im Interstitium befanden sich hyperplastische Leydig-Zellen und Leydig-Zell-Knötchen. Die Hodenkanälchen wiesen eine verdickte Basalmembran, eine diffuse Sertoli-Zell-Vermehrung und einen Spermatogenesearrest, auf der Stufe zwischen Spermatogonien und Spermatozyten, auf. Außerdem gab es Anzeichen für eine Vorläuferläsion von Keimzelltumoren, die fokale unklassifizierte intratubuläre Keimzellneoplasie (ITGCNU), nicht aber für einen malignen Tumor. Beides, die diffuse Sertoli-Zell-Vermehrung und die ITGCNU, wurden immunhistochemisch bestätigt. Als Sertoli-Zell-Marker wurden WT1, Inhibin α und Vimentin eingesetzt (siehe Abbildung 14) und als Marker-Set für die ITGCNU, OCT3/4 („octamer binding protein transcription factor 3/4“), PLAP („placental/germ alkaline phosphatase“), c-KIT („stem cell factor receptor“) und SCF („stem cell factor“).

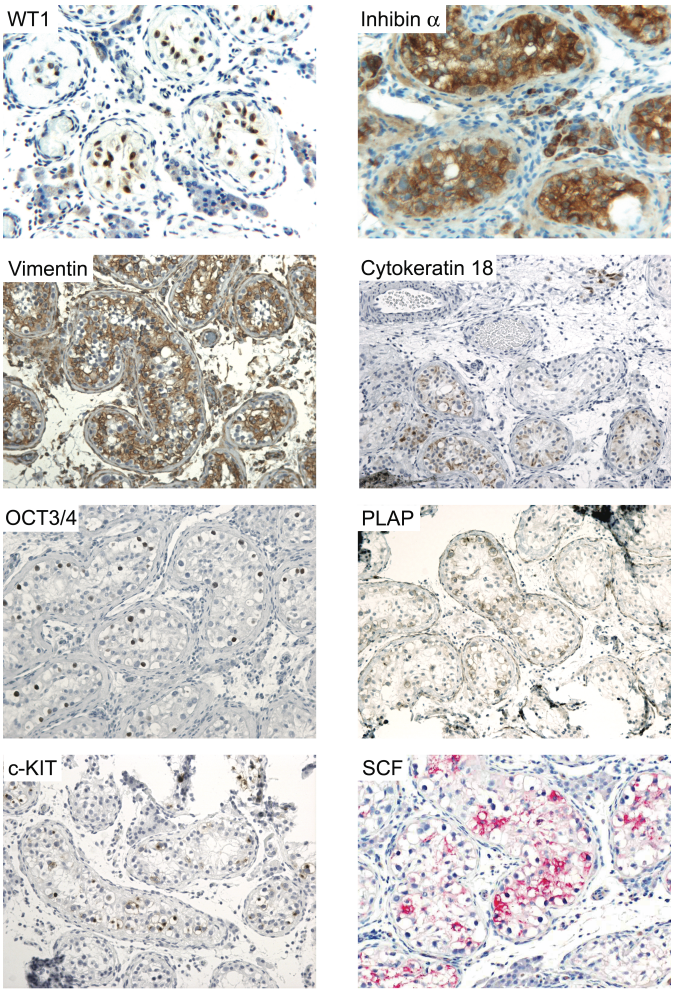


Figure 1

Abbildung 14: Immunhistochemische Charakterisierung der ITGCNU und Sertoli-Zell-Proliferation

Spermatogenesearrest und transformierte Keimzellen sind ein Hinweis für eine beeinträchtigte Funktion von Sertoli-Zellen. Durch Färbung mit Cytokeratin 18 untersuchten wir, ob dies durch eine Differenzierungsstörung verursacht wird. Tatsächlich waren die Sertoli-Zellen in der Umgebung von ITGCNU-Zellen Cytokeratin 18 positiv, was das unreife Stadium der Zellen widerspiegelt. Um der mechanistischen Ursache für die fehlerhafte Differenzierung auf den Grund zu gehen, untersuchten wir die Expression zweier Kandidatengene, *SRY* und *SOX9*. Ihre Expression war in einem Frasier-Maus-Modell, bei dem selektiv die +KTS-Isoformen defizient sind, stark vermindert (58). Auch in einem anderen Maus-Modell, in dem WT1 spezifisch in Sertoli-Zellen reprimiert wurde, zeigte sich eine verminderte *Sox9*-Expression (59). In dem Hodengewebe des untersuchten Patienten konnten wir zunächst die Umkehr der WT1+KTS/-KTS-Isoformen bestätigen und haben dann per Real-time RT-PCR die Expression von *SOX9* und *SRY* untersucht. Wie in Abbildung 15 zu sehen ist, waren beide gegenüber der kindlichen und adulten Kontroll-Hodengewebe vermindert. Unter Berücksichtigung der Sertoli-Zell-Proliferation und Normalisierung auf die WT1-Expression wurde dies noch deutlicher.

