

Expressions- und Mutationsanalysen in kindlichen Wilms Tumoren

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Dr. Birgit Zirn, geb. Maurer
aus Köln

Würzburg, 2006

Eingereicht am: 01.12.2005

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. M. Müller

Gutachter: Prof. Dr. M. Gessler

Gutachter: Prof. Dr. R. Benavente

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Für Oliver -

der durch liebevolle Unterstützung und kontinuierliche Ermutigung
einen wesentlichen Anteil an der Entstehung der vorliegenden Arbeit hat.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Historischer Rückblick: Max Wilms	1
1.2 Klinik des Wilms Tumors	2
1.2.1 Epidemiologie ..	2
1.2.2 Klinische Symptomatik und Diagnosestellung	2
1.2.3 Ätiologie, Pathologie und Klassifikation	4
1.2.4 Therapie.....	6
1.2.5 Rezidiv	7
1.2.6 Prognose	7
1.2.7 Assoziierte Syndrome	8
1.3 Genetik des Wilms Tumors.....	9
1.3.1 Das Wilms Tumor Gen 1 (<i>WT1</i>)	9
1.3.2 β -catenin und der Wnt Signalweg	10
1.4 Zielsetzung und Aufbau der Arbeit.....	12
2. Identifikation von Genen, die für die Wilms Tumor Progression relevant sind (Publikation 1)	14
2.1 Expressionsanalysen bei Tumorerkrankungen (Stand der Forschung)	14
2.2 Experimentelle Durchführung.....	15
2.2.1 Microarray-Hybridisierungen von 77 Wilms Tumorproben.....	15
2.2.2 Statistische Auswertung der Expressionsdaten	16
2.2.3 Verifizierung der Expressionsdaten mittels Real Time PCR	17
2.2.4 Analyse von überrepräsentierten Genen und Gengruppen mittels EASE.....	17
2.3 Zusammenfassung der Ergebnisse und der Diskussion	18
2.3.1 Genexpressionsunterschiede bei verschiedenen klinischen Variablen	18
2.3.2 Kandidatengene für die Tumorprogression.....	26
2.3.3 Beteiligung des Retinsäure- und des E2F-Signalwegs an der Tumorprogression	27
3. Retinsäurebehandlung von Wilms Tumorzellen (Publikation 2)	28
3.1 Einsatz von all-trans Retinsäure in der Tumorbehandlung	28
3.2 Retinsäure als neue Therapie bei fortgeschrittenen Wilms Tumoren?	28
3.3 Durchführung der Experimente und Ergebnisse	28

3.4 Diskussion	31
3.4.1 Inverse Genregulation nach Retinsäure Behandlung	31
3.4.2 Der Retinsäure Signalweg in Wilms Tumoren	33
3.4.3 Einfluß der Retinsäure Behandlung auf andere Signalwege.....	34
3.4.4 Konsequenzen dieser Experimente für die potentielle klinische Anwendung von Retinsäure bei fortgeschrittenen Wilms Tumoren.....	35
4. Wilms Tumoren und der <i>Wnt</i> Signalweg (Publikationen 3 und 4).....	37
4.1 Identifizierung neuer Kandidatengene aus dem <i>Wnt/β-catenin</i> Signalweg in Wilms Tumoren (Publikation 3)	37
4.1.1 Experimentelle Durchführung	38
4.1.1.1 Mutationsanalyse und Microarray Experimente	38
4.1.1.2 Immunhistochemische Untersuchungen	39
4.1.2 Ergebnisse und Diskussion.....	39
4.1.2.1 Deregulierte Gene des <i>Wnt</i> Signalwegs in Wilms Tumoren.....	42
4.1.2.2 Differentielle Regulation Muskel-spezifischer Gene in Wilms Tumoren mit <i>β-catenin</i> Mutationen	44
4.2 Untersuchung von <i>Chibby</i> , einem neuen Antagonisten des <i>Wnt</i> Signalweges (Publikation 4).....	45
4.2.1 Durchführung der Experimente	46
4.2.2 Ergebnisse und Diskussion.....	46
5. Neue Keimbahn <i>WT1</i> Mutation in einer Familie mit Wilms Tumor und Nephropathie (Publikation 5).....	49
5.1 Fallbeschreibung und methodische Durchführung	49
5.2 Ergebnisse und Diskussion.....	50
6. Zusammenfassung (deutsch und englisch).....	53
7. Literatur	57
Danksagung.....	65
Lebenslauf	66
Publikationsliste	68
Anhang mit Publikationen 1 bis 5.....	70

1. Einleitung

1.1 Historischer Rückblick: Max Wilms

Der Namensgeber des Wilms Tumors war der Pathologe und Chirurg Max Wilms (1867-1918; Abbildung 1). Während seiner Ausbildung machte er Untersuchungen über gemischte Tumoren, die er in der Arbeit „Die Mischgeschwülste“ (Wilms 1899) zusammenfasste (Abbildung 2). Im ersten Heft „Die Mischgeschwülste der Niere“ beschreibt Max Wilms die Entstehung von kindlichen Nierentumoren aus Zellen des mittleren Keimblattes und vergleicht diese Tumorvergrößerung mit dem Wachstum eines Embryos aus undifferenzierten Keimzellen. Nierentumorzellen sind demnach bereits im Embryo angelegt und wachsen mit unterschiedlicher Geschwindigkeit zu morphologisch unterschiedlichen „Geschwülsten der Niere“. Einzelne Fallbeschreibungen von kindlichen Nierentumoren waren bereits zuvor veröffentlicht worden (z.B. Rance 1814; Cohnheim 1875), jedoch fasste Max Wilms diese Tumoren unterschiedlicher Morphologie erstmals zu einer Einheit zusammen, als deren gemeinsame Ursache er einen embryonalen Entwicklungsfehler beschreibt.



Abbildung 1: Max Wilms (1867-1918)

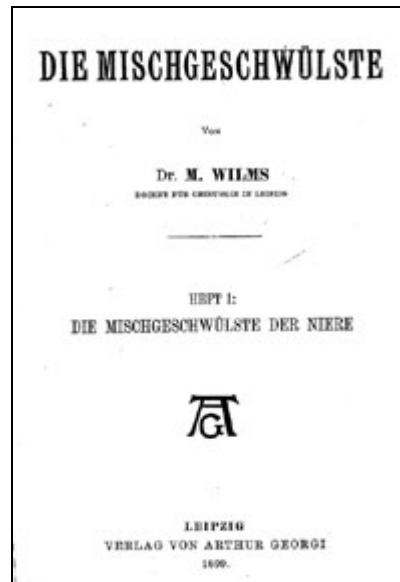


Abbildung 2: Die 1899 erschienene Arbeit „Die Mischgeschwülste der Niere“ von Max Wilms

Zusätzlich zu dieser Beschreibung des kindlichen Nierentumors, der später nach ihm als „Wilms Tumor“ bezeichnet wurde, ist Max Wilms als Erfinder mehrerer medizinischer Geräte (z.B. Quecksilbermanometer zur Liquordruckmessung (Wilms 1897) und Operationstechniken sowie als Verfasser des „Lehrbuchs der Chirurgie“ (Wullstein and Wilms 1918) in die Geschichte eingegangen. Gegen Ende des ersten Weltkrieges infizierte er sich bei einer Notoperation eines an Diphtherie erkrankten Offiziers und starb wenige Tage später an einer Diphtherie-assoziierten Sepsis, sein Patient dagegen überlebte (Coppes-Zantinga and Copes 1999).

1.2 Klinik des Wilms Tumors

1.2.1 Epidemiologie

Der Wilms Tumor (Nephroblastom) ist der häufigste Nierentumor bei Kindern und Jugendlichen mit einer Inzidenz von etwa 1: 10.000. In Deutschland treten jährlich etwa 100-150 Neuerkrankungen auf, in Nordamerika sind es etwa 650. In Asien ist die Inzidenz vergleichsweise geringer (Breslow et al. 1993).

Bezogen auf alle kindlichen Malignome (solide Tumoren und Leukämien) hat der Wilms Tumor einen Anteil von etwa 6% (Kaatsch et al. 1996). Die Altersverteilung zeigt eine Häufung zwischen dem zweiten und dritten Lebensjahr. Bilaterale Tumoren, die einen Anteil von ca. 5% aller Wilms Tumore ausmachen, treten meist bei noch jüngeren Kindern auf.

1.2.2 Klinische Symptomatik und Diagnosestellung

Das Hauptsymptom und erste klinische Zeichen des Wilms Tumors ist häufig die schmerzlose Tumorschwellung (Abbildung 3). Meist beobachten die Eltern bei einem sonst unauffälligen Kind einen vorgewölbten und verhärteten Bauch. Ein kleinerer Anteil von Wilms Tumoren wird im Rahmen der Vorsorgeuntersuchungen beim Kinderarzt (insbesondere U3 und U4) entdeckt. Eine Hämaturie ist das häufigste klinische Symptom.

Diagnosestellung durch	Häufigkeit (%)
Asymptomatische Tumorschwellung	62
Hämaturie	15
Vorsorgeuntersuchung	9
Obstipation	4
Gewichtsverlust	4
Harnwegsinfekt	3
Diarrhoe	3




Abbildung 3: Häufigkeit verschiedener Ursachen, die zur Diagnosestellung eines Wilms Tumors führten (Graf and Reinhard 2003).

Die Diagnosestellung eines Wilms-Tumors erfolgt durch bildgebende Verfahren (meist abdomineller Ultraschall und Magnetresonanztomographie, siehe Abbildung 4). Tumormarker sind nicht bekannt. Zur Abgrenzung von der wichtigsten Differenzialdiagnose, des Neuroblastoms, kann eine Untersuchung des Urins auf Katecholamine erfolgen, die häufig vom Neuroblastom gebildet und im Urin detektierbar sind. Eine primäre Tumorbiopsie ist nur bei uneindeutiger bildgebender Diagnose bei Kindern unter sechs Monaten und Jugendlichen über 16 Jahren notwendig, da aufgrund des Alters andere Tumoren in Betracht gezogen werden müssen. Die zuverlässige Diagnosestellung ist von großer Bedeutung, da die Therapie bei den meisten Kindern mit einer präoperativen Chemotherapie beginnt. Daher wird meist eine referenzradiologische Beurteilung durchgeführt. Die Rate einer bildgebenden Fehldiagnose mit der Konsequenz einer nicht indizierten präoperativen Chemotherapie liegt bei diesem Vorgehen unter 5% (Graf and Reinhard 2003).

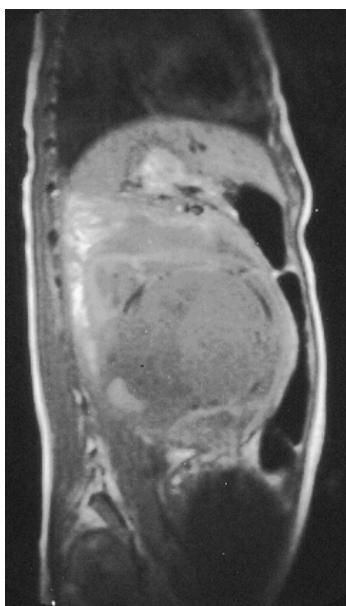


Abbildung 4: Magnetresonanztomographie eines großen Wilms Tumors.

1.2.3 Ätiologie, Pathologie und Klassifikation

Als Vorstufe eines Wilms Tumors werden nephrogene Reste bzw. eine Nephroblastomatose angesehen. Dies sind Residuen primitiven embryonalen Gewebes mit hoher mitotischer Aktivität. Nephrogene Reste finden sich bei etwa 40% aller Kinder mit Wilms Tumoren, sind dagegen bei Kindern ohne Wilms Tumor sehr selten (<1%). Man nimmt an, dass diese nephrogenen Reste maligne entarten und damit zur Entstehung eines Wilms Tumors führen können (Abbildung 5). Das darin enthaltene embryonale Gewebe (metanephritisches Blastem) kann in verschiedene histologische Typen differenzieren, z.B. Epithel, Stroma und Blastem. Daher finden sich in vielen Wilms Tumoren komplexe histologische Strukturen aus verschiedenen Gewebetypen. Meist sind alle drei Gewebetypen in einem Tumor vorhanden, der entsprechend als triphasischer Wilms Tumor bezeichnet wird (Abbildung 6). Überwiegt einer der drei Gewebetypen, so wird der Tumor als epithel-, stroma- oder blastemreich bezeichnet.

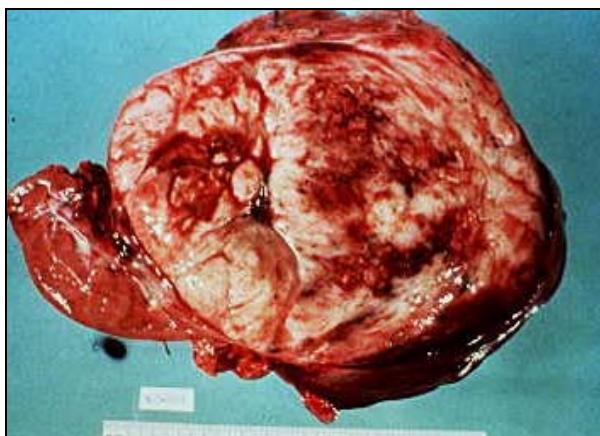


Abbildung 5: Wilms Tumor Resektat mit zystischen Strukturen und Einblutungen.

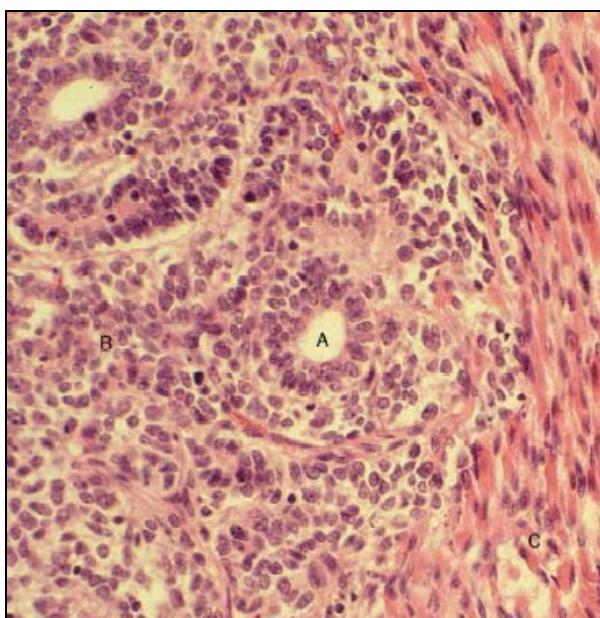


Abbildung 6: Triphasischer Wilms Tumor mit tubulär-epithelialen (A), blastemreichen (B) und stromareichen (C) Anteilen. Färbung mit Hämatoxylin/Eosin (aus Kalapurakal et al. 2004).

Der histologische Subtyp eines Wilms Tumors ist von prognostischer Bedeutung. Entsprechend werden verschiedene Malignitätsgruppen unterschieden: niedrige, intermediäre und hochgradige Malignität. Die meisten Tumoren gehören in die Gruppen der intermediären und hochgradigen Malignität, die zugehörigen histologischen Subtypen sind in Tabelle 1 zusammengefaßt. Dabei wird zwischen primär operierten und präoperativ chemotherapierten Tumoren unterschieden, da der histologische Typ durch die präoperative Chemotherapie verändert werden kann. So zählt der blastemreiche Wilms Tumor nach primärer Operation zur Gruppe der intermediären Malignität, wohingegen seine Einordnung nach präoperativer Chemotherapie bei den hochgradig malignen Tumoren erfolgt. Das überlebende Blastem erwirbt scheinbar eine Resistenz gegen die Chemotherapie. Möglicherweise spielen hierbei Selektionseffekte gegen zwei zuvor vorhandene, aber histologisch nicht unterscheidbare Gewebetypen eine Rolle (Weirich et al. 2004).

Tabelle 1: Klassifikation der histologischen Subtypen der Wilms Tumore in Standard- und Hochrisikogruppen in Abhängigkeit von der vorausgehenden Therapie.

Risikogruppe	Nach präoperativer Chemotherapie	Nach primärer Operation
Standardrisiko Intermediäre Malignität (intermediate risk)	Epithelialer Typ Stromareicher Typ Mischtyp Regressiver Typ Fokale Anaplasie	Epithelialer Typ Stromareicher Typ Blastemreicher Typ Mischtyp Regressiver Typ Fokale Anaplasie
Hohes Risiko Hohe Malignität (high risk)	Blastemreicher Typ Diffuse Anaplasie	Diffuse Anaplasie

Zusätzlich zur histologischen Subtypisierung (grading) wird eine operative Stadieneinteilung vorgenommen (staging). Diese richtet sich nach der lokalen Ausbreitung des Tumors (Tumorkapsel intakt oder durchbrochen), dem Befall von Lymphknoten sowie dem Metastasenstatus und sieht fünf Stadien vor (Tabelle 2).

Tabelle 2: Stadieneinteilung des Wilms Tumors (Graf and Reinhard 2003).

Stadium	Ausdehnung
I	Auf Niere beschränkter Tumor, intakte Tumorkapsel
II	Tumor überschreitet die Kapsel, kann aber vollständig entfernt werden, Lymphknoten negativ (Stadium IIa) oder positiv (Stadium IIb)
III	Unvollständige Tumorentfernung, Lymphknoten positiv, keine Fernmetastasen
IV	Fernmetastasen (insbesondere Lunge, Leber, Knochen, Gehirn)
V	Bilateraler Wilms Tumor

1.2.4 Therapie

Die Therapie des Wilms Tumors erfolgt in Europa nach dem Protokoll der SIOP (Internationale Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie). Demnach erhalten Kinder zwischen sechs Monaten und 16 Jahren zunächst eine vier- bis sechswöchige Chemotherapie, bei der Vincristin und Actinomycin die wichtigsten Medikamente darstellen. Anthrazykline werden nur bei höheren Stadien und höherer Malignität eingesetzt. Im Fall eines Rezidivs kommen zusätzlich Etoposid, Carboplatin und Alkylantien zur Anwendung. Der Vorteil der präoperativen Chemotherapie liegt in einer deutlichen Tumorvolumenreduktion von durchschnittlich 400 ml vor Beginn der Chemotherapie auf unter 200 ml nach Durchführung einer vierwöchigen Chemotherapie (Graf and Reinhard 2003). Damit wird zum einen der Anteil der Patienten mit niedrigeren Tumorstadien erhöht, zum anderen wird die Gefahr einer intraoperativen Tumorruptur mit Aussaat der Tumorzellen im Bauchraum deutlich gesenkt. Anschließend erfolgt bei einseitigem Wilms Tumor eine operative Tumor- und Nierenentfernung (Tumornephrektomie) ohne vorherige Biopsie. Intraoperativ erfolgt ein abdominelles Staging mit Biopsie der angrenzenden Lymphknoten. Bei bilateralem Tumor wird das Tumorgewebe möglichst vollständig entfernt, wobei versucht wird, einen Teil des angrenzenden Nierengewebes zu erhalten (partielle Nephrektomie), um eine Dialysepflichtigkeit zu verhindern.

Bei Patienten mit einem Wilms Tumor vom Standardrisikotyp im Stadium I ist keine weitere postoperative Therapie notwendig. Bei höheren Stadien ist jedoch eine postoperative Therapie in Form einer Strahlen- und/oder Chemotherapie indiziert. Die Dosierung dieser Therapie richtet sich nach dem Tumorstadium und dem histologischen Subtyp des Tumors. Abbildung 7 gibt einen allgemeinen Überblick über das therapeutische Vorgehen.

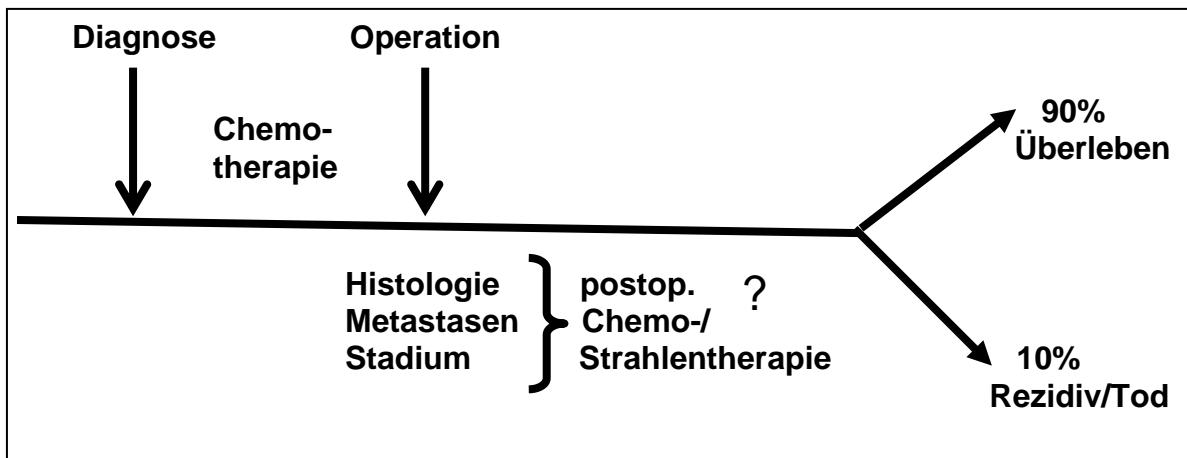


Abbildung 7: Schematischer Überblick über das therapeutische Vorgehen bei der Mehrheit der Patienten mit Wilms Tumor.

Eine primäre Operation ohne vorherige Chemotherapie wird nur bei Kindern unter sechs Monaten und Jugendlichen über 16 Jahren durchgeführt, da diese Gruppen eine höhere Wahrscheinlichkeit haben, nicht an einem Wilms Tumor erkrankt zu sein. Bei Säuglingen findet sich häufiger ein kongenitales mesoblastisches Nephrom, bei Jugendlichen ist mit einem Adenokarzinom zu rechnen.

Die Nachsorge umfasst regelmäßige klinische und bildgebende Untersuchungen (Ultraschall und Röntgen-Thorax) zur frühzeitigen Erkennung eines Rezidivs.

Der Therapieansatz, den die NWTS (National Wilms Tumor Study) in den USA vorsieht, unterscheidet sich vom SIOP-Protokoll in Europa: in den USA wird bei allen Kindern mit Wilms Tumor eine primäre Operation mit anschließender intensiver Strahlen- und/oder Chemotherapie durchgeführt.

1.2.5 Rezidiv

Rezidive des Wilms Tumors betreffen etwa 10% aller Kinder. Die meisten Rezidive treten in einem Zeitraum von drei Jahren nach der Ersterkrankung auf. Risikofaktoren für das Auftreten eines Rezidivs sind höhere Tumorstadien und höhere Malignität. Die Therapie des Rezidivs richtet sich nach dessen Lokalisation sowie der Art und dem Umfang der Therapie bei der Primärerkrankung.

1.2.6 Prognose

Verglichen mit anderen pädiatrischen Neoplasien ist die Prognose des Wilms Tumors relativ gut. Derzeit können etwa 90% aller Kinder mit einem Wilms Tumor geheilt werden (siehe

auch obige Abbildung 7). Die Überlebensrate wird jedoch von klinischen und histologischen Parametern beeinflusst. So ist die Prognose von anaplastischen Wilms Tumoren deutlich schlechter als von Tumoren mit anderen histologischen Subtypen (Weirich et al. 2004). Ebenfalls ist das Auftreten eines Rezidivs mit einer schlechteren Prognose assoziiert. Ein weniger ausgeprägter Einfluß auf die Prognose wurde für das Tumorstadium und das Ansprechen auf die präoperative Chemotherapie beschrieben (Weirich et al. 2004).

1.2.7 Assoziierte Syndrome

Zusätzlich zum Wilms Tumor treten bei etwa 7% aller Kinder kongenitale Fehlbildungen oder assoziierte Syndrome auf. Am häufigsten finden sich urogenitale Anomalien, deren Ausprägung sehr unterschiedlich sein kann und sowohl Fehlbildungen der Niere (z.B. Doppelniere, Hufeisenniere, Nierendysplasie) als auch Genitalfehlbildungen (z.B. Hypospadie, Kryptorchismus, Hodenaplasie) umfasst. Zu den häufigeren assoziierten Syndromen gehören das Denys-Drash-Syndrom sowie das WAGR-Syndrom. Einen Überblick über assoziierte Fehlbildungen und Syndrome bei Wilms Tumor Patienten gibt Tabelle 3.

Tabelle 3: Assoziierte Fehlbildungen und Syndrome bei Patienten mit Wilms Tumor.

Assoziierte Fehlbildung	Häufigkeit bei Wilms Tumor Patienten	Symptome (zusätzlich zum Wilms Tumor)	OMIM
Urogenitale Fehlbildungen	4-7%	z.B. Nierendysplasie, Kryptorchismus, Hypospadie	-----
Denys-Drash-Syndrom	2%	Nephropathie, urogenitale Fehlbildungen	194080
WAGR-Syndrom	1-2%	Aniridie, urogenitale Fehlbildungen, mentale Retardierung	194072
Aniridie	1%	Komplettes oder inkomplettes Fehlen der Iris	106210
Frasier-Syndrom	<1%	Nephropathie, Pseudohermaphroditismus masculinus	136680
Beckwith-Wiedemann-Syndrom	<1%	Hemihypertrophie, Makroglossie, Exomphalus	130650

1.3 Genetik des Wilms Tumors

Bei über 90% der betroffenen Kinder treten Wilms Tumore sporadisch auf, familiäre Wilms Tumore dagegen sind relativ selten. Die Vererbung des familiären Wilms Tumors erfolgt autosomal-dominant. Da in einigen Fällen Geschwister mit einem Wilms Tumor beschrieben wurden, deren Eltern als obligate Träger der prädisponierenden Mutation jedoch keinen Wilms Tumor entwickelten, ist von inkompletter Penetranz auszugehen (Matsunaga 1981; Breslow et al. 1996; Huff et al. 1997).

Die genetischen Ursachen für die Entstehung von Wilms Tumoren sind heterogen. Mehrere Gene (z.B. Wilms Tumor Gen 1 (*WT1*) und β -catenin) und Genorte (z.B. 11p13, 11p15, 16q) spielen dabei eine Rolle. Die einfache „two-hit Hypothese“ (Knudson and Strong 1972), die für das Retinoblastom beschrieben wurde, kann die Entstehung des Wilms Tumors daher nur unvollständig erklären.

Im Unterschied zu vielen anderen Tumorerkrankungen zeichnen sich Wilms Tumoren durch einen häufig euploiden Chromosomensatz und eine niedrige Frequenz des Verlustes von Heterozygotie (<5%) im Genom aus (Maw et al. 1992). Damit finden sich somatische Veränderungen im Wilms Tumor vergleichsweise seltener als bei anderen Tumoren. Außerdem wird angenommen, dass die Anzahl genetischer Veränderungen, die zur malignen Entartung von Zellen benötigt wird, bei embryonalem Gewebe, aus dem der Wilms Tumor hervorgeht, kleiner ist als bei adulten Tumoren (Huff 1998). Entsprechend haben einzelne Veränderungen wahrscheinlich einen stärkeren Einfluss auf die Entstehung eines Wilms Tumors.

Ein Verlust der Heterozygotie (loss of heterozygosity = LOH) wird am häufigsten in der chromosomal Region 11p gefunden. Prognostische Korrelationen wurden für das Auftreten von LOH in den Regionen 11q, 16q und 22q beschrieben (Klamt et al. 1998b). Zusätzlich wurde auch vom Verlust des Imprinting (loss of imprinting = LOI) in den chromosomalen Regionen 11p15 und 11p13 berichtet (Huff 1998).

Die beiden oben erwähnten Gene *WT1* und β -catenin, die bei etwa 10-15% aller Wilms Tumore mutiert sind, sollen im Folgenden näher beschrieben werden.

1.3.1 Das Wilms Tumor Gen 1 (*WT1*)

WT1, das Wilms Tumor Gen 1, wurde 1990 als Tumorsuppressorgen beschrieben (Call et al. 1990; Gessler et al. 1990). *WT1* ist entscheidend an der normalen urogenitalen Entwicklung

beteiligt (Pelletier et al. 1991; Kreidberg et al. 1993). Während der Embryogenese wird *WT1* vor allem in der Niere und den Gonaden exprimiert und persistiert postnatal in den Podozyten der Glomeruli und in bestimmten Zellen der Gonaden.

Mittels *WT1*-defizienter Mäusen wurde die wichtige Rolle von *WT1* bei der Urogenitalentwicklung gezeigt. Diese Mäuse sterben intrauterin und weisen schwere Urogenitalfehlbildungen auf, so z.B. das komplett Fehlen von Nieren und Gonaden (Kreidberg et al. 1993).

WT1 ist in der chromosomal Bande 11p13 lokalisiert und umfasst etwa 50 kb sowie 10 Exons. Es kodiert für ein 449 Aminosäuren langes Protein, das vier Zinkfinger enthält. Es sind zwei Regionen bekannt, in denen alternatives Splicing stattfindet. In Exon 5 findet sich eine alternative Splicesstelle, die für 17 Aminosäuren kodiert, die zweite Stelle alternativen Splicings ist in Exon 9 lokalisiert und kodiert für drei Aminosäuren (KTS). Entsprechend existieren vier Isoformen des *WT1* Proteins, deren ausgewogenes Verhältnis für seine normale Funktion wichtig ist (Haber et al. 1991).

Die Identifikation von *WT1*-Zielgenen (target genes) wurde mit unterschiedlichen Methoden versucht. Zunächst wurden Kotransfektionsversuche durchgeführt, die u.a. *PAX2* (Ryan et al. 1995), *IGF2* (Drummond et al. 1992) und *TGF-β* (Dey et al. 1994) als mögliche *WT1*-Zielgene aufdeckten. Mit dem Einsatz von Expressionsanalysen mittels Microarrays wurden kürzlich *c-Myc* und *EGR1* als neue Zielgene von *WT1* beschrieben (Udtha et al. 2003).

Ein Ausfall des *WT1* Proteins durch inaktivierende Mutationen findet sich bei einigen Wilms Tumoren, allerdings ist der Anteil von *WT1* Mutationen bei Wilms Tumoren mit 10-15% niedriger als anfangs angenommen (Gessler et al. 1994; Maiti et al. 2000). Es finden sich sowohl große Deletionen der chromosomal Bande 11p13, als auch kleine, ausschließlich molekulargenetisch detektierbare intragenische Mutationen. Der Großteil dieser *WT1* Mutationen tritt sporadisch auf und findet sich daher nur in somatischen Zellen, wohingegen ein kleiner Anteil der *WT1* Mutationen die Keimbahn betrifft und häufig mit bilateralen Wilms Tumoren assoziiert ist.

1.3.2 *β-catenin* und der *Wnt* Signalweg

Ein weiteres Gen, in dem Mutationen bei einigen Wilms Tumoren beschrieben wurden, ist *β-catenin* (*CTNNB1*). Mutationen in *β-catenin* finden sich in einem ähnlichen Anteil von Wilms Tumoren wie *WT1* Mutationen (10-15%) (Koesters et al. 1999). Beide Mutationen sind häufig miteinander assoziiert (Maiti et al. 2000).

Bei Wilms Tumoren wurde eine spezifischer „Hot Spot“ für β -catenin Mutationen beschrieben, dieser befindet sich im Codon 45 des Exons 3. Am häufigsten finden sich hier in frame Deletionen eines Triplets, das für Serin kodiert, oder missense Mutationen, die zum Einbau von Phenylalanin oder Tyrosin anstelle der Aminosäure Serin führen (Kusafuka et al. 2002).

β -catenin Mutationen wurden jedoch nicht nur in Wilms Tumoren entdeckt, sondern auch bei vielen anderen Tumoren, z.B. in colorektalen und hepatozellulären Karzinomen sowie im kindlichen Hepatoblastom (Polakis 2000).

β -catenin hat zwei verschiedene Funktionen in der Zelle: zum einen bildet es einen intrazellulären Komplex mit Cadherinen und vermittelt auf diese Weise die Adhäsion zwischen benachbarten Zellen, zum anderen ist es ein wichtiges Gen im Wnt Signalweg. Die Aktivierung des Wnt Signalwegs inhibiert die Phosphorylierung von β -catenin durch die Glykogen Synthase Kinase 3 β (GSK3). Dadurch wird β -catenin vor dem Abbau geschützt und transloziert in den Zellkern, wo es einen Komplex mit Transkriptionsfaktoren der Tcf/Lef-Familie bildet und die Transkription von verschiedenen Zielgenen reguliert (He et al. 1998; Tetsu and McCormick 1999). Die oben beschriebenen Mutationen in Exon 3 des β -catenin Gens führen dazu, dass β -catenin nicht mehr phosphoryliert und abgebaut werden kann und damit dauerhaft aktiviert im Zellkern vorliegt. Dies bedeutet eine ununterbrochene Aktivierung der Zielgene (Rubinfeld et al. 1997; Kusafuka et al. 2002). Bisher sind über 40 Zielgene von β -catenin beschrieben, dazu zählen u.a. c-Myc, Cyclin D und PITX2. Abbildung 8 gibt einen Überblick über den β -catenin/Wnt Signalweg.

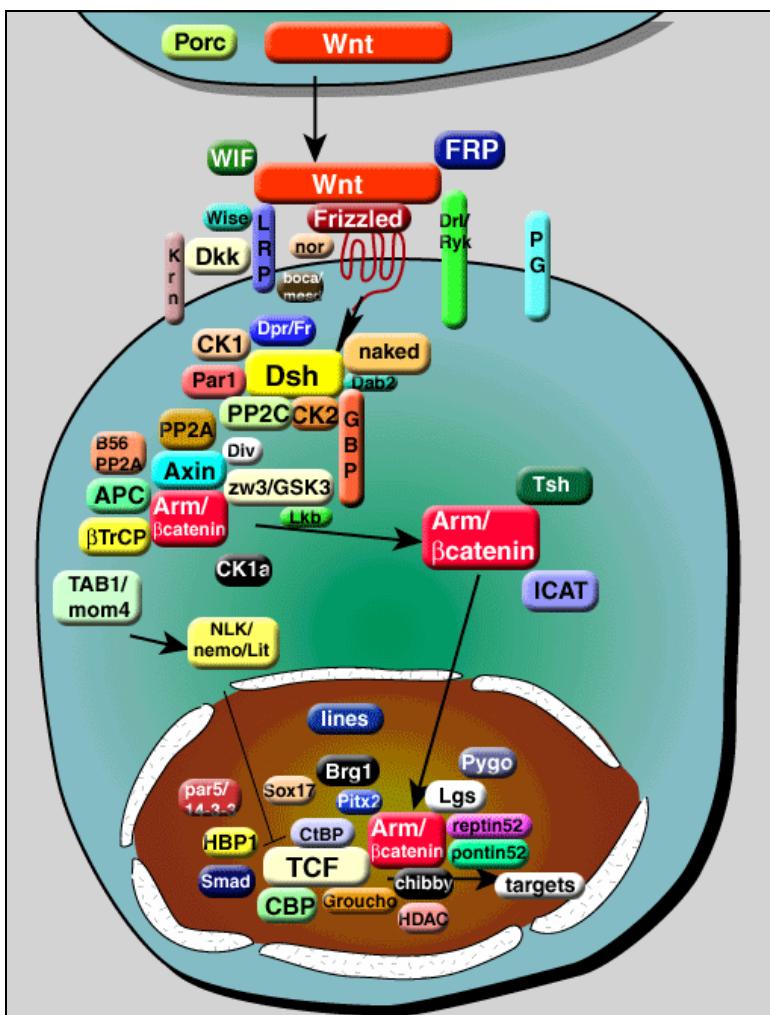


Abbildung 8: Der *Wnt/β-catenin* Signalweg mit allen beteiligten Genen (Stand Dezember 2004; online zugängig auf der *Wnt* Homepage, <http://www.stanford.edu/~rnuss/e/Wntwindow.html>).

1.4 Zielsetzung und Aufbau der Arbeit

Die vorliegende Arbeit ist im Rahmen des MD/PhD-Programms der Universität Würzburg am Lehrstuhl für Physiologische Chemie I in der Gruppe von Prof. Dr. Manfred Gessler entstanden. In den folgenden Kapiteln werden die wichtigsten Ergebnisse des MD/PhD-Projektes zusammengefasst. Die entsprechenden Publikationen finden sich im Anhang dieser kumulativen Arbeit.

Das zu Beginn der Arbeit definierte Ziel bestand in der Suche nach prognostisch relevanten Genen, die bei fortgeschrittenen Wilms Tumoren differentiell exprimiert sind. Bisher sind in der Literatur ausschließlich Expressionsanalysen von einzelnen Genen bei einer geringen Anzahl von Wilms Tumoren beschrieben, die jedoch keine Aussage über die Prognose zulassen. Daher stellt die vorliegende Untersuchung einer großen Serie von Wilms Tumoren mit Microarrays (ca. 11.500 cDNA Klone) einen neuen Ansatz zur Identifikation prognostisch relevanter Gene dar. Details zur Durchführung dieser Studie sowie deren Ergebnisse finden sich in Kapitel 2 (und Publikation 1).

Interessanterweise zeigte sich, dass ein Teil der prognostisch relevanten Gene bei fortgeschrittenen Wilms Tumoren im Retinsäure Signalweg involviert ist. Daher stellte sich die Frage, ob Retinsäure einen neuen therapeutischen Ansatz bei fortgeschrittenen Wilms Tumoren darstellen könnte. Um dies auch auf molekularer Ebene nachweisen zu können, wurden Expressionsanalysen mit kultivierten Wilms Tumorzellen durchgeführt, die mit Retinsäure behandelt wurden. Diese Experimente sind in Kapitel 3 (und Publikation 2) beschrieben.

Genmutationen in *WT1* und *β-catenin* spielen bei einem Teil der Wilms Tumoren eine Rolle. In der in Kapitel 2 beschriebenen Serie von 77 Wilms Tumoren wurden bei fünf Tumoren *WT1* Mutationen, und bei acht Tumoren *β-catenin* Mutationen entdeckt. Mit dem Ziel, spezifische Zielgene von *β-catenin* in Wilms Tumoren zu identifizieren, wurde die Expression von *β-catenin* mutierten Wilms Tumoren mit der Expression in Wilms Tumoren ohne *β-catenin* Mutation verglichen. Der Vergleich dieser genetisch unterschiedlichen Tumorgruppen führte zur Beschreibung neuer Zielgene von *β-catenin* in Wilms Tumoren (Kapitel 4 und Publikation 3). Kapitel 4 enthält zudem eine Untersuchung des kürzlich publizierten Kandidatengens *Chibby* aus dem *Wnt* Signalweg (Publikation 4).

Im letzten Kapitel 5 wird eine neue *WT1* Keimbahnmutation beschrieben, die in einer Familie mit Wilms Tumor und Nierenversagen isoliert wurde (vergleiche auch Publikation 5).

Die Wilms Tumoren, die für die hier beschriebenen Untersuchungen verwendet wurden, sind Teil der Würzburger Wilms Tumorbank. Diese enthält derzeit etwa 350 Tumoren, die im letzten Jahrzehnt im Rahmen der GPOH/SIOP (Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie/Internationale Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie)-Studie eingesandt wurden.

2. Identifikation von Genen, die für die Wilms Tumor Progression relevant sind

2.1 Expressionsanalysen bei Tumorerkrankungen (Stand der Forschung)

Expressionsanalysen gewinnen in der Tumorforschung zunehmend an Bedeutung. Mit der Einführung von Microarray-Analysen können in einem Experiment viele Gene gleichzeitig untersucht werden. Mittlerweile ist die Analyse mehrerer 10.000 Gene möglich.

Zunächst stand die Identifizierung von Genen, die an der Tumorentstehung beteiligt sind, im Vordergrund. Entsprechend wurden Expressionsprofile von Tumorgeweben mit den zugehörigen Normalgeweben verglichen. Im Hinblick auf die klinische Anwendung von Expressionsdaten stellte sich dann die Frage, welche Gene für das Fortschreiten einiger Tumoren verantwortlich sind. Genexpressionsprofile mit prognostischer Relevanz wurden zuerst bei Mammacarcinomen beschrieben (z.B. van 't Veer et al. 2002). Durch den Vergleich von Tumoren unterschiedlicher Stadien konnten auch bei weiteren adulten Tumoren Gene identifiziert werden, deren Expression mit unterschiedlichen klinischen Variablen korreliert, so z.B. Tumorstadium, Metastasierung, histologische Malignität und Rezidivneigung (Russo et al. 2003). Die Prädiktion mit Expressionsprofilen gelang dabei in einigen Studien sogar besser als mit klinisch-histologischen Parametern. Allerdings liegt der positive prädiktive Wert bei diesen Microarray-Untersuchungen bei maximal 60%.

Bei Wilms Tumoren beschränkten sich die Expressionsanalysen zum Zeitpunkt des Beginns dieser Arbeit (Anfang 2002) auf einzelne Gene, deren Expression entweder immunhistochemisch oder mittels Real Time PCR untersucht wurde. Eine prognostische Relevanz wurde so z.B. für *TERT* (Dome et al. 1999), einige Mitglieder aus der *INK4* Genfamilie (Arcellana-Panlilio et al. 2000), *VEGF* (Baudry et al. 2002; Ghanem et al. 2003), *TrkBfull* (Eggert et al. 2001), *TGFA* und *EGFR* (Grundy et al. 1996) beschrieben. Allerdings war die Anzahl der untersuchten Wilms Tumoren in den meisten Studien eher begrenzt. Außerdem bestehen Zweifel daran, ob die Untersuchung einzelner Gene einen zuverlässigen Ansatz darstellt, zumal einzelne Gene starke Expressionsunterschiede in verschiedenen Tumoren aufweisen können.

Daher ermöglicht die in diesem Kapitel beschriebene Microarray-Untersuchung mit einer großen Serie von Wilms Tumoren eine umfassendere Suche nach prognostisch relevanten Genen.

2.2 Experimentelle Durchführung

2.2.1 Microarray-Hybridisierungen von 77 Wilms Tumorproben

Insgesamt wurden 77 Wilms Tumoren aus der deutschen SIOP/GPOH (Internationale Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie/Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie) 93-01 Wilms Tumor Studie untersucht (Abbildung 9). Zu allen Tumorproben wurden detaillierte klinische Informationen zusammengestellt. Die histologische Diagnose der Tumoren wurde referenz-pathologisch bestätigt. Die Eltern der betroffenen Kinder hatten der Untersuchung der Tumoren im Rahmen der vorliegenden Studie schriftlich zugestimmt.

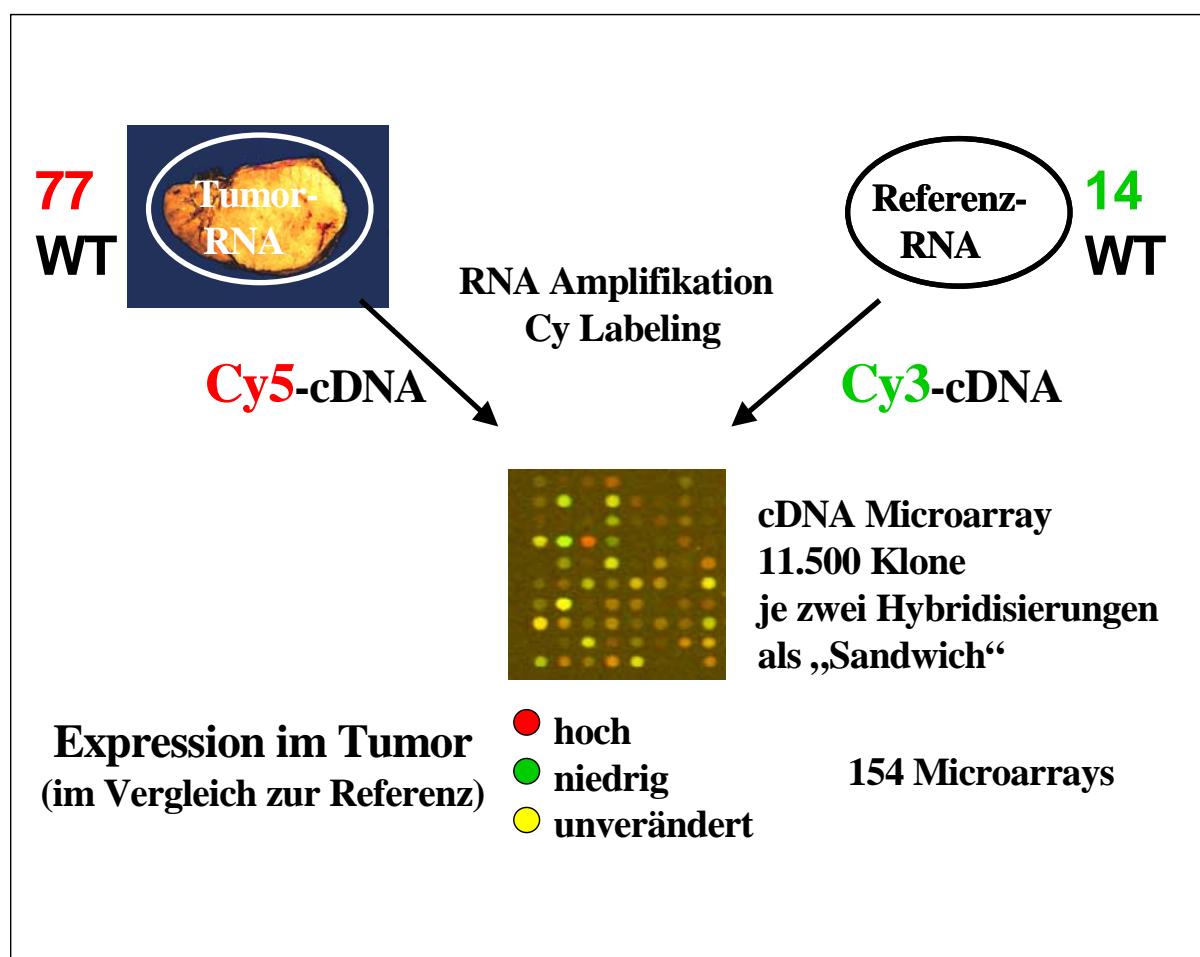


Abbildung 9: Durchführung der Microarray-Experimente (genaue Beschreibung im nachfolgenden Textabschnitt).

Zunächst wurde die RNA aus allen bei -80°C tiefgefrorenen Wilms Tumorproben isoliert, aufgereinigt und mit DNase behandelt. Die Qualität der RNA wurde anhand einer Gelektrophorese überprüft. Da die Menge der extrahierten RNA für eine Microarray-

Hybridisierung nicht ausreichend war, wurde die mRNA aus allen RNA-Proben amplifiziert. Diese Methode umfaßt die reverse Transkription mit einem Oligo (dT) Primer, der einen T7 Promotor enthält, und die anschließende *in vitro* Transkription der entstandenen cDNA mit einer T7 RNA Polymerase. Die amplifizierte mRNA wurde aufgereinigt und revers transkribiert, wobei modifiziertes Amino-Allyl-dUTP eingebaut wurde, und anschließend mit Cy5 markiert. Als Referenz diente ein RNA-Pool aus 14 Wilms Tumoren unterschiedlichen klinischen Verlaufs, der mit Cy3 markiert wurde. Die Hybridisierungen erfolgten mit jeweils einer Cy5 markierten Tumorprobe und der Cy3 markierten Referenz-Probe. Verwendet wurden Microarrays, die 11.500 Sequenz-verifizierte cDNA Klone tragen (human sequence-verified UniGene cDNA sets gf200, gf201 und gf202 (<http://resgen.com>)). Alle Hybridisierungen erfolgten als sog. „Sandwich-Hybridisierungen“, wobei die Proben zwischen zwei Microarrays hybridisiert wurden. Auf diese Weise wurden unter völlig übereinstimmenden Hybridisierungsverhältnissen jeweils zwei Messwerte erhalten, die eine Qualitätskontrolle erlaubten. Nach 16-stündiger Inkubation wurden die Microarrays gewaschen, getrocknet und anschließend für beide Cy Farbstoffe separat gescannt. Die Intensitäten der einzelnen cDNA Klone wurden mit einer speziellen Microarray Software (ImaGene 3.0) eingelesen und verarbeitet. Dabei wurde eine Korrektur der Hintergrund-Signale durchgeführt.

2.2.2 Statistische Auswertung der Expressionsdaten

Die statistische Auswertung der Expressionsdaten (154 Microarrays mit jeweils ca. 11.500 Einzeldaten) wurde von zwei Mitarbeitern des Instituts für Medizinische Statistik und Biometrie der Universität Marburg durchgeführt. Kurzgefaßt erfolgten dabei Intensitäts-abhängige Standardisierungen (entsprechend der Publikation von Yang et al. 2002), der Ausschluß von schlecht reproduzierbaren Einzelmessungen (1,3%) und die Berechnung von logarithmierten Expressionswerten (fold changes).

67 der 77 Wilms Tumoren erhielten eine präoperative Chemotherapie entsprechend des SIOP-Protokolls. Um Expressionsunterschiede aufgrund von unterschiedlichen Vorbehandlungen (primäre Operation oder präoperative Chemotherapie) zu vermeiden, wurden ausschließlich die 67 Tumoren nach präoperativer Chemotherapie in die Endauswertung miteinbezogen.

Die Expressionswerte der replizierten Messungen („Sandwich Hybridisierungen“) waren insgesamt sehr gut reproduzierbar. Vier Hybridisierungen zeigten jedoch Unterschiede zwischen den beiden Einzelmessungen und wurden daher nicht in die Endauswertung miteinbezogen. In die Endauswertung wurden insgesamt 11.552 standardisierte und aus zwei

Einzelmessungen gemittelte Expressionsmessungen von 63 einheitlich vortherapierten Wilms Tumoren eingeschlossen. Alle Expressions-Rohdaten sind bei MIAMExpress zugängig (Submission A-MEXP-221; <http://www.ebi.ac.uk/miamexpress>).

Die Expressiondaten wurden nach verschiedenen klinischen und histologischen Kriterien stratifiziert, z.B. histologische Malignität (Standard/hoch), Rezidiv (ja/nein), Überleben (ja/nein), Metastasierung (ja/nein). Als Qualitätskontrolle bei diesen multiplen Tests wurden die False Discovery Rate (FDR) (sie gibt an, wieviel Prozent der selektierten Gene falsch positiv sind) und die Familywise Error Rate (FWER) berechnet (nach Callow et al (2000)). Es wurden Kandidatengenlisten erstellt, die alle Gene mit einem T-Statistik Wert $>1,96$ und mindestens zweifachen Expressionsunterschieden enthalten. Für die beiden Kriterien mit größter prognostischer Relevanz (histologische Malignität und Rezidiv) wurden mit dem Programm Genesis (Sturn et al. 2002) hierarchische (supervised) Clusterbilder erstellt, die auf dem T-Statistik Ranking basieren.

2.2.3 Verifizierung der Expressionsdaten mittels Real Time PCR

Die Expression einiger Gene wurde anschließend mittels quantitativer Real Time PCR unter Verwendung der für die Microarray-Hybridisierungen eingesetzten RNAs verifiziert. Neun Gene mit unterschiedlichen biologischen Funktionen und ausgeprägten Expressionsunterschieden zwischen rezidivierten und Rezidiv-freien Tumoren wurden in diese Real Time PCR Analyse eingeschlossen.

Die Standardisierung erfolgte durch Messungen des Haushaltsgens *HPRT*.

2.2.4 Analyse von überrepräsentierten Genen und Gengruppen mittels EASE

EASE (Expression Analysis Systematic Explorer) ist eine Software, mit der biologisch wichtige Gene und Gengruppen innerhalb von Genlisten ermittelt werden können. Hierbei wird untersucht, welche Gene und Gengruppen im Verhältnis zur Gesamtzahl der analysierten Gene und Gengruppen in einer gegebenen Genliste überdurchschnittlich häufig vertreten, d.h. überrepräsentiert sind. Das statistische Mass für eine Überrepräsentation ist der sog. „EASE score“, der bei Werten < 0.05 eine statistisch signifikante Überrepräsentation von Genen oder Gengruppen anzeigt (Hosack et al. 2003).

2.3 Ergebnisse und Diskussion

2.3.1 Genexpressionsunterschiede bei verschiedenen klinischen Variablen

Die Expressionsdaten von 63 einheitlich mit einer Chemotherapie vorbehandelten Wilms Tumoren wurden nach verschiedenen klinischen Stratifizierungen ausgewertet, um die entsprechenden Kandidatengene für diese klinischen Kriterien zu identifizieren. Tabelle 4 gibt einen Überblick über die Anzahl der jeweils differentiell regulierten Gene mit der zugehörigen False Discovery Rate. Die Suche nach biologisch interessanten Kandidatengenen stellte das primäre Ziel der vorliegenden Arbeit dar. Die berechneten False Discovery Rates und adjustierten p-Werte haben daher eher deskriptiven Charakter und dienen nicht dem Nachweis einer statistischen Signifikanz.

Am ausgeprägtesten waren Expressionsunterschiede bei den ausgewerteten Kriterien histologische Malignität und Rezidiv. Kandidatengenlisten für diese beiden Kriterien sowie für das Überleben und Metastasierung finden sich in Tabelle 5. Für einige der getesteten klinischen Kriterien ergaben sich keine statistisch signifikanten Expressionsunterschiede. Dies geht mit großer Wahrscheinlichkeit auf eine der folgenden Ursachen zurück: (1) histologische Heterogenität der einzelnen Tumorproben, (2) zahlenmäßig kleine Tumorgruppen bei einigen Auswertungen, (3) das Fehlen einer genetischen Basis bei einigen klinischen Gruppenbildungen.

Für das Kriterium Rezidiv wurde die Deregelation von insgesamt neun Genen mittels Real Time PCR verifiziert (Abbildung 10). Dabei zeigte sich eine gute Übereinstimmung zwischen Microarray- und Real Time PCR-Analyse für die beiden Tumorgruppen (rezidierte versus Rezidiv-freie Tumoren). Diese gute Übereinstimmung war ebenfalls auf der Ebene von Expressionsmessungen in einzelnen Tumoren vorhanden (keine Abbildung).

Tabelle 4: Stratifizierung der Wilms Tumore nach verschiedenen klinischen Kriterien mit jeweiliger Anzahl differentiell regulierter Gene und ihrer „False discovery rate“.

Klinisches Kriterium	Anzahl der Wilms Tumore		Anzahl differentiell regulierter Gene (adjustierter p-Wert bzw. FWER <0.9)	False discovery rate
	Gruppe 1	Gruppe 2		
Malignität (Risikogruppe) 1= Standard, 2= hoch	52	8	20	27.5%
Rezidiv * 1= nein (>3y), 2= ja	27	10	22	25.6%
Überleben ** 1= Rezidiv-frei (>3y), 2=Tod	27	5	12	31.5%
Metastasen 1= nein, 2= ja	54	12	7	50.5%
Ansprechen auf Chemotherapie *** 1= gut, 2= schlecht	38	19	6	67.5%

* Falls Rezidive auftreten, so meistens innerhalb der ersten drei Jahre. Daher wurden in die Gruppe der Rezidiv-freien Tumoren nur solche Tumoren eingeschlossen, bei denen nach einem Follow-up von mindestens drei Jahren kein Rezidiv aufgetreten ist.

** Es wurde die gleiche Gruppe von rezidiv-freien Tumoren wie beim Kriterium Rezidiv eingesetzt.

*** Eine Reduktion des Tumorvolumens durch die präoperative Chemotherapie um mehr als 50% entspricht einem guten Ansprechen, eine Reduktion von weniger als 50% oder die Zunahme des Tumorvolumens wurde als schlechtes Ansprechen definiert.

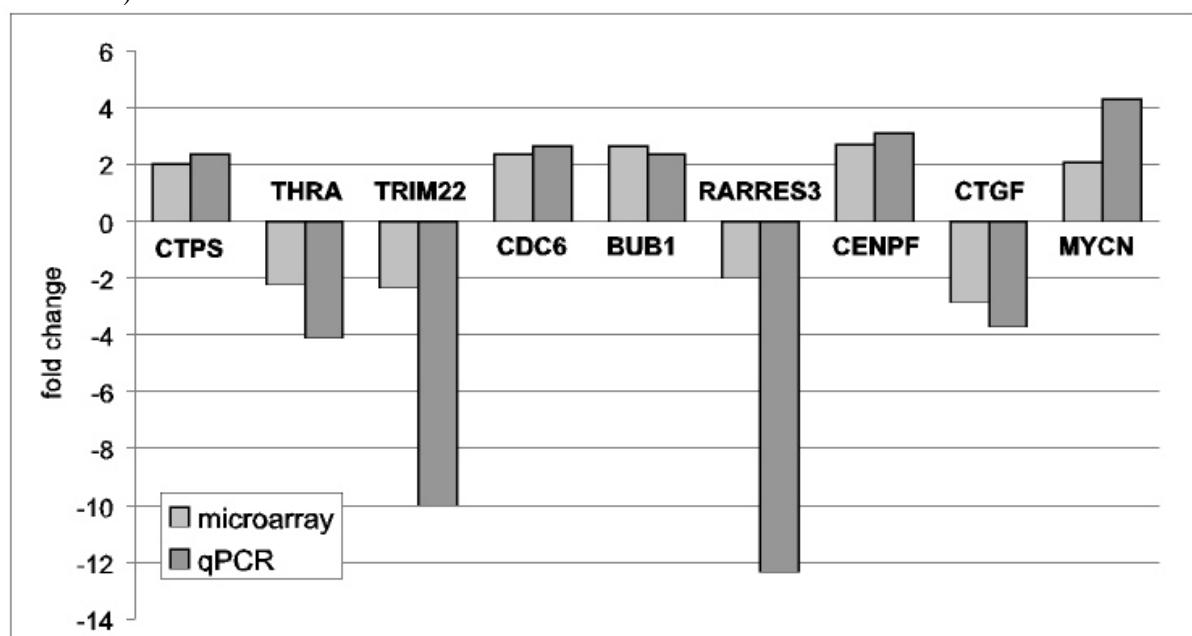
Tabelle 5: Kandidatengene für verschiedene klinische Kriterien mit mindestens zweifachen Expressionsunterschieden und T-Statistik Werten > 1,96. Für das Kriterium Rezidiv sind die ersten 40 Gene mit den höchsten T-Statistik Werten aufgelistet. Die Deregulierung mehrerer Gene (fettgedruckt) wurden mittels Real Time PCR verifiziert (Abbildung 10). Für die drei Kriterien histologische Malignität, Überleben und Metastasierung sind die jeweils ersten 10 Gene aufgelistet. Die kompletten Genlisten sind als online Anhang zu Publikation 1 einsehbar.

T + fc	t-Statistik	Fold change*	GenBank accession	Gensymbol
Rezidiv (ja/nein)	5,19	2,40	AA488336	DRG1
	5,11	2,02	H09614	CTPS
	5,06	2,34	AA480995	MTHFD2
	4,79	2,23	T59641	PBX2
	4,63	2,11	AA449762	ILF3
	-4,47	-2,15	N70734	TNNT2
	4,46	2,14	W96224	NDUFV3
	-3,84	-2,22	T66180	THRA
	-3,81	-2,82	AA047039	EIF1AY
	-3,81	-2,33	AA083478	TRIM22
	3,71	2,13	AA598610	MEST
	-3,70	-2,49	N51278	CX3CR1
	3,65	2,42	N53057	CHEK1
	3,58	2,02	R00884	DHFR
	3,54	2,13	H56918	EIF4A1
	-3,53	-2,14	AA099369	CUL5
	3,50	2,35	H59204	CDC6
	-3,43	-2,40	AA046700	FBXO32
	-3,42	-2,47	AA046679	
	3,40	2,22	AA430744	EZH2
	-3,38	-2,23	H11453	
	3,36	2,17	N70010	CDCA5
	-3,27	-2,03	AA192166	
	-3,27	-2,66	T70352	OLFML2A
	3,23	2,64	AA446462	BUB1
	-3,22	-2,05	AA458965	NK4
	-3,22	-2,34	AA427947	
	-3,20	-2,68	R34224	MGC16121
	3,17	2,40	R06900	RAMP
	3,15	2,32	AA968443	
	-3,14	-2,15	R91916	CXCR6
	-3,11	-2,17	W84612	YPEL3
	3,10	2,21	H25560	DGAT2
	-3,09	-2,35	AA291749	ESR1
	-3,02	-2,00	W47350	RARRES3
	3,01	2,34	T66935	DKFZp762E1312
	2,96	2,70	AA701455	CENPF
	-2,92	-2,64	T53298	IGFBP7
	-2,92	-2,31	H73914	LDB2
	-2,89	-2,19	H09111	13CDNA73
Hist. Malignität (hoch/Standard)	-6,19	-2,21	R01167	FLJ23467
	-6,15	-2,26	AA126862	LOC92689
	-5,89	-2,75	N30615	
	-5,79	-3,28	AA046700	FBXO32
	-5,75	-2,77	AA464711	C3AR1
	-5,61	-2,63	AA099369	CUL5
	-5,45	-2,52	R42713	IDI2
	-5,38	-2,68	N71028	MS4A6A

	-5,21 -5,15	-2,22 -2,29	AA035455 AA701545	BACH RNASE6
Überleben <u>(nein/ja)</u>	7,96	2,79	AA480995	MTHFD2
	7,48	2,88	AA488336	DRG1
	6,62	2,62	T59641	PBX2
	-6,22	-3,45	N30615	
	5,84	2,04	AA186605	SLC5A6
	5,60	2,71	N53057	CHEK1
	-5,13	-2,57	N30436	
	5,12	2,36	AA278749	NCBP1
	5,11	2,14	H09614	CTPS
	-5,03	-2,16	W47179	CTSB
Metastasierung <u>(ja/nein)</u>	4,68	2,32	AA489246	ST14
	3,40	2,89	AA401441	BF
	3,29	2,95	AA664406	C4A
	3,26	2,16	AA129777	SLC16A3
	3,12	2,05	AA424584	LTBP2
	2,90	2,06	AA430625	DPYD
	2,77	2,03	N93686	
	2,68	2,45	N30986	
	-2,61	-2,22	W68220	KIAA0101
	2,53	2,89	AA485867	MARCO

* Die Genregulation bezieht sich auf die unterstrichene Gruppe in Spalte 1.

Abbildung 10: Vergleich der differentiellen Regulation nach Microarray- und Real Time PCR-Analyse. Die dargestellten Gene waren in rezidivierten Wilms Tumoren bei der Microarray-Analyse dereguliert und wurden anschließend für dieselben Tumorgruppen mittels Real Time PCR untersucht. Die dargestellten Säulen entsprechen jeweils der mittleren Genregulation. Die Reihenfolge der Gene folgt absteigenden T-Statistik Werten (vergleiche Tabelle 5).



Für die beiden prognostisch relevanten Stratifizierungen (histologische Malignität und Auftreten eines Rezidivs) wurden zusätzlich Clusterbilder erstellt:

Bei der Auswertung des Kriteriums Malignität konnten Wilms Tumoren mit Standardmalignität (52 Tumoren) deutlich von den acht hochmalignen Tumoren unterschieden werden. Diese histologische Stratifizierung wurde entsprechend der überarbeiteten Stockholm-Klassifikation (Vujanic et al. 2002) durchgeführt. Anhand des Expressionsmusters dieser Gene war eine molekulargenetische Unterscheidung der beiden Tumorgruppen möglich (Abbildung 11). In der Gruppe der 52 Wilms Tumoren mit Standardmalignität ist teilweise ein zusätzliches Clustering erkennbar, so sind z.B. regressive Tumoren von den übrigen Tumoren der Standardgruppe abgrenzbar. Außerdem ist zu bedenken, dass sich viele Wilms Tumoren durch eine Mischung unterschiedlicher histologischer Subtypen auszeichnen. So machen Tumoren vom „klassischen“ triphasischen Typ, der stromareiche, epitheliale und blastemreiche Anteile enthält, etwa die Hälfte der Wilms Tumoren mit Standardmalignität aus. Diese histologische Heterogenität ist teilweise entsprechend am angedeuteten Zusatzclustering zu erkennen. Da Wilms Tumoren aus embryonalen Vorläuferzellen gebildet werden, wird vermutet, dass die histologische Heterogenität bei Wilms Tumoren einer Differenzierung in ein weites Spektrum der nieren spezifischen Gewebetypen entspricht, wobei meist ein histologischer Anteil überwiegt.

Das Clusterbild der zweiten prognostisch relevanten Stratifizierung in nicht rezidierte und rezidierte Tumoren erlaubte eine ähnlich deutliche Unterscheidung anhand des Expressionsmusters (Abbildung 12). Rezidive treten meistens innerhalb der ersten drei Jahre nach der Erstdiagnose auf. Entsprechend wurden in die Gruppe der nicht rezidierten Tumoren nur die Primärtumoren von Kindern eingeschlossen, die in den ersten drei Jahren nach der Erstdiagnose regelmäßig nachuntersucht wurden und kein Rezidiv entwickelten. Daher ist die Anzahl der eingeschlossenen Tumoren etwas geringer als beim Clusterbild für die unterschiedliche Malignität.

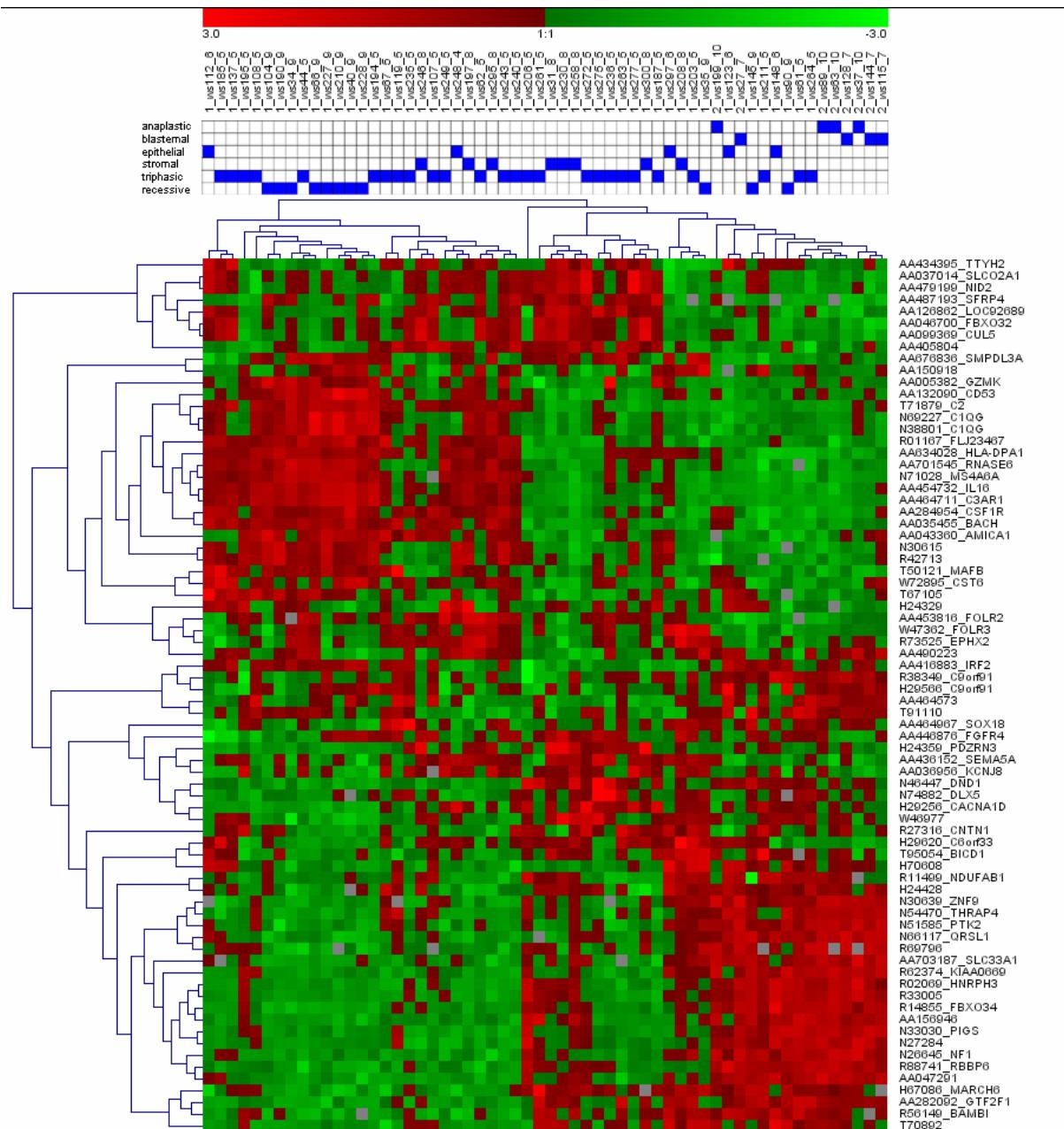


Abbildung 11: Hierarchische Clusteranalyse für Wilms Tumoren unterschiedlicher Malignität. Verglichen wurden 52 Wilms Tumoren der Standardrisikogruppe (regressive, stromareiche, epitheliale und triphasische Tumoren) mit acht Wilms Tumoren der Hochrisikogruppe (vier anaplastische und vier blastemreiche Tumoren). Die einzelnen Tumoren sind in den vertikalen Spalten dargestellt, wobei das darüber liegende Cluster detaillierte Information über den histologischen Subtyp gibt. 74 differentiell regulierte Gene (mit niedrigsten adjustierten p-Werten (FWER)) sind mit Gensymbol und zugehöriger Accession number zeilenweise angeordnet. Grüne Kästchen bedeuten, dass das entsprechende Gen in einem Tumor weniger stark exprimiert wird, rote Kästchen repräsentieren überexprimierte Gene, grau bedeutet, dass das entsprechende Gen zwischen den Einzelmessungen der beiden „Sandwich-Hybridisierungen“ nicht ausreichend reproduzierbar war. Innerhalb der Standardrisikogruppe sind zusätzliche Subcluster angedeutet.

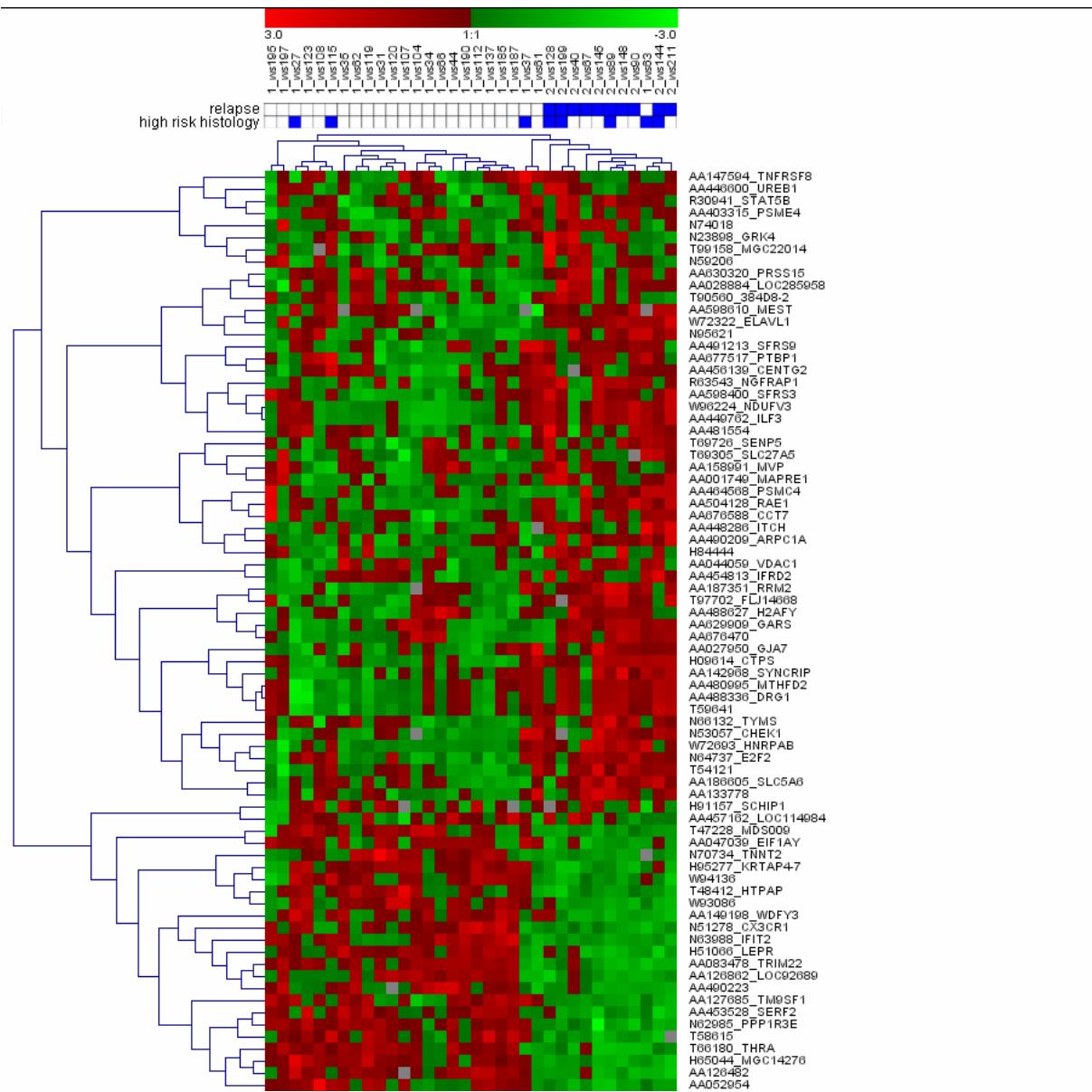


Abbildung 12: Hierarchische Clusteranalyse von Wilms Tumoren für das klinische Kriterium Rezidiv. Verglichen wurden primäre Wilms Tumoren, die anschließend rezidivierten, mit solchen Tumoren, die im Zeitraum von drei Jahren nach der Erstdiagnose kein Rezidiv entwickelten. Entsprechend ist die Anzahl der dargestellten Tumoren reduziert, da Tumoren von Kindern mit einem Follow-up von unter drei Jahren nicht eingeschlossen wurden. 77 differentiell regulierte Gene (mit niedrigsten adjustierten p-Werten (FWER)) sind mit Gensymbol und zugehöriger Accession number zeilenweise angeordnet. Grüne Kästchen bedeuten, dass das entsprechende Gen in einem Tumor weniger exprimiert wird, rote Kästchen repräsentieren überexprimierte Gene, grau bedeutet, dass das entsprechende Gen zwischen den Einzelmessungen der beiden „Sandwich-Hybridisierungen“ nicht ausreichend reproduzierbar war.

Nur vier der zehn rezidivierten Wilms Tumoren gehörten zur Gruppe der Tumoren mit hoher histologischer Malignität (ws89, ws128, ws144, ws199).

Bei der Auswertung des Kriteriums Überleben (ja/nein) wurden viele übereinstimmende Gene (ca. 50%) mit der Auswertung des Rezidivs gefunden. Dies liegt an der Überschneidung der eingeschlossenen Tumoren, da die meisten Todesfälle einem zuvor aufgetretenen Rezidiv folgten. Zudem wurde als Vergleichsgruppe dieselbe Gruppe von Tumoren, die mindestens drei Jahre nicht rezidiert waren, eingesetzt. Allerdings ist die Gruppe der Tumoren mit Rezidiv größer als die Gruppe der Tumoren von verstorbenen Kindern. Dies bedingt wahrscheinlich in der erstgenannten Auswertung eine höhere Anzahl von selektierten Genen mit niedrigerer „False discovery rate“.

Eine Assoziation zwischen Expressionsmuster und Prognose konnte bereits bei einigen anderen Tumorerkrankungen nachgewiesen werden (siehe Kapitel 2.1). Die vorliegende Arbeit beschreibt eine derartige Assoziation erