

**Artículo de revisión****Las múltiples caras del gen WT1: funciones en el desarrollo e implicaciones clínicas**

Dr. Ramón Muñoz-Chápuli,\* Dra. Rita Carmona,\* Mauricio González-Iriarte,\* Dr. David Macías,\* Dr. José María Pérez-Pomares\*

**Resumen**

El gen WT1 codifica un factor de transcripción del tipo "dedos de zinc" implicado en el desarrollo de diferentes órganos (fundamentalmente riñón y gónadas) y en tumorigénesis. Se ha comprobado experimentalmente que la proteína WT1 en unos casos reprime y en otros activa la transcripción de numerosos genes, pero sus dianas fisiológicas son poco conocidas. Existen dos tipos fundamentales de isoformas de la proteína que se caracterizan, respectivamente por la presencia y ausencia de la inserción KTS (lisina-treonina-serina) entre el tercero y cuarto dedos de zinc. Estos dos tipos de isoformas parecen desempeñar funciones diferentes, ya que las isoformas QT1-(-KTS) muestran mayor afinidad por secuencias promotoras en el DNA, mientras que las isoformas QT1 (+KTS) probablemente estén implicadas en el procesamiento del RNA mensajero. La capacidad de la proteína WT1 para unirse a otras proteínas modulando su actividad configura un tercer nivel de actuación. En este artículo revisamos los últimos descubrimientos que han sido publicados en las revistas biomédicas acerca de las funciones de WT1 y describimos cómo las anomalías en la expresión de este gen están implicadas en patologías variadas que van desde el tumor de Wilms hasta diversos tipos de leucemias agudas, pasando por los síndromes WAGR, Denys-Drash y Frasier.

**Palabras clave:** Gen WT1, tumor de Wilms, leucemia, desarrollo renal.

**Introducción**

El gen WT1 fue localizado en el curso de unas investigaciones que trataban de poner de manifiesto las bases genéticas del tumor de Wilms<sup>1</sup>. Esta forma de cáncer renal es una de las más frecuentes en pediatría; afecta a un niño de cada

**Abstract**

WT1 encodes a zinc-finger transcription factor involved in the development of several organs (mainly kidney and gonads) and in tumorigenesis. It has been experimentally demonstrated that WT1 is able to activate and repress the transcription of many genes, but its physiological targets are uncertain. There are two types of protein isoforms, characterized respectively, by the variable insertion of the sequence KTS (lysine- threonine-serine) between the third and fourth zinc-fingers. These two types of isoforms seem to play different roles, since the isoforms WT1-(-KTS) show a higher affinity to bind specific sequences in DNA promoters, while the isoforms WT1 (+KTS) are probably implicated in mRNA splicing. The ability of WT1 to bind to other proteins and to modulate their function configures a third layer of activity. In this paper we review a number of recent reports of the functions of WT1 and we describe how the anomalies in its expression are implicated in pathologies such as Wilms tumor, acute leukemias and the WAGR, Denys-Drash and Frasier syndromes.

**Key words:** WT1 gen, Wilms tumor, leukemia, kidney development.

10,000; es el tumor sólido intraabdominal más común en la infancia<sup>2</sup>. El gen WT1 fue descubierto a partir de las evidencias de delección en el brazo corto del cromosoma 11 asociadas al síndrome WAGR, una anomalía congénita caracterizada por aniridia, retraso mental, malformación genitourinaria y tumor de Wilms<sup>3,4</sup>. El locus WT1 se localizó en posición 11p13 y su secuenciación mostró que el producto de dicho gen era una proteína dotada, en su extremo C-terminal, de cuatro regiones del tipo "dedos de zinc", dominios con capacidad para interactuar con secuencias ricas en GC del DNA. Dado que esta estructura era similar a la descrita para los factores de transcripción de la familia de los EGR (early growth response) se atribuyó a la proteína WT1 la función de un factor de transcripción.

\* Departamento de Biología Animal, Universidad de Málaga, Málaga, España.

Correspondencia: Dr. Ramón Muñoz-Chápuli. Departamento de Biología Animal. Facultad de Ciencias. Universidad de Málaga. E-29071 Málaga, España. Tel: 34-952-131853. Fax: 34-952-131668 Correo electrónico: chapuli@uma.es  
Recibido: septiembre, 2002. Aceptado: noviembre, 2002.

La versión completa de este artículo también está disponible en internet: [www.revistasmedicasmexicanas.com.mx](http://www.revistasmedicasmexicanas.com.mx)

Más tarde se localizó un segundo locus supresor del tumor de Wilms (WT2) en posición 11p15.5, asociado al síndrome Beckwith-Wiedemann<sup>5</sup>. No ha sido posible hasta ahora la identificación, secuenciación y caracterización del gen candidato WT2, por lo que no es posible extenderse sobre el alcance de este descubrimiento ni sobre las relaciones de WT2 con WT1.

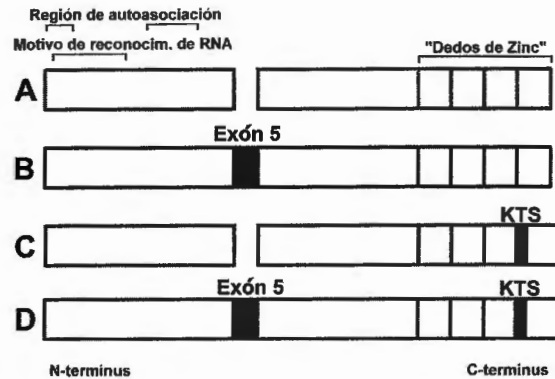
Pronto se comprobó que alrededor de 10 a 15% de los tumores de Wilms presentaban mutaciones en WT1 con pérdida de función en ambos alelos, por lo que se consideró a este gen como un ejemplo típico de supresor tumoral. Sin embargo, a diferencia de otros supresores tumorales como Rb1 (supresor del retinoblastoma) o p53, WT1, desempeña un papel esencial para el desarrollo de diversos órganos, como se verá más adelante. Esto, junto a nuevos y sorprendentes descubrimientos en torno al papel fisiológico de WT1 y su implicación en otras patologías, fundamentalmente en leucemias, hacen de este factor de transcripción un objetivo prioritario de muchos grupos de investigación en todo el mundo<sup>6-8</sup>. Intentaremos sintetizar lo que conocemos acerca del producto del gen WT1, sus funciones normales en el desarrollo y las importantes consecuencias clínicas de las anomalías en su expresión.

### Estructura del gen WT1

Una de las características clave del gen, esencial para entender las múltiples funciones desempeñadas por la proteína WT1, es la existencia de diversas isoformas causadas fundamentalmente por la presencia en el gen de dos regiones de corte y empalme de exones (*splicing*) alternativo, una región que codifica para 17 aminoácidos (exón 5) y una pequeña secuencia de tres aminoácidos situada entre los dedos de zinc tres y cuatro (zona de "splicing" empalme de exones variable en el intrón 9)<sup>9</sup>. La presencia o ausencia de esta secuencia llamada KTS (por lisina-treonina-serina), es fundamental en la especificación de las funciones de la proteína. Por combinaciones entre las dos zonas de corte y empalme de exones (*splicing*) alternativo se generan cuatro isoformas fundamentales (Figura 1). Otras modificaciones menores provocadas por edición de mRNA y por la presencia de sitios alternativos de iniciación de la traducción, dan lugar a una veintena de isoformas descritas en mamíferos.

Entre todas estas isoformas, la variable fundamental es la presencia o ausencia de la secuencia KTS, ya que las isoformas que carecen de ella muestran mucho mayor afinidad por el DNA<sup>10</sup>. De hecho, se ha comprobado mediante

microscopia confocal que la propia localización celular de la proteína WT1 es diferente según se trate de una isoforma KTS o +KTS. La primera se localiza fundamentalmente en el núcleo de forma difusa u ocupando amplios dominios. En cambio, la isoforma WT1 (+KTS) se encuentra en pequeñas motas situadas en el interior y alrededor del núcleo<sup>11</sup>. Esto se ha interpretado en términos de la organización de la isoforma WT1 (+KTS) en maquinaria de corte y empalme de exones (espliceosomas), complejos ribonucleoproteicos en los que se produce el corte y empalme de exones (*splicing*) o procesamiento del mRNA, un proceso en el que probablemente también participa esta isoforma.



**Figura 1.** Estructura de las cuatro isoformas principales de WT1 en función de la presencia o ausencia del exón 5 y de la inserción de la secuencia KTS (lisina-treonina-serina) entre los dedos de zinc tres y cuatro. Se indica la posición del motivo de reconocimiento de RNA y la región de autoasociación, probablemente implicada en interacciones con otras proteínas.

### Genes candidatos activados o reprimidos por WT1

Se ha comprobado que la isoforma WT1 (-KTS) se une con gran afinidad a secuencias de DNA ricas en GC y en elementos repetitivos TC y podría desempeñar una función principal como activador o sobre todo, como represor transcripcional. Son muchos los genes candidatos cuya transcripción se ha visto reprimida en ensayos *in vitro*<sup>6-8,12</sup>. Es sorprendente la variedad de dichos genes, entre los que se encuentran factores de crecimiento (PDGF-A<sup>13</sup>, IGF2<sup>14</sup>, TGFβ1<sup>15</sup>), receptores de factores de crecimiento (IGF-1R<sup>16</sup>, EGFR<sup>17</sup>), receptores nucleares (RARα<sup>18</sup>), factores de transcripción (Pax2<sup>19</sup>, c-myb<sup>20</sup>, c-myc y Bcl-2<sup>21</sup>, MyoD<sup>22</sup> y el propio WT1<sup>23</sup>), elementos de regulación del ciclo celular (ciclina E<sup>24</sup>), y otras proteínas (midkina<sup>25</sup>, ornitín-descarboxilasa<sup>26</sup>).

Por otra parte se han presentado evidencias de la activación transcripcional por WT1 de otros genes, también de muy distinto tipo. Este es el caso de p21, un inhibidor de las CDK (quinasas dependientes de ciclina)<sup>27</sup>, moléculas de la matriz extracelular como el sindecán<sup>28</sup>, el factor de crecimiento antirregulina<sup>29</sup>, la E-cadherina<sup>30</sup>, el receptor de la vitamina D<sup>31,32</sup>, o la podocalyxina, una proteína de membrana de los podocitos renales<sup>33</sup>. Más adelante nos extenderemos sobre el significado de algunos de estos resultados.

A pesar de su papel fundamental como represor transcripcional, la función de WT1 como supresor de la proliferación celular se ha atribuido más a sus capacidades de transactivación<sup>34</sup>, probablemente por aumento de la expresión de p21<sup>cip1</sup>, una proteína clave para el control de la proliferación celular por su papel inhibidor de CDK kinasas<sup>27</sup>. Niveles altos de p21<sup>cip1</sup>, por tanto, se correlacionan con una salida del ciclo celular.

No obstante, la interpretación de los resultados obtenidos en ensayos *in vitro* es compleja, ya que estos pueden variar en función de la línea celular en la que se ha realizado el ensayo, la isoforma expresada, los elementos del promotor del gen *reporter* utilizado y otros factores experimentales. Son frecuentes los casos en los que se ha descrito, alternativamente, activación y represión de un mismo promotor en función de estas variables, por lo que hacer una extrapolación de los resultados *in vitro* a las funciones fisiológicas normales es muy difícil<sup>35,36</sup>. La propia actividad celular promovida por la expresión de WT1 arroja resultados contradictorios dependiendo de las isoformas expresadas y de los sistemas experimentales<sup>7</sup>. De esta forma se han descrito casos de supresión tumoral y tumorigénesis, reducción e incremento de la proliferación, promoción y represión de la diferenciación, transiciones epitelio-mesénquima y mesénquima-epitelio, inhibición de apoptosis inducida por p53, e inducción de apoptosis. En ocasiones, los diferentes efectos producidos por WT1 se han asociado a la actividad celular de las isoformas -KTS y +KTS, lo que ha llevado a plantear directamente la cuestión de si WT1 debe ser considerado como supresor tumoral o como oncogén<sup>37</sup>. En cualquier caso, los citados efectos contradictorios probablemente están ilustrando la extrema complejidad de los procesos regulados por WT1 *in vivo*, así como la importancia del equilibrio entre los niveles relativos de expresión de cada una de sus isoformas.

Un resultado particularmente interesante se obtuvo al forzar la expresión de WT1 (-KTS) en fibroblastos, un expe-

rimiento que causa la detención del crecimiento, inducción de la expresión de E-cadherina y adquisición de un fenotipo epitelial caracterizado por la aparición de desmosomas y la producción de otras moléculas típicas de la lámina basal epitelial, tales como colágeno IV y perlecán<sup>30</sup>. Estos autores han localizado una secuencia rica en GC que media la unión de WT1 al promotor de la E-cadherina, un gen fundamental en la diferenciación de muchos epitelios, incluyendo el epitelio renal. La activación transcripcional de E-cadherina por WT1 podría tener un significado funcional para el desarrollo renal, en particular para la transformación del blastema renal indiferenciado en el epitelio de las nefronas. Por otro lado, no se debe olvidar que la pérdida de la expresión de E-cadherina en determinados epitelios está asociada a tumorigénesis e invasión tumoral. E-cadherina está normalmente asociada a  $\beta$ -catenina, una proteína esencial por su doble papel estructural y como activador transcripcional participante en la vía de señalización de los factores Wnt. Es interesante que mutaciones activadoras de  $\beta$ -catenina hayan sido identificadas en el tumor de Wilms, lo que podría establecer un importante nexo entre WT1, E-cadherina y la señalización por Wnt<sup>38</sup>.

Una estrategia más actual para la localización de posibles dianas fisiológicas de WT1 consiste en la utilización de microarreglos (*microarrays*) de oligonucleótidos. De esta forma se ha intentado revelar cambios en la expresión génica siguiendo a la expresión inducida de WT1 en células de osteosarcoma<sup>29</sup>. Este sistema permite inducir a voluntad la expresión de las dos isoformas principales, con presencia y ausencia de la inserción KTS. En estas condiciones la principal acción producida por WT1 (-KTS) fue la activación transcripcional de anfirregulina, un miembro de la familia de los factores de crecimiento epidérmicos<sup>29</sup>. La isoforma WT1 (-KTS) se une directamente al promotor de esta proteína, que se expresa durante el desarrollo del riñón y estimula el crecimiento y la ramificación del epitelio renal. La anfirregulina, ligando del receptor EGFR, muestra propiedades únicas, ya que estimula la proliferación de muchas células epiteliales mientras que reprime el crecimiento de células tumorales<sup>39</sup>. Resulta llamativa esta doble propiedad de la anfirregulina, análoga a las funciones a veces contradictorias atribuidas a WT1. Es posible que la anfirregulina desempeñe un papel importante en el desarrollo renal, aunque los ratones deficientes en esta proteína no presentan alteraciones en el desarrollo de dicho órgano<sup>40</sup>.

Otras probables dianas fisiológicas que fueron reveladas por WT1 (-KTS) en este ensayo son la chaperona Hsp70, el ya comentado regulador del ciclo celular p21<sup>cip1</sup>, FGF-1 (FGF ácido), cistatina-A y la interleucina-11. Todas estas moléculas fueron transcripcionalmente activadas, aunque el aumento de expresión de las dos últimas no pudo ser confirmado por Northern blot. Sorprendentemente, no se detectó represión de la expresión de ningún gen entre las 6.800 secuencias ensayadas, lo que está en abierta contradicción con las presuntas funciones represoras de WT1 manifestadas en numerosos ensayos *in vitro*, como antes de ha descrito. Finalmente, la expresión inducida de WT1 (+KTS) no produjo alteración detectable en los niveles de expresión de los genes ensayados, un resultado acorde con las propiedades propuestas para esta isoforma, sobre las que volveremos más adelante.

Por último, es muy poco lo que se sabe de la regulación de la expresión de WT1. Quizá el dato más interesante es el que apunta la existencia de un fenómeno de autorregulación, es decir, que la proteína actúe sobre el promotor de su propio gen probablemente reprimiendo su expresión<sup>23</sup>. Se ha observado también una disminución de la expresión de WT1 asociada a la pérdida de función de Pax-2 en células embrionarias del parénquima mamario, así como la colocalización de Pax-2 con WT1 en células mamarias tumorales<sup>41</sup>. No obstante, otras evidencias indican que Pax-2 podría ser diana, más que activador transcripcional de WT1<sup>19</sup>.

### WT1 y procesamiento de RNA

La proteína WT1 es capaz de unirse a RNA con alta afinidad, e incluso se han identificado secuencias específicas reconocidas por este factor<sup>42</sup>. Esta unión puede producirse a través de los mismos dedos de zinc de la región carboxi-terminal que median en la unión a DNA<sup>43,44</sup>, aunque también se ha descrito la existencia de un motivo de reconocimiento de RNA en la región amino-terminal, similar a la existente en otras proteínas que se unen a RNA<sup>41</sup>. WT1 fue el primer factor de transcripción de tipo dedos de zinc (*zinc-finger*) en el que se identificó un motivo de reconocimiento de RNA, aunque posteriormente se ha identificado una familia de proteínas que también muestran esta doble faceta<sup>45</sup>.

WT1 (en particular las isoformas +KTS) colocaliza, en ensayos de sedimentación, con factores de corte y empalme de exones (*splicing*) tales como U1-70K, U2B'', coilina-p80<sup>11</sup> y U2AF65<sup>46</sup>. Se ha mostrado también que un tratamiento con actinomicina D o con ribonucleasas relocaliza la isoforma WT1

(+KTS) que pasa de estar localizada en pequeñas partículas perinucleares a distribuirse difusamente en el citoplasma<sup>11</sup>. Sin embargo, otros estudios han mostrado secuencias diana en el RNA a las que se une preferentemente la isoforma WT1 (-KTS) a través de los dedos de zinc<sup>44</sup>.

### Interacciones de la proteína WT1 con otras proteínas

Además de las interacciones de WT1 con DNA y mRNA, se han reunido numerosas evidencias de que WT1 se une directamente a algunas proteínas, modulando su actividad. En concreto, y además de las relaciones antes descritas con proteínas del corte y empalme de exones (*splicing*), WT1 interacciona con el supresor tumoral p53 y con el factor par-4 a través de los dedos de zinc<sup>47,48</sup> y con otras proteínas mediante un dominio N-terminal. Es el caso de las proteínas Cio1<sup>49</sup>, el propio factor WT1<sup>50,52</sup> y la chaperona inducible Hsp70<sup>53</sup>. Es notable que WT1 sea un probable activador de la transcripción de esta chaperona y que luego interactúe directamente con ella en un segundo nivel de regulación. Se ha mostrado que esta interacción facilita la inhibición del crecimiento mediado por la isoforma WT1 (-KTS) y que ambas proteínas colocalizan en los podocitos durante el desarrollo<sup>53</sup>. Sobre los efectos fisiológicos de las otras interacciones es poco lo que conocemos. La unión a p53 promueve la unión de este factor a regiones promotoras del DNA y la isoforma WT1 (-KTS) inhibe la apoptosis mediada por p53<sup>47</sup>. La unión a par-4 parece activar las funciones represoras de WT1, inhibiendo las funciones transactivadoras<sup>48</sup>. Cio-1 no afecta la capacidad de unión a DNA de WT1, pero suprime su papel como activador transcripcional<sup>49</sup>.

Otra interesante interacción de WT1 a través de un dominio N-terminal es la que establece con SF-1 (factor esteroideogénico-1), un receptor nuclear cuyo ligando es desconocido<sup>54</sup>. Esta interacción facilita la expresión de factores relacionados con la determinación del sexo masculino, tales como la Sustancia Inhibidora Mullerina (MIS) que induce la regresión del conducto de Muller. SF-1 activa la expresión de MIS cuando se une a la isoforma WT1 (-KTS) (la isoforma +KTS no se une a este receptor). Es interesante que Dax-1, un factor codificado en el cromosoma X, también se una de forma competitiva a SF-1. Así, la dosificación de Dax-1 y WT1 (-KTS) podría desempeñar un papel clave en el desarrollo de determinados caracteres sexuales masculinos, y esto podría explicar la disgenesia gonadal y los casos de pseudohermafroditismo XY asociados a mutaciones

en el locus *WT1* (véase más adelante el aparato dedicado al papel de *WT1* en el síndrome de Denys-Drash).

### Expresión de *WT1* en el desarrollo. Fenotipo de ratones *WT1*<sup>-/-</sup>

A diferencia de otros genes supresores tumorales que se expresan de forma muy amplia en el desarrollo y en tejidos adultos, la expresión de *WT1* muestra un patrón espacial y temporal muy preciso tanto en el embrión de ratón<sup>55-59</sup> como en el de ave<sup>60</sup>. Dicha expresión comienza en el embrión de ratón, a partir del día 9.5. Tanto el mRNA de *WT1* como su proteína se localizan primero en la pared del celoma, de forma específica en el mesotelio y en las células mesenquimáticas subyacentes. Más adelante, la expresión de *WT1* se localiza en el blastema de las crestas nefrogénicas, crestas genitales, mesénquima perivisceral, epicardio, esclerotomo, miembros pares y en una población de células de la médula espinal. La expresión de *WT1* va disminuyendo a lo largo del desarrollo, aunque permanece en el adulto, a nivel reducido, en el mesotelio celómico y en los podocitos renales.

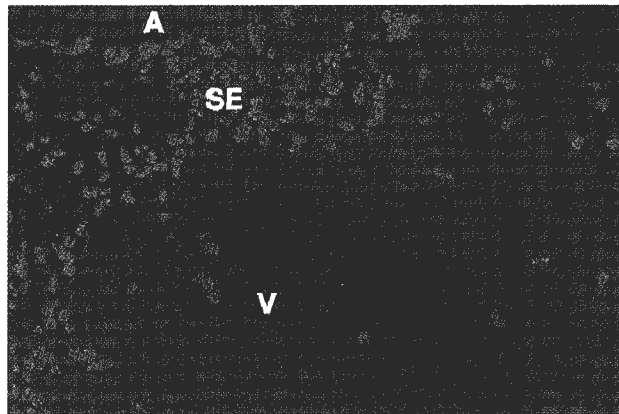
De forma sorprendente para lo que cabría esperar de un supresor tumoral, los ratones deficientes en *WT1* no sólo no desarrollan tumores, sino que muestran agenesia de riñón y gónadas<sup>61</sup>, bazo<sup>62</sup> y glándulas suprarrenales<sup>58</sup>. Estos embriones mueren hacia el día 13.5 del desarrollo, probablemente debido a insuficiencia cardíaca<sup>61</sup>. De hecho, los ratones *WT1*<sup>-/-</sup> muestran un fuerte adelgazamiento del miocardio ventricular (el llamado síndrome del miocardio delgado) a pesar de que *WT1* no se expresa en el miocardio.

La ausencia de desarrollo renal muestra que la expresión de *WT1* es esencial para la nefrogénesis. Esto ha llevado a proponer un papel para *WT1* en la supresión de la apoptosis del blastema renal, en la transformación mesénquima-epitelio o ambos hechos, que contribuye a la diferenciación de los conductos renales y el glomérulo, una transformación mediada por la expresión de E-cadherina, como ya se ha descrito<sup>30</sup>. De hecho, en los ratones *WT1*<sup>-/-</sup> se detectan abundantes células apoptóticas en las crestas nefrogénicas y ausencia de crecimiento de las yemas uretéricas<sup>61</sup>.

Más recientemente se ha comprobado que *WT1* también es esencial para el desarrollo de la retina<sup>63</sup> (Wagner et al., 2002). Los embriones de ratones mutantes *WT1*<sup>-/-</sup> muestran retinas más delgadas que los embriones normales. Buena parte de las células ganglionares retinianas desaparecen por apoptosis y el crecimiento del nervio óptico se ve fuertemente perjudicado. También se ha comprobado la ausencia de

expresión del factor transcripcional Pou4f2 que es esencial para la supervivencia de dichas células ganglionares<sup>63</sup>. Diversos ensayos *in vitro* sugieren que *WT1* es esencial para la expresión de Pou4f2.

Aunque no existen pruebas directas de ello, todo indica que los ratones deficientes en *WT1* mueren de insuficiencia cardíaca provocada por la falta de compactación del miocardio ventricular. Dado que *WT1* no se expresa en el miocardio pero sí en el pericardio, hemos propuesto un modelo en el que la compactación del miocardio ventricular es dependiente de su invasión por parte de células derivadas del epicardio que sí expresan *WT1* (Figura 2). Estas células *WT1*<sup>+</sup> invaden el miocardio ventricular, pero no el atrial, y expresan la enzima retinaldehído deshidrogenasa-2 (RALDH2), indicando una probable producción y liberación de ácido retinoico, la forma activa de la vitamina A<sup>60-64</sup>.



**Figura 2**. Localización de *WT1* mediante microscopia confocal en el corazón de embrión de pollo (estadio HH32). Aparecen marcados los núcleos de las células epicárdicas y del mesénquima subepicárdico, especialmente en el subepicardio del surco atrioventricular (SE). También aparecen células marcadas en el interior del miocardio del ventrículo (V) pero no en el atrio (A).

Es bien sabido que la formación de la capa compacta ventricular es dependiente del ácido retinoico. Esto queda ilustrado por la aparición de miocardio delgado en condiciones de privación de ácido retinoico durante la gestación y también por la presencia del mismo fenotipo en ratones deficientes en el receptor del ácido retinoico RXR $\alpha$ <sup>65</sup>. Cabría especular que el ácido retinoico liberado por células derivadas del epicardio sea una señal paracrina esencial para la formación del miocardio compacto, pero la realidad probablemente es mucho más compleja. Por ejemplo, la mutación condicionada de RXR $\alpha$  en el miocardio no produce ningún genotipo anormal<sup>66</sup>. Por ello, nuestro grupo ha sugerido

que las células derivadas de epicardio producen una señal, de naturaleza desconocida, que provoca la proliferación y compactación de los miocardiocitos ventriculares. La producción de dicha señal sería dependiente de la activación por ácido retinoico, que actuaría de forma autocrina manteniendo a las células derivadas del epicardio, invasoras del ventrículo, en un estado indiferenciado<sup>64</sup>. El papel de WT1 en este contexto podría estar relacionado con el mantenimiento de la producción de ácido retinoico, quizá activando la expresión de RALDH2, aunque esto no está probado.

Cabe la posibilidad de que un mecanismo similar al propuesto pueda estar implicado en el desarrollo de otros órganos. En este sentido nuestro grupo ha mostrado que, en embriones de pollo, se produce una invasión por parte de células WT1<sup>+</sup>, probablemente derivadas del epitelio celómico, de aquellos órganos que no se desarrollan en ratones deficientes para WT1 (riñones, gónadas, bazo y adrenales)<sup>60</sup>. La expresión de WT1 en el epitelio celómico y en células invasivas derivadas del mismo podría estar relacionada con insospechadas funciones señalizadoras que podría explicar en parte el fenotipo provocado por la ausencia de expresión de WT1.

Un descubrimiento muy reciente, cuyo alcance es difícil precisar, es la expresión de WT1 en las arterias coronarias después de un infarto del miocardio<sup>67</sup>. Esta expresión se detecta 24 horas después de la inducción experimental del infarto y se registra en el endotelio y en la musculatura coronaria de la zona isquémica, pero no en otras partes del corazón. La simple exposición de ratas a condiciones de hipoxia es suficiente para provocar la expresión vascular de WT1. Esta observación abre la posibilidad de que WT1 esté implicado en angiogénesis reparativa, posiblemente participando en la respuesta proliferativa o quizá promoviendo la adquisición de un estado indiferenciado por parte de las células vasculares. Por otro lado la activación de WT1 en condiciones de hipoxia sugiere que el factor de transcripción HIF-1 (factor inducible por hipoxia) podría ser un candidato a activador transcripcional de WT1.

### **Implicaciones de WT1 en patologías renales y genitales**

Como hemos dicho, se han localizado mutaciones en el locus WT1 asociadas a un porcentaje relativamente reducido de tumores de Wilms<sup>68</sup> y a la totalidad de los casos de síndromes WAGR, Denys-Drash<sup>69</sup> y Frassier<sup>70</sup>.

El tumor de Wilms se caracteriza por una proliferación de células indiferenciadas del blastoma renal que normalmente deberían diferenciarse o morir. Se distinguen tres tipos de tumor, el trifásico, en el que el blastema aparece asociado a tejido epitelial y estromal, una variante fundamentalmente estromal, a la que pertenecen la mayor parte de los que presentan mutaciones en WT1 y una variante con tejidos ectópicos, fundamentalmente músculo esquelético, pero también cartilago y hueso. Resulta interesante que la expresión de genes miogénicos, inductores de la diferenciación muscular, tales como *Myf5* o *MyoD*, sólo se produce en tumor de Wilms en los casos en que hay pérdida de función de WT1<sup>22</sup>. Esto es consistente con un papel represor de la diferenciación desempeñado por WT1 y en concreto con la represión de *MyoD* constatada *in vitro*.

El síndrome WAGR está causado por una deleción en el cromosoma 11 que afecta al locus WT1 y a ciertos loci cercanos, causantes del tumor de Wilms, aniridia, anomalías genitales y retraso mental. La aniridia se atribuye a la deleción de *pax-6* localizado en el locus 11p13, es decir, muy próximo al locus WT1 y por tanto susceptible de ser afectado por la misma deleción. De hecho, en los pacientes con aniridia es posible predecir, por hibridación *in situ* fluorescente (FISH), el riesgo de desarrollar tumor de Wilms, utilizando sondas que reconocen la llamada región crítica WT1/*Pax-6*<sup>71</sup>.

El síndrome de Denys-Drash (DDS) se caracteriza por una nefropatía temprana (secundaria a esclerosis mesangial) asociada a pseudohermafroditismo y a predisposición a desarrollar tumor de Wilms. Está causado por mutaciones puntuales intragénicas, normalmente en los dominios correspondientes a los dedos de zinc, que modifican la capacidad de la proteína para unirse al DNA<sup>69,72</sup>. Por consiguiente, tanto las mutaciones que causan DDS como las que producen WAGR se caracterizan por un alelo normal, pero sólo las primeras causan insuficiencia renal. Esto ilustra claramente la diversidad de las funciones de WT1 y la complejidad de su regulación. En el caso del síndrome WAGR no existe copia mutada, ya que la deleción cromosómica en 11p impide la transcripción. En cambio, la proteína mutada en el síndrome DDS es todavía capaz de interaccionar con otras proteínas, incluida la proteína WT1 normal, modulando su función y actuando como un verdadero "dominante negativo". Es importante señalar que se ha conseguido un modelo animal del síndrome DDS, consistente en un ratón portador de una mutación que afecta al tercer dedo de zinc (*zinc finger*) de WT1. Estos ratones

desarrollan también esclerosis mesangial y anomalías genitales<sup>73</sup>.

El síndrome de Frasier se caracteriza por disgenesia gonadal masculina y nefropatía severa causada por esclerosis mesangial focal, de aparición más tardía que la debida al síndrome de Denys-Drash. Se han observado defectos a nivel ultraestructural en los podocitos, uno de los pocos tipos celulares que mantienen la expresión de WT1 en adultos<sup>74</sup>. Se observa también una predisposición al desarrollo de gonadoblastoma más que al de tumor de Wilms. Se ha comprobado que la mutación de WT1 no implica una pérdida de función, sino que causa la ausencia de producción de la isoforma +KTS por el alelo mutado, mientras que el otro alelo produce ambas formas<sup>70</sup>. La simple alteración del equilibrio hacia un predominio de la isoforma +KTS tiene por tanto efectos muy graves, demostrando cómo la exacta dosificación de las diferentes isoformas de la proteína es de una importancia capital. De todas formas se ha señalado que es posible que los dos síndromes, Denys-Drash y Frasier, sean extremos de un espectro continuo de alteraciones debidas a mutaciones diversas en el locus WT1<sup>75</sup>.

### WT1 y cáncer

Diversas variedades de leucemia aparecen con relativa frecuencia asociadas al síndrome WAGR. Esto llevó a buscar mutaciones del locus WT1 en células leucémicas y se comprobó de esta forma que este gen aparece mutado en un 20% de los casos de leucemias mielóide aguda y linfóide aguda (AML/ALL)<sup>76</sup> (King-Underwood et al., 1996). La expresión de la variante normal de WT1 es también un marcador de leucemias y síndromes mielodisplásicos<sup>77</sup>. Se ha señalado que la expresión de WT1 es un indicador de mal pronóstico en leucemia mielóide<sup>78</sup>, aunque tanto esto como la existencia de mutaciones de WT1 asociadas a leucemias han sido cuestionados en otros trabajos<sup>79,80</sup>. En determinados casos se ha comprobado que la disminución de la expresión, forzada con oligonucleótidos antisentido, provocaba diferenciación, apoptosis de las células de leucemia mielóide o ambas<sup>81</sup>. Según esto, WT1 promovería proliferación en lugar de diferenciación en las células leucémicas, un resultado opuesto a los modelos de desarrollo renal en los que WT1 ejercería una función inhibidora del crecimiento celular y promotora de la diferenciación.

Por otro lado, es interesante señalar la expresión de WT1 en precursores hematopoyéticos CD34+ de la médula ósea

<sup>82</sup>. Esta expresión es muy baja, alrededor de 100 veces menor que en células leucémicas. No obstante, una pequeña proporción de células CD34+, alrededor del 1%, expresa WT1 a niveles comparables a los de las células leucémicas<sup>83</sup>. Este fenómeno se detectó tanto entre los precursores quiescentes, no comprometidos CD34+/CD38- como entre los comprometidos y proliferantes CD34+/CD38+. Es muy incierto el significado de esta observación.

### Conclusiones y perspectivas

Pocos genes implicados en enfermedades humanas están revelando características tan sorprendentes e insospechadas como WT1. Este gen juega un doble papel como supresor tumoral (probablemente por su implicación en el control del ciclo y de la supervivencia celular) y como gen esencial en el desarrollo de determinados órganos (riñón, gónadas, adrenales, bazo y corazón). Los diferentes productos polipeptídicos codificados por el gen parecen generarse en proporciones exquisitamente reguladas y desempeñan funciones precisas, en ocasiones muy diferentes entre sí e incluso antagonistas. Estas características peculiares de WT1 tienen su reflejo en las múltiples propuestas acerca de sus funciones fisiológicas, funciones que afectan a aspectos variados y esenciales de la biología celular como crecimiento, diferenciación o apoptosis.

Por otro lado la proteína WT1 es capaz de funcionar como activador transcripcional uniéndose a DNA, como regulador del procesamiento del RNA y como modulador de la función de otras proteínas, a las cuales se une directamente. Esto quiere decir que la actuación reguladora de un mismo factor se puede producir a tres niveles de la expresión génica, la transcripción del DNA, el procesamiento del RNA mensajero y el producto de la traducción de dicho mensajero. La combinación de los distintos niveles de regulación con las funciones de las diferentes isoformas configura un panorama único de diversidad funcional, que probablemente explica cómo están implicadas en patologías tan diversas las anomalías de expresión de WT1.

En el futuro inmediato las nuevas técnicas de microarreglos (*microarrays*) o chips de DNA permitirán sin duda profundizar en las funciones reales de WT1 *in vivo*, y caracterizar los efectos de la expresión normal y alterada de las diferentes isoformas. De esta forma será posible identificar los genes regulados por WT1 y en particular, los mecanismos que controlan su propia expresión. Esto se hace especialmente importante en cuanto consideramos



que entre los genes regulados por WT1 debe haber algunos esenciales en el desarrollo y en la supresión tumoral. Por otro lado, será fundamental conocer cuáles son las funciones precisas desempeñadas por WT1 en el desarrollo, en especial en aquellos órganos que sufren agenesia o anomalías graves en su morfogénesis y en procesos reparativos tales como la angiogénesis. En un plazo breve será publicada la secuencia del gen WT2 y será posible conocer si las características de este segundo gen son comparables a las de WT1. Por último, el rescate parcial del fenotipo mutante y la expresión controlada de variantes mutadas mediante transgénesis permitirán conocer cómo se desarrollan las patologías causadas por las variantes mutadas de WT1.

### Agradecimientos

Las investigaciones sobre WT1 realizadas por nuestro grupo están financiadas por los proyectos PM98-0219 y SAF2002-02651 del Ministerio de Ciencia y Tecnología de España.

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Pritchard-Jones K, Fleming S, Davidson D, Bickmore W, Porteous D, Gosden C, Bard J, Buckler A, Pelletier J, Housman D. The candidate Wilms' tumour gene is involved in genitourinary development. *Nature* 1990;346:194-7
- Coppes MJ, Wolff JE, Ritchey ML. Wilms tumour: diagnosis and treatment. *Paediatr Drugs* 1999;1:251-62
- Call K, Glaser T, Ito C, Buckler A, Pelletier J, Haber D, Rose E. Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus. *Cell* 1990;60:509-20
- Gessler M, Poustka A, Cavenee W, Neve RL, Orkin SH, Bruns GAP. Homozygous deletion in Wilms tumours of a gene identified by chromosome jumping. *Nature* 1990;343:774-8
- Karnik P, Chen P, Paris M, Yeger H, Williams BR. Loss of heterozygosity at chromosome 11p15 in Wilms tumors: identification of two independent regions. *Oncogene* 1998;17:237-40
- Davies R, Moore A, Schedl A, Bratt E, Miyahawa K, Ladomery M, Miles C, Menke A, van Heyningen V, Hastie N. Multiple roles for the Wilms' tumor suppressor, WT1. *Cancer Res* 1999;59(suppl):1747s-50s
- Little M, Homes G, Walsh P. WT1: what has the last decade told us? *Bioessays* 1999;21:191-202
- Lee SB, Haber DA. Wilms tumor and the WT1 gene. *Exp Cell Res* 2001;264:74-99
- Haber DA, Sohn RL, Buckler AJ, Pelletier J, Call KM, Housman DE. Alternative splicing and genomic structure of the Wilms' tumour gene WT1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:9618-22
- Bickmore WA, Oghene K, Little MH, Seawright A, van Heyningen V, Hastie ND. Modulation of DNA binding specificity by alternative splicing of the Wilms tumor wt1 gene transcript. *Science* 1992;257:235-7
- Larsson SH, Charlier JP, Miyagawa K, Engelkamp D, Rassoulzadegan M, Ross A, Cusin F, van Heyningen V, Hastie ND. Subnuclear localization of WT1 in splicing or transcription factor domains is regulated by alternative splicing. *Cell* 1995;81:391-401
- Rauscher FJIII. The WT1 Wilms' tumor gene product: a developmentally regulated transcription factor in the kidney that functions as a tumor suppressor. *FASEB J* 1993;7:896-903
- Wang ZY, Madden SL, Deul TF, Rauscher FJIII. The Wilms' tumor gene product, WT1, represses transcription of the platelet-derived growth factor  $\alpha$ -chain gene. *J Biol Chem* 1992;267:21999-22002
- Ward A, Pooler JA, Miyagawa K, Duarte A, Hastie ND, Caricasole A. Repression of promoters for the mouse insulin-like growth factor II-encoding gene (Igf2) by products of the Wilms' tumor suppressor gene WT1. *Gene* 1995;167:239-43
- Dey BR, Sukhatme VP, Roberts AB, Sporn MB, Rauscher FJIII, Kim SJ. Repression of the transforming growth factor- $\beta$  1 gene by the Wilms' tumor suppressor WT1 gene product. *Mol Endocrinol* 1994;8:595-602
- Werner H, Rauscher FJ, Sujhatme VP, Drummond IA, Roberts CT, LeRoth D. Transcriptional repression of the insulin-like growth factor 1 receptor (IGFR1) gene by the tumor suppressor WT1 involves binding to sequences both upstream and downstream of the IGF1R gene transcription start site. *J Biol Chem* 1994;269:12577-82
- Englert C, Hou X, Maheswaran S, Bennett P, Ngwu C, Re GG, Garvin AJ, Rosner MR, Haber D. WT1 suppresses synthesis of the epidermal growth factor receptor and promotes apoptosis. *EMBO J* 1995;14:4664-75
- Goohyer P, Dehbi M, Torban E, Bruening W, Pelletier J. Repression of the retinoic acid receptor- $\alpha$  gene by the Wilms' tumor suppressor gene product. *Oncogene* 1995;10:1125-9
- Ryan G, Steele-Perkins V, Morris JF, Rauscher FJ, Dressler GR. Repression of Pax-2 by WT1 during normal kidney development. *Development* 1995;121:867-75
- McCann S, Sullivan J, Guerra J, Arcinas M, Boxer LM. Repression of the c-myc gene by WT1 protein in T and B cells. *J Biol Chem* 1995;270:23785-9
- Hewitt SM, Hamada S, McDonnell TJ, Rauscher FJIII, Saunders GF. Regulation of the proto-oncogenes *Bcl-2* and *c-myc* by the Wilms' tumor suppressor gene WT1. *Cancer Res* 1995;55:5386-9
- Miyagawa K, Kent J, Moore A, Charlier JP, Little MH, Williamson KA, Kelsey A, Brown KW, Hassam S, Briner J, Hayashi Y, Hirai H, Yazaki Y, Vanheyningen V, Hastie ND. 1998 Loss of WT1 function leads to ectopic myogenesis in Wilms tumor. *Nature Genet* 1998;18:15-7
- Rupprecht H, Drummond I, Madden S, Rauscher F, Sukhatme V. The Wilms' tumour suppressor gene WT1 is negatively autoregulated. *J Biol Chem* 1994;269:6196-6206
- Loeb DM, Korz D, Katsnelson M, Burwell EA, Friedman AD, Sukumar S. Cyclin E is a target of WT1 transcriptional repression. *J Biol Chem* 2002;277:19627-32
- Adachi Y, Matsubara S, Pedraza C, Ozawa M, Tsutsui J, Takamatsu H, Noguchi H, Akiyama T, Muramatsu T. Midkine as a novel target for the Wilms' tumor suppressor gene (WT1). *Oncogene* 1996;13:2197-2203



26. Moshier JA, Skunca M, Wu W, Boppana SM, Rauscher F, Doescu J. Regulation of ornithine decarboxylase gene expression by the Wilms' tumor suppressor WT1. *Nucleic Acids Res* 1996;24:1149-57
27. Englert C, Maheswaran S, Garvin AJ, Kreidberg J, Haber DA. Induction of p21 by the Wilms' tumor suppressor gene WT1. *Cancer Res* 1997;57:1429-34
28. Cook DM, Kinkes MT, Bernfield M, Rauscher F. Transcriptional activation of the syndecan-1 promoter by the Wilms' tumor protein WT1. *Oncogene* 1996;272:2901-13
29. Lee SB, Huang K, Palmer R, Truong VB, Herzlinger D, Kolquist KA, Wong J, Paulding C, Yoon SK, Gerald W, Oliner JD, Haber DA. The Wilms' tumor suppressor WT1 encodes a transcriptional activator of amphiregulin. *Cell* 1999;98:663-73
30. Hosono S, Gross I, English MA, Hajra KM, Fearon ER, Licht JD. E-cadherin is a WT1 target gene. *J Biol Chem* 2000;275:10943-53
31. Wagner KD, Wagner N, Sukhatme VP, Scholz H. Activation of vitamin D receptor by the Wilms' tumor gene product mediates apoptosis of renal cells. *J Am Soc Nephrol* 2001;12:1188-96
32. Maurer U, Jehan F, Englert C, Hubinger G, Weidmann E, DeLuca HF, Bergmann L. The Wilms' tumor gene product (WT1) modulates the response to 1,25-dihydroxivitamin D3 by induction of the vitamin D receptor (VDR). *J Biol Chem* 2001;276:3727-32
33. Palmer RE, Kotsiantzi A, Cadman B, Boyd T, Gerald W, Haber DA. WT1 regulates the expression of the major glomerular podocyte membrane protein Podocalyxin. *Curr Biol* 2001;11:1805-9
34. English MA, Licht JD. Tumor-associated WT1 missense mutants indicate that transcriptional activation by WT1 is critical for growth control. *J Biol Chem* 1999;274:13258-63
35. Reddy JC, Hosono S, Licht JD. The transcriptional effect of WT1 is modulated by choice of expression vector. *J Biol Chem* 1995;270:29976-82
36. Reddy JC, Licht JD. The WT1 Wilms' tumor suppressor gene: how much do we really know? *Biochim Biophys Acta* 1996;1287:1-28
37. Menke AL, Van der Eb AJ, Jochemsen AG. The Wilms' tumor 1 gene: oncogene or tumor suppressor gene? *Int Rev Cytol* 1998;181:151-212
38. Dome JS, Coppes MJ. Recent advances in Wilms' tumor genetics. *Curr Opin Pediatr* 2002;12:5-11
39. Shoyab M, McDonald VL, Bradley JG, Todaro GJ. Amphiregulin: a bifunctional growth-modulating glycoprotein produced by the phorbol 12-myristate 13-acetate-treated human breast adenocarcinoma cell line MCF-7. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:6528-32
40. Luetke NC, Wiu TH, Fenton SE, Troyer KL, Riedel RF, Chang A, Lee DC. Targeted inactivation of the EGF and amphiregulin genes reveals distinct roles for EGF receptor ligands in mouse mammary gland development. *Development* 1999;126:2739-50
41. Silberstein GB, Dressler GR, Van Horn K. Expression of the PAX2 oncogene in human breast cancer and its role in progesterone-dependent mammary growth. *Oncogene* 2002;21:1009-16
42. Kennedy D, Ramsdale T, Mattick J, Little M. An RNA recognition motif in Wilms' tumour protein (WT1) revealed by structural modelling. *Nat Genet* 1996;12:329-31
43. Caricasole A, Duarte A, Larsson S, Hastie ND, Little M, Holmes G, Todorov I, Ward A. RNA binding by the Wilms' tumor suppressor (WT1) zinc finger proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:7562-6
44. Bardeesy N, Pelletier J. Overlapping RNA and DNA binding domains of the WT1 tumor suppressor gene product. *Nucleic Acids Res* 1998;26:1784-92
45. Matsushima Y, Matsumura K, Kitagawa Y. Zinc finger-like motif conserved in a family of RNA binding proteins. *Biosci Biotech Biochem* 1997;61:905-6
46. Davis RC, Calvo 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* 1998;12(20):3217-25
47. Maheswaran S, Park S, Bernard A, Morris J, Rauscher F, Hill D, Haber D. Physical and functional interaction between WT1 and p53 proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:5100-4
48. Johnstone RW, See RH, Sells SF, Wang J, Muthukkumar S, Englert C, Haber DA, Licht JD, Sugrue SP, Roberts T, Rangneka VM, Shy Y. A novel repressor par-4, modulates transcription and growth suppression functions of the Wilms' tumor suppressor WT1. *Mol Cell Biol* 1996;16:6945-56
49. Johnstone RW, Wang J, Tommerup N, Vissing H, Roberts T, Shi Y. Cio1 is a novel WD40 protein that interacts with the tumor suppressor protein WT1. *J Biol Chem* 1998;273:10880-7
50. Reddy JC, Morris JC, Wang J, English MA, Haber DA, Shi Y, Licht JD. WT1-mediated transcriptional activation is inhibited by dominant negative mutant proteins. *J Biol Chem* 1995;270:10878-84
51. Englert C, Vidal M, Maheswaran S, Ge YM, Ezzell RM, Iselbacher KJ, Haber DA. Truncated WT1 mutants alter the subnuclear localization of the wild-type protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:11960-4
52. Holmes GP, Botherashvili S, English M, Wainwright BJ, Licht JD, Little M. Two N-terminal self-association domains are required for the dominant negative activity of WT1 Denys-Drash mutant proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;233:723-8
53. Maheswaran S, Englert C, Zheng G, Lee SB, Wong J, Harkin DP, Bean J, Ezzell R, Garvin AJ, McCluskey RT, DeCaprio JA, Haber DA. Inhibition of cellular proliferation by the Wilms' tumor suppressor WT1, requires association with the inducible chaperone Hsp70. *Genes Dev* 1998;12:1108-20
54. Nachtigal MW, Hirokawa Y, Enyeartvanhouten DL, Flanagan JN, Hammer GD, Ingraham HA. Wilms tumor 1 and DAX-1 modulate the orphan nuclear receptor SF-1 in sex-specific gene expression. *Cell* 1998;93:445-54
55. Pelletier J, Schaling M, Buckler AJ, Rogers A, Haber DA, Housman D. Expression of the Wilms' tumor gene WT1 in the murine urogenital system. *Genes Dev* 1991;5:1345-56
56. Rackley RR, Flenniken AM, Kuriyan NP, Kessler PM, Stoler MH, Williams BR. Expression of the Wilms' tumor suppressor gene WT1 during mouse embryogenesis. *Cell Growth Differ* 1993;4:1023-31
57. Armstrong JF, Pritchard-Jones K, Bickmore WA, Hastie ND, Bard JB. The expression of the Wilms' tumor gene, WT1 in the developing mammalian embryo. *Mech Dev* 1993;40:85-97
58. Moore AW, McInnes L, Kreidberg J, Hastie ND, Schedl A. YAC

- complementation shows a requirement for WT1 in the development of epicardium, adrenal gland and throughout nephrogenesis. *Development* 1999;126:1845-57
59. Moore AW, Schedl A, McInnes L, Doyle M, Hecksher-Sorensen J, Hastie ND. YAC transgenic analysis reveals Wilms' tumour 1 gene activity in the proliferating coelomic epithelium, developing diaphragm and limb. *Mech Dev* 1998;79:169-84
  60. Carmona R, González Iriarte M, Pérez Pomares JM, Muñoz-Chápuli R. Localization of the Wilms' tumour protein WT1 in avian embryos. *Cell Tiss Res* 2001;303:173-86
  61. Kreidberg JA, Sariola H, Loring JM, Maeda M, Pelletier J, Housman D, Jaenisch R. WT-1 is required for early kidney development. *Cell* 1993;74:679-91
  62. Kerzer U, Crocoll A, Barton D, Howells N, Englert C. The Wilms' tumor suppressor gene wt1 is required for development of the spleen. *Curr Biol* 1999;9:837-40
  63. Wagner KD, Wagner N, Vidal VPI, 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* 2002;21:1398-1405
  64. Pérez-Pomares JM, Phelps A, Sedmerova M, Carmona R, González-Iriarte M, Muñoz-Chápuli R, Wessels A. Experimental studies on the spatiotemporal expression of WT1 and RALDH2 in the embryonic avian heart: a model for the regulation of myocardial and valvuloseptal development by epicardially-derived cells (EPDCs). *Dev Biol* 2002;247:307-26
  65. Sucov HM, Dyson E, Gumeringer CL, Price J, Chien KR, Evand RM. RXR $\alpha$  mutant mice establish a genetic basis for vitamin A signaling in heart morphogenesis. *Genes Dev* 1994;8:1007-18
  66. Chen J, Kubalak SW, Chien KR. Ventricular muscle-restricted targeting of the RXPalpha gene reveals a non-cell-autonomous requirement in cardiac chamber morphogenesis. *Development* 1998;125:1943-9
  67. Wagner KD, Wagner N, Bondke A, Nafz B, Flemming B, Theres H, Scholz H. The Wilms' tumor suppressor WT1 is expressed in the coronary vasculature after myocardial infarction. *FASEB J* 2002;16:1117-19
  68. Little M, Wells C. A clinical overview of WT1 gene mutations. *Hum Mutat* 1997;9:209-25
  69. Pelletier J, Bruening W, Kashtan C, Mauer S, Manivel J, Striegel J, Houghton DC, Junien C, Habib R, Fouser L. Germline mutations in the Wilms' tumor suppressor gene are associated with abnormal urogenital development in Denys-Drash syndrome. *Cell* 1991;67:437-47
  70. Barbaux S, Niaudet P, Gubler MC, Grunfeld JP, Jaubert F, Kuttent F, Fekete CN, Souleyreautherville N, Thibaud E, Fellous M, McElreavey K. Donor-splice-site mutations in WT1 are responsible for Frasier-syndrome. *Nature Genet* 1997;17:467-70
  71. Muto R, Yamamori S, Ohashi H, Osawa M. Prediction by FISH analysis of the occurrence of Wilms tumor in aniridia patients. *Am J Med Genet* 2001;108:285-9
  72. Santos A, Groves N, Jadresic L, Cowell JK. Constitutional mutations in the WT1 gene in patients with Denys-Drash syndrome. *Hum Mol Gen* 1992;1:301-5
  73. Patek CE, Little MH, Fleming S, Miles C, Charlieu JP, Clarke AR, Migawa K, Christie S, Doig J, Harrison DJ, Porteus DJ, Brookes AJ, Hooper ML, Hastie ND. A zinc finger truncation of murine WT1 results in the characteristic urogenital abnormalities of Denys-Drash syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:2931-6
  74. Quaggin SE. Transcriptional regulation of podocyte specification and differentiation. *Microsc Rs Tech* 2002;57:208-11
  75. Koziell A, Charmandari E, Hindmarsh PC, Lees L, Scambler P, Brook CGD. Frasier syndrome, part of the Denys-Drash continuum or simply a WT1 gene associated disorder of intersex and nephropathy? *Clin Endocrinol* 2000;52:519-24
  76. King-Underwood L, Renshaw J, Pritchard-Jones K. Mutations in the Wilms' tumor gene WT1 in leukemias. *Blood* 1996;87:2171-9
  77. Sugiyama H. Wilms' tumor gene WT1: its oncogenic function and clinical application. *Int J Hematol* 2001;73:177-87
  78. Bergmann L, Miething C, Maurer U, Brieger J, Karakas T, Weidmann E, Hoelzer D. High levels of Wilms' tumor gene (wt1) mRNA in acute myeloid leukemias are associated with a worse long-term outcome. *Blood* 1997;90:1217-25
  79. Carapeti M, Goldman JM, Cross NCP. Dominant-negative mutations of the Wilms' tumour predisposing gene (WT1) are infrequent in CML blast crisis and de novo acute leukaemia. *Eur J Haematol* 1997;58:346-9
  80. Schmid D, Hinze G, Linnerth B, Tisljar K, Kusec R, Geissler K, Sillaber C, Laczika K, Mitterbauer M, Zochbauer S, Mannhalter C, Haas OA, Lechner K, Jager U, Gaiger A. Prognostic significance of WT1 gene expression at diagnosis in adult de novo acute myeloid leukemia. *Leukemia* 1997;11:639-43
  81. Algar EM, Khromykh T, Smith SI, Blackburn DM, Bryson GJ, Smith PJ. WT1 antisense oligonucleotide inhibits proliferation and induces apoptosis in myeloid leukaemia cell lines. *Oncogene* 1996;12:1005-14
  82. Baird PN, Simmons PJ. Expression of the Wilms' tumor gene (WT1) in normal hemopoiesis. *Exp Hematol* 1997;25:312-20
  83. Hosen N, Sonoda Y, Oji Y, Kimura T, Minamiguchi H, Tamaki H, Kawakami M, Asada M, Kanato K, Motomura M, Oka Y, Soma T, Ogawa H, Sugiyama H. Very low frequencies of human normal CD34+ haematopoietic progenitor cells express the Wilms' tumour gene WT1 at levels similar to those in leukaemia cell. *Br J Haematol* 2002;116:409-20
  84. Rodeck U, Bossler A, Kari C, Humphrys CW, Gyorfí T, Maurer J, Thiel E, Menssen HD. Expression of the WT1 Wilms' tumor gene by normal and malignant human melanocytes. *Int J Cancer* 1994;59:78-82
  85. Loeb DM, Evron E, Patel CB, Sharma PM, Niranjana B, Buluwela L, Weitzman SA, Korz D, Sukumar S. Wilms' tumor suppressor gene (WT1) is expressed in primary breast tumors despite tumor-specific promoter methylation. *Cancer Res* 2001;61:921-5
  86. Kumar-Singh S, Segers K, Rodeck U, Backhovens H, Bogers J, Weyler J, Van-Broeckhoven D, Van-Marck E. WT1 mutation in malignant mesothelioma and WT1 immunoreactivity in relation to p53 and growth factor receptor expression, cell-type transition, and prognosis. *J Pathol* 1997;181:67-74
  87. Ladanyi M, Gerald W. Fusion of the EWS and WT1 genes in the desmoplastic small round cell tumor. *Cancer Res* 1994;54:350-9
  88. Lee SB, Kolquist KA, Nichols K, Englert C, Maheswaran S, Ladanyi M, Gerald WL, Haber DA. The EWS-WT1 translocation product induces PDGFA in desmoplastic small round-cell tumour. *Nature Genet* 1997;17:309-13