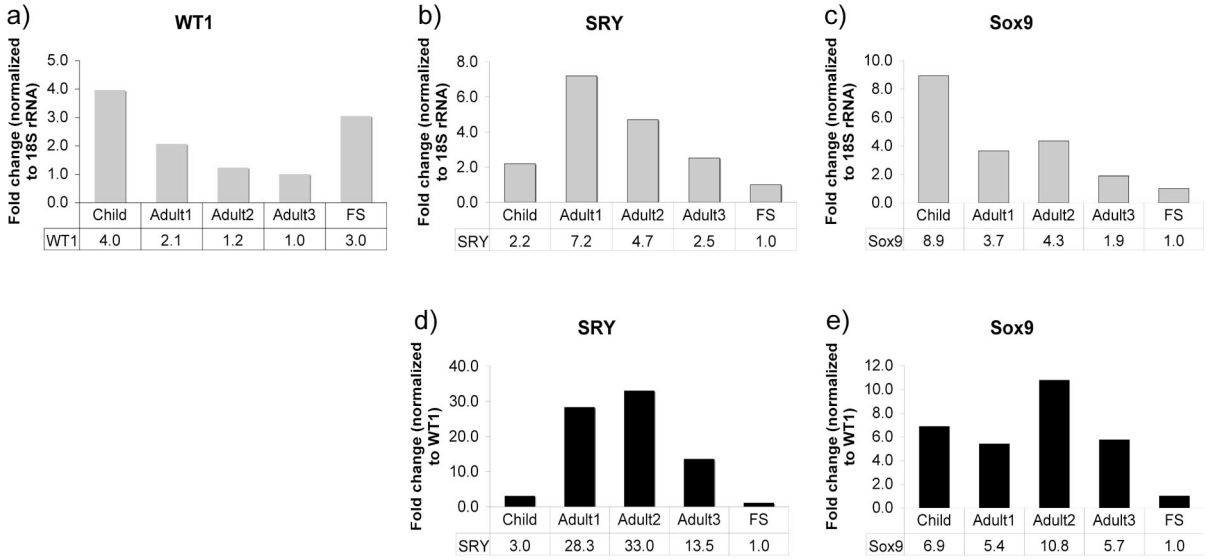


Abbildung 15: Ergebnisse der Real-time RT-PCR für *WT1*, *SOX9* und *SRY*. a), b), c) ist normalisiert auf die 18S rRNA-Menge; D), E) normalisiert auf *WT1*-Mengen.

Um in Zukunft *in vitro* die Rolle von WT1 in der Sertoli-Zell-Differenzierung und Homeostase untersuchen zu können, haben wir aus Hodengewebe des Fraiser-Syndrom-Patienten eine primäre Zelllinie angelegt und charakterisiert. Diese Zelllinie wurde mit dem SV40 „large T-antigen“ immortalisiert. Die Primärzellen sind chromosomal unauffällig und weisen keinerlei Anzeichen einer spontanen Transformation auf. Sie differenzieren nach

mehreren Passagen aus und wachsen nicht im Soft-Agar (siehe Abbildung 16). Auch exprimieren sie Sertoli-Zell-Marker wie *WT1*, *SOX9*, *MIC2*, *AR* (Androgen-Rezeptor) *Inhibin* α und *Vimentin*, sind aber negativ für den Keimzellmarker *VASA*, den Leydig-Zell-Marker *LHR* („luteinizing hormone receptor“) und den peritubulären Myoepithel-Zell-Marker „smooth muscle actin“. Es handelt sich hier um die erste humane Sertoli-Zelllinie.

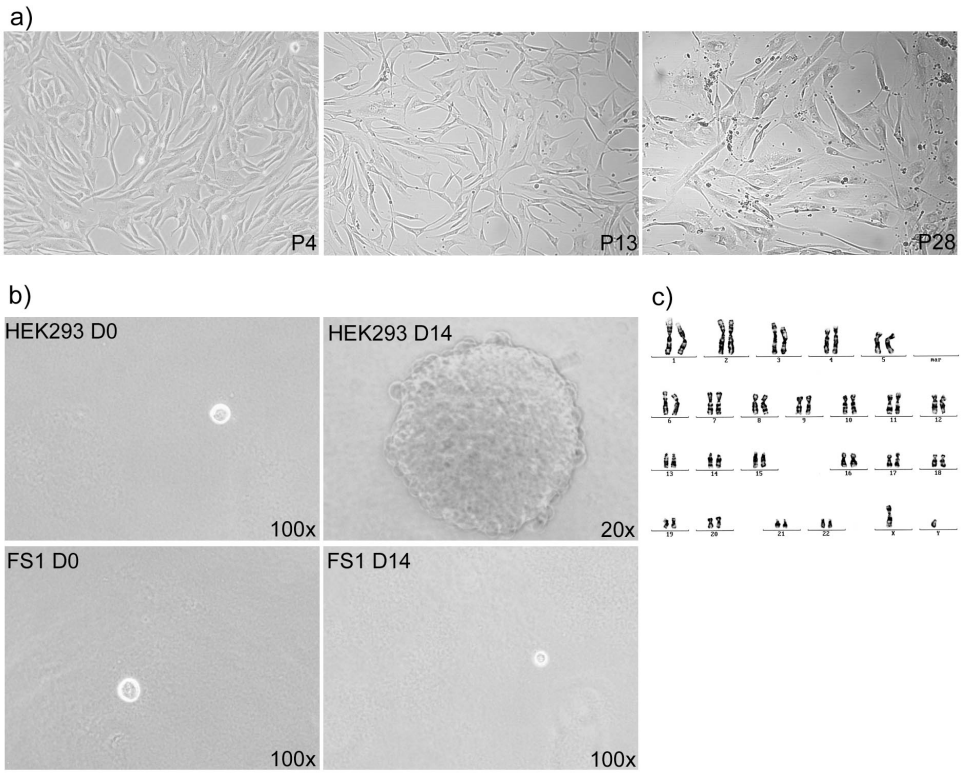


Abbildung 16: Charakterisierung einer primären Zelllinie aus Hodengewebe eines Frasier-Syndrom-Patienten. a) Zellen differenzieren nach einigen Passagen aus und stellen ihr Wachstum ein. b) Sie wachsen nicht in Soft-Agar. c) Zellen sind chromosomal unauffällig.

Zusammengefasst unterstützen unsere Daten im Menschen die Befunde aus den Maus-Experimenten. Die Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass eine Verminderung von WT1+KTS-Isoformen ein „testicular dysgenesis syndrome“ (TDS) verursachen kann. Zeichen dafür sind der Spermatogenesarrest, Hypospadie und die ITGCNU. Dabei sind vermutlich die WT1+KTS-Isoformen an der terminalen Sertoli-Zell-Differenzierung und Homeostase durch die Aufrechterhaltung eines kritischen Levels an SRY und SOX9 beteiligt. Eine verminderte Expression von *WT1+KTS*, *SRY* und *SOX9* beeinträchtigt die Reifung von Sertoli-Zellen und somit auch ihre Fähigkeit, die Keimzelldifferenzierung zu unterstützen. Dies kann dann in einem Spermatogenesearrest und in der malignen Transformation von Keimzellen resultieren, beides Merkmale des TDS. Abbildung 17 fasst alle hier erlangten Daten sowie die klinischen und histopathologischen Daten in einem Modell zusammen.

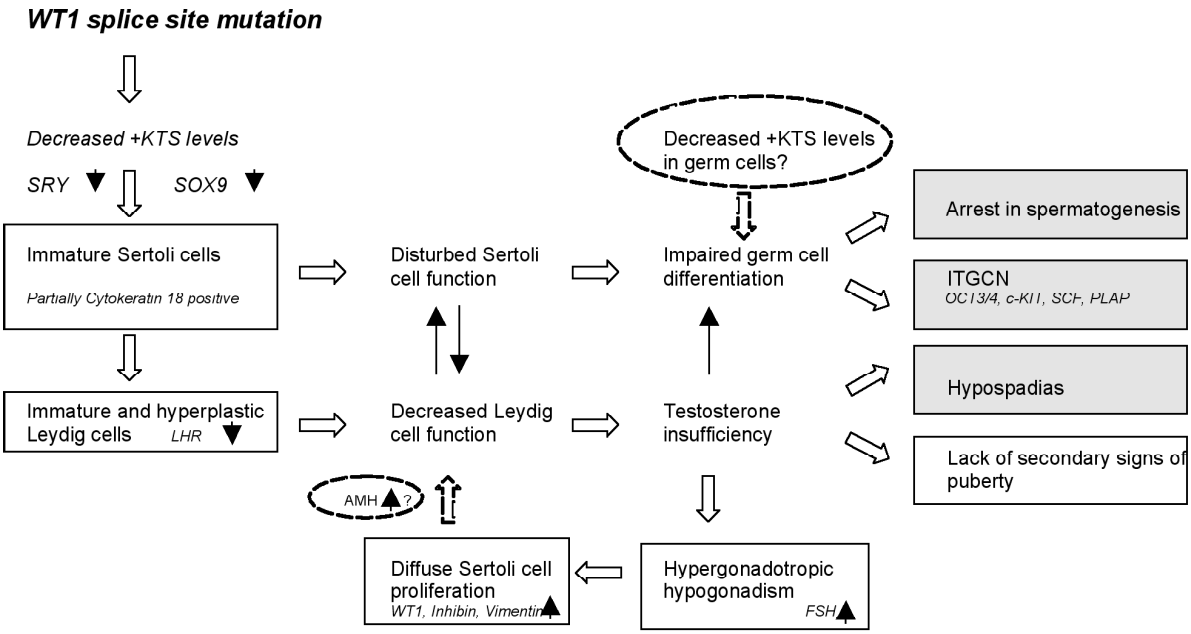


Abbildung 17: Schematisches Diagramm (modifiziert nach (57)) zur Darstellung der klinischen und histopathologischen Befunde (Boxen) des Frasier-Syndrom-Patienten zusammen mit den hier erlangten Ergebnissen. Gestrichelte Linie: hier nicht untersucht.

3. Zusammenfassung und Ausblick

If ever a history of ideas in developmental genetics were to be written...it would no doubt include as one of its most important chapters an account of the intellectual role that "inductive interaction" between the fields of genetics and embryology has played in the analysis of developmental mechanisms and their genetic control in higher organisms.

Salome Gluecksohn-Waelsch (1981)

Während der Entwicklung von Organen vollzieht sich ein Wandel von “simplen” multipotenten Einzelzellen zu komplexen Zellverbänden, in denen die Zellen ihre Morphologie und Funktion an die entsprechenden Notwendigkeiten anpassen müssen. Auf molekularer Ebene liegt dem ein kaum vorstellbarer, höchst komplexer Prozess zugrunde, nämlich ein streng koordiniertes An- und Abschalten spezifischer Gene. Der Ausfall eines bestimmten Genproduktes bei einer genetischen Erkrankung sowie dessen Konsequenz auf molekularer Ebene und der dadurch verursachte Phänotyp können dabei helfen, Rückschlüsse auf die normale Funktion des Genproduktes zu ziehen. Dieses Wissen verhilft umgekehrt auch wieder, der Erkrankung zugrunde liegende molekulare Pathomechanismen zu entschlüsseln und mögliche neue Therapiekonzepte zu erarbeiten.

Mutationen im Wilms-Tumor 1 (*WT1*)-Gen manifestieren sich aufgrund der Expressionsspezifität von WT1 vor allem in Nieren und Gonaden. Dass das WT1-Protein mit seiner dualen Bindungseigenschaft an DNA und RNA für eine geregelte Nieren- und Gonadenentwicklung unentbehrlich ist, wird an *Wt1*-knockout-Mäusen durch das völlige Fehlen von Nieren und Gonaden am deutlichsten. Trotz dieser Beobachtung ist auf molekularer Ebene bisher noch wenig über seine Funktion bekannt. Aus diesem Grund wurde in der vorgelegten Habilitationsarbeit an humanem Nieren- und Hodenmaterial die Rolle von mutiertem WT1 bei der Pathogenese dreier humaner Erkrankungen untersucht und durch *in vitro*-Studien ergänzt. Dadurch sollten neue Einblicke in die molekularen Pathomechanismen der Erkrankung gewonnen und Rückschlüsse auf die Rolle von WT1 bei der Nieren- und Hodenentwicklung gezogen werden.

Die vor allem im Kindesalter auftretenden Wilms-Tumoren entstehen aus Nierenstammzellen, die statt in Nephrone zu differenzieren, unkontrolliert proliferieren. Die Tatsache, dass es sich um eine genetisch und histologisch sehr variable Tumorentität mit unterschiedlicher Tumorbiologie handelt, erschwert eine individualisierte Therapieoptimierung und Prognosestellung. Aus diesem Grund wurden hier Tumoren mit einer *WT1*-Mutation charakterisiert und getestet, ob sie eine spezifische Subentität bilden. Dabei zeigte sich, dass Tumorzellen mit einem funktionellen Verlust des

Transkriptionsfaktors WT1 im Kern früh induzierten metanephrogenen Blastemzellen entsprechen, die fälschlicherweise vor allem in Stroma- und Skelettmuskelzellen differenzieren. Diese Differenzierungsstörung ist vermutlich auf die fehlerhafte Expression von Genen zurückzuführen, die normalerweise der Kontrolle von WT1 und seinem Interaktionspartner Par4 unterliegen. Es zeigte sich ferner, dass *WT1*-Keimbahnmutationen mit einem erhöhten Risiko für bilaterale Tumoren korrelierten. Da sich der zweite Tumor manchmal erst später manifestiert, scheint ein verlängertes Nachsorgeprogramm hier erforderlich zu sein. Die beiden Parameter, myogene Differenzierung und Bilateralität erinnern an den „fetal rhabdomyomatösen" Tumor-Subtyp. Obwohl dieser auf präoperative Chemotherapie bezüglich Volumenreduktion kaum anspricht, haben die Patienten dennoch eine gute Prognose. Momentan wird von uns in einer retrospektiven Studie evaluiert, ob *WT1*-Mutationen zuverlässige molekulare Marker darstellen, um Tumoren zu identifizieren, die schlecht auf Chemotherapie ansprechen, aber dennoch eine gute Prognose haben. Diese Tumor-Subentität könnte in Zukunft von einer individualisierten Therapieoptimierung profitieren.

Eine intakte Nierenfunktion hängt maßgeblich von der Integrität der Glomeruli ab. Heterozygote Missense-Mutationen im *WT1*-Gen verursachen bei Patienten mit Denys-Drash-Syndrom nicht nur Wilms-Tumoren, sondern auch eine diffuse mesangiale Glomerulosklerose mit nephrotischem Syndrom und terminalem Nierenversagen vor dem 3. Lebensjahr. Bisher sind die molekularen Pathomechanismen dieser Erkrankung kaum erforscht, aber für das Auffinden neuer therapeutischer Angriffsziele von größter Bedeutung. Es fand sich hier, dass nicht nur Patienten mit einer diffusen mesangialen Sklerose im Rahmen des Denys-Drash-Syndroms *WT1*-Mutationen tragen, sondern auch Patienten mit einer isolierten Form der diffusen mesangialen Skelorose. Somit zählen auch diese zu den Hochrisiko-Patienten für einen Wilms-Tumor und sollten wie die Denys-Drash-Patienten bei einer Restfunktion der Niere engmaschig auf Wilms-Tumoren gescreent und im Falle eines terminalen Nierenversagens nephrektomiert werden. Im Rahmen dieser Arbeit zeigte sich ferner, dass *WT1*-Mutationen die normale Differenzierung von Podozyten und Endothelzellen in den Glomeruli beeinträchtigen und somit keine reife glomeruläre Basalmembran synthetisiert werden kann. Dieser Zusammenbruch der Filtrationsbarriere führt dann zum Ausschwemmen von Proteinen mit dem Urin. Mechanistisch liegt hier eine veränderte VEGFA-Signaltransduktion und folglich ein gestörter „Crosstalk" zwischen Podozyten und Endothelzellen vor. Möglicherweise bieten sich hieraus neue Therapieangriffsziele.

Weitere Einblicke in die Pathogenese der *WT1*-assoziierten Glomerulosklerose gewann ich durch Expressionsanalysen an humanem Zellkultur-Material und während meines Forschungsaufenthaltes am Children's Hospital in Boston an murinem Material. Zwei

Kandidatengene werden in Zukunft den Schwerpunkt meiner Forschung ausmachen. Sulfatase 1, welche Sulfatgruppen von Heparansulfat-Seitenketten abspaltet und an der Signaltransduktion von Wachstumsfaktoren, wie z.B. VEGF, involviert ist, und ZFR, ein RNA-bindendes Protein in RNA-Granula, welche in Neuronen ein Reservoire an „stillen“ mRNA's darstellen, die bei Bedarf aktiviert werden können. Ich konnte zeigen, dass dieser Mechanismus auch in Podozyten existiert und vermutlich diesen Zellen unter Stressbedingungen hilft, schnell *in situ* in den Podozytenfußfortsätzen wichtige mRNA's zu translatieren. Beide Gene sind bei Denys-Drash-Syndrom herunterreguliert.

Heterozygote *WT1*-Spleißmutationen im Intron 9 und die daraus resultierende Verminderung der RNA-bindenden WT1-Isoformen verursachen im Rahmen des Fraisier-Syndroms eine Hodendysgenesie. Obwohl die zugrunde liegende genetische Ursache bekannt ist, fehlt die genaue Kenntnis darüber, wie eine Mutation diesen Phänotyp verursacht. Es zeigte sich hier, dass die Expression der Transkriptionsfaktoren *SRY* und *SOX9* vermindert ist und Sertoli-Zellen nicht vollständig ausdifferenzieren. Dadurch kommt es in den Hodenkanälchen auch bei den Keimzellen zu Differenzierungsstörungen, welche sich als Spermatogenesearrest und als maligne Transformation von Keimzellen (ITGCNU) manifestieren. Dies verdeutlicht, dass für die Differenzierung von Sertoli-Zellen und Keimzellen eine geregelte „Kommunikation“ zwischen beiden Zelltypen erforderlich ist. Um in Zukunft die Interaktionen zwischen Sertoli-Zellen und Keimzellen *in vitro* studieren zu können, haben wir die erste humane Sertoli-Zelllinie etabliert.

Welche Funktion spielt nun WT1 während der normalen Nieren- und Gonadenentwicklung? Um dies zu beantworten, ist es hilfreich, nach gemeinsamen Mustern zwischen den drei vorgestellten humanen Erkrankungen zu suchen. Dabei stößt man auf die Tatsache, dass Zellen mit *WT1*-Mutationen nicht terminal ausdifferenzieren und dass durch eine gestörte Zell-Zell-Interaktion auch die umliegenden Nachbarzellen in einem unreifen Stadium verbleiben. Diese unreifen Zellen sind nicht in der Lage, ihre eigentliche Aufgabe im Zellverband zu erfüllen. Schlussfolgernd stellt WT1 also einen essentiellen Differenzierungsfaktor während der Nieren- und Gonadenentwicklung dar.

4. Literatur

1. Grobstein C: Trans-filter induction of tubules in mouse metanephrogenic mesenchyme. *Exp Cell Res* 10:424-40, 1956.
2. Saxen L, Sariola H: Early organogenesis of the kidney. *Pediatr Nephrol* 1:385-92, 1987.
3. Dressler GR: The cellular basis of kidney development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22:509-29, 2006.
4. Gessler M, Poustka A, Cavenee W, Neve RL, Orkin SH, Bruns GA: Homozygous deletion in Wilms tumours of a zinc-finger gene identified by chromosome jumping. *Nature* 343:774-8, 1990.
5. Call KM, Glaser T, Ito CY, Buckler AJ, Pelletier J, Haber DA, Rose EA, Kral A, Yeger H, Lewis WH, et al.: Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus. *Cell* 60:509-20, 1990.
6. Riccardi VM, Sujansky E, Smith AC, Francke U: Chromosomal imbalance in the Aniridia-Wilms' tumor association: 11p interstitial deletion. *Pediatrics* 61:604-10, 1978.
7. Haber DA, Sohn RL, Buckler AJ, Pelletier J, Call KM, Housman DE: Alternative splicing and genomic structure of the Wilms tumor gene WT1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:9618-22, 1991.
8. Kennedy D, Ramsdale T, Mattick J, Little M: An RNA recognition motif in Wilms' tumour protein (WT1) revealed by structural modelling. *Nat Genet* 12:329-31, 1996.
9. Caricasole A, Duarte A, Larsson SH, Hastie ND, Little M, Holmes G, Todorov I, Ward A: RNA binding by the Wilms tumor suppressor zinc finger proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:7562-6, 1996.
10. Englert C, Vidal M, Maheswaran S, Ge Y, Ezzell RM, Isselbacher KJ, Haber DA: Truncated WT1 mutants alter the subnuclear localization of the wild-type protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:11960-4, 1995.
11. Larsson SH, Charlieu JP, Miyagawa K, Engelkamp D, Rassoulzadegan M, Ross A, Cuzin F, van Heyningen V, Hastie ND: Subnuclear localization of WT1 in splicing or transcription factor domains is regulated by alternative splicing. *Cell* 81:391-401, 1995.
12. Davies RC, Calvio C, Bratt E, Larsson SH, Lamond AI, Hastie ND: WT1 interacts with the splicing factor U2AF65 in an isoform-dependent manner and can be incorporated into spliceosomes. *Genes Dev* 12:3217-25, 1998.
13. Roberts SG: Transcriptional regulation by WT1 in development. *Curr Opin Genet Dev* 15:542-7, 2005.
14. Armstrong JF, Pritchard-Jones K, Bickmore WA, Hastie ND, Bard JB: The expression of the Wilms' tumour gene, WT1, in the developing mammalian embryo. *Mech Dev* 40:85-97, 1993.
15. Kreidberg JA, Sariola H, Loring JM, Maeda M, Pelletier J, Housman D, Jaenisch R: WT-1 is required for early kidney development. *Cell* 74:679-91, 1993.
16. Breslow NE, Langholz B: Childhood cancer incidence: geographical and temporal variations. *Int J Cancer* 32:703-16, 1983.
17. Kalapurakal JA, Dome JS, Perlman EJ, Malogolowkin M, Haase GM, Grundy P, Coppes MJ: Management of Wilms' tumour: current practice and future goals. *Lancet Oncol* 5:37-46, 2004.
18. Graf N, Tournade MF, de Kraker J: The role of preoperative chemotherapy in the management of Wilms' tumor. The SIOP studies. International Society of Pediatric Oncology. *Urol Clin North Am* 27:443-54, 2000.
19. Green DM, Coppes MJ: Future directions in clinical research in Wilms tumor. *Hematol Oncol Clin North Am* 9:1329-39, 1995.
20. Little M, Wells C: A clinical overview of WT1 gene mutations. *Hum Mutat* 9:209-25, 1997.

21. Knudson AG, Jr., Strong LC: Mutation and cancer: a model for Wilms' tumor of the kidney. *J Natl Cancer Inst* 48:313-24, 1972.
22. Rivera MN, Kim WJ, Wells J, Driscoll DR, Brannigan BW, Han M, Kim JC, Feinberg AP, Gerald WL, Vargas SO, Chin L, Iafrate AJ, Bell DW, Haber DA: An X chromosome gene, WTX, is commonly inactivated in Wilms tumor. *Science* 315:642-5, 2007.
23. Rapley EA, Barfoot R, Bonaiti-Pellie C, Chompret A, Foulkes W, Perusinghe N, Reeve A, Royer-Pokora B, Schumacher V, Shelling A, Skeen J, de Tourreil S, Weirich A, Pritchard-Jones K, Stratton MR, Rahman N: Evidence for susceptibility genes to familial Wilms tumour in addition to WT1, FWT1 and FWT2. *Br J Cancer* 83:177-83, 2000.
24. Denys P, Malvaux P, Van Den Berghe H, Tanghe W, Proesmans W: [Association of an anatomo-pathological syndrome of male pseudohermaphroditism, Wilms' tumor, parenchymatous nephropathy and XX/XY mosaicism]. *Arch Fr Pediatr* 24:729-39, 1967.
25. Drash A, Sherman F, Hartmann WH, Blizzard RM: A syndrome of pseudohermaphroditism, Wilms' tumor, hypertension, and degenerative renal disease. *J Pediatr* 76:585-93, 1970.
26. Habib R, Gubler MC, Antignac C, Gagnadoux MF: Diffuse mesangial sclerosis: a congenital glomerulopathy with nephrotic syndrome. *Adv Nephrol Necker Hosp* 22:43-57, 1993.
27. Habib R, Loirat C, Gubler MC, Niaudet P, Bensman A, Levy M, Broyer M: The nephropathy associated with male pseudohermaphroditism and Wilms' tumor (Drash syndrome): a distinctive glomerular lesion--report of 10 cases. *Clin Nephrol* 24:269-78, 1985.
28. Pelletier J, Bruening W, Kashtan CE, Mauer SM, Manivel JC, Striegel JE, Houghton DC, Junien C, Habib R, Fouser L, et al.: Germline mutations in the Wilms' tumor suppressor gene are associated with abnormal urogenital development in Denys-Drash syndrome. *Cell* 67:437-47, 1991.
29. Little M, Holmes G, Bickmore W, van Heyningen V, Hastie N, Wainwright B: DNA binding capacity of the WT1 protein is abolished by Denys-Drash syndrome WT1 point mutations. *Hum Mol Genet* 4:351-8, 1995.
30. Frasier SD, Bashore RA, Mosier HD: Gonadoblastoma Associated with Pure Gonadal Dysgenesis in Monozygous Twins. *J Pediatr* 64:740-5, 1964.
31. Barbaux S, Niaudet P, Gubler MC, Grunfeld JP, Jaubert F, Kuttenn F, Fekete CN, Souleyreau-Therville N, Thibaud E, Fellous M, McElreavey K: Donor splice-site mutations in WT1 are responsible for Frasier syndrome. *Nat Genet* 17:467-70, 1997.
32. Klamt B, Koziell A, Poulat F, Wieacker P, Scambler P, Berta P, Gessler M: Frasier syndrome is caused by defective alternative splicing of WT1 leading to an altered ratio of WT1 +/-KTS splice isoforms. *Hum Mol Genet* 7:709-14, 1998.
33. Royer-Pokora B, Beier M, Henzler M, Alam R, Schumacher V, Weirich A, Huff V: Twenty-four new cases of WT1 germline mutations and review of the literature: genotype/phenotype correlations for Wilms tumor development. *Am J Med Genet A* 127:249-57, 2004.
34. Weirich A, Leuschner I, Harms D, Vujanic GM, Troger J, Abel U, Graf N, Schmidt D, Ludwig R, Voute PA: Clinical impact of histologic subtypes in localized non-anaplastic nephroblastoma treated according to the trial and study SIOP-9/GPOH. *Ann Oncol* 12:311-9, 2001.
35. Coppes MJ, Williams BR: The molecular genetics of Wilms tumor. *Cancer Invest* 12:57-65, 1994.
36. Haber DA, Park S, Maheswaran S, Englert C, Re GG, Hazen-Martin DJ, Sens DA, Garvin AJ: WT1-mediated growth suppression of Wilms tumor cells expressing a WT1 splicing variant. *Science* 262:2057-9, 1993.
37. Rivera MN, Haber DA: Wilms' tumour: connecting tumorigenesis and organ development in the kidney. *Nat Rev Cancer* 5:699-712, 2005.

38. Reddy JC, Hosono S, Licht JD: The transcriptional effect of WT1 is modulated by choice of expression vector. *J Biol Chem* 270:29976-82, 1995.
39. Moorwood K, Salpekar A, Ivins SM, Hall J, Powlesland RM, Brown KW, Malik K: Transactivation of the WT1 antisense promoter is unique to the WT1[+/-] isoform. *FEBS Lett* 456:131-6, 1999.
40. Wang ZY, Qiu QQ, Huang J, Gurrieri M, Deuel TF: Products of alternatively spliced transcripts of the Wilms' tumor suppressor gene, wt1, have altered DNA binding specificity and regulate transcription in different ways. *Oncogene* 10:415-22, 1995.
41. Reddy JC, Licht JD: The WT1 Wilms' tumor suppressor gene: how much do we really know? *Biochim Biophys Acta* 1287:1-28, 1996.
42. Kriz W: Podocyte is the major culprit accounting for the progression of chronic renal disease. *Microsc Res Tech* 57:189-95, 2002.
43. Mundel P, Shankland SJ: Podocyte biology and response to injury. *J Am Soc Nephrol* 13:3005-15, 2002.
44. Kohsaka T, Tagawa M, Takekoshi Y, Yanagisawa H, Tadokoro K, Yamada M: Exon 9 mutations in the WT1 gene, without influencing KTS splice isoforms, are also responsible for Frasier syndrome. *Hum Mutat* 14:466-70, 1999.
45. Kashtan CE: Alport syndrome. An inherited disorder of renal, ocular, and cochlear basement membranes. *Medicine (Baltimore)* 78:338-60, 1999.
46. Zenker M, Aigner T, Wendler O, Tralau T, Muntefering H, Fenski R, Pitz S, Schumacher V, Royer-Pokora B, Wuhl E, Cochat P, Bouvier R, Kraus C, Mark K, Madlon H, Dotsch J, Rascher W, Maruniak-Chudek I, Lennert T, Neumann LM, Reis A: Human laminin beta2 deficiency causes congenital nephrosis with mesangial sclerosis and distinct eye abnormalities. *Hum Mol Genet* 13:2625-32, 2004.
47. Hasselbacher K, Wiggins RC, Matejas V, Hinkes BG, Mucha B, Hoskins BE, Ozaltin F, Nurnberg G, Becker C, Hangan D, Pohl M, Kuwertz-Broking E, Griebel M, Schumacher V, Royer-Pokora B, Bakkaloglu A, Nurnberg P, Zenker M, Hildebrandt F: Recessive missense mutations in LAMB2 expand the clinical spectrum of LAMB2-associated disorders. *Kidney Int* 70:1008-12, 2006.
48. Kincaid-Smith P: The renal lesion of preeclampsia revisited. *Am J Kidney Dis* 17:144-8, 1991.
49. Eremina V, Sood M, Haigh J, Nagy A, Lajoie G, Ferrara N, Gerber HP, Kikkawa Y, Miner JH, Quaggin SE: Glomerular-specific alterations of VEGF-A expression lead to distinct congenital and acquired renal diseases. *J Clin Invest* 111:707-16, 2003.
50. Wagner KD, Wagner N, Vidal VP, Schley G, Wilhelm D, Schedl A, Englert C, Scholz H: The Wilms' tumor gene Wt1 is required for normal development of the retina. *Embo J* 21:1398-405, 2002.
51. Wagner N, Wagner KD, Hammes A, Kirschner KM, Vidal VP, Schedl A, Scholz H: A splice variant of the Wilms' tumour suppressor Wt1 is required for normal development of the olfactory system. *Development* 132:1327-36, 2005.
52. Kobayashi N: Mechanism of the process formation; podocytes vs. neurons. *Microsc Res Tech* 57:217-23, 2002.
53. Kobayashi N, Gao SY, Chen J, Saito K, Miyawaki K, Li CY, Pan L, Saito S, Terashita T, Matsuda S: Process formation of the renal glomerular podocyte: is there common molecular machinery for processes of podocytes and neurons? *Anat Sci Int* 79:1-10, 2004.
54. Wilhelm D, Palmer S, Koopman P: Sex determination and gonadal development in mammals. *Physiol Rev* 87:1-28, 2007.
55. Chaboissier MC, Kobayashi A, Vidal VI, Lutzkendorf S, van de Kant HJ, Wegner M, de Rooij DG, Behringer RR, Schedl A: Functional analysis of Sox8 and Sox9 during sex determination in the mouse. *Development* 131:1891-901, 2004.
56. Petersen C, Soder O: The sertoli cell--a hormonal target and 'super' nurse for germ cells that determines testicular size. *Horm Res* 66:153-61, 2006.
57. Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E, Main KM: Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. *Hum Reprod* 16:972-8, 2001.

58. Hammes A, Guo JK, Lutsch G, Leheste JR, Landrock D, Ziegler U, Gubler MC, Schedl A: Two splice variants of the Wilms' tumor 1 gene have distinct functions during sex determination and nephron formation. *Cell* 106**:**319-29, 2001.
59. Gao F, Maiti S, Alam N, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, Lecureuil C, Guillou F, Huff V: 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* 103**:**11987-92, 2006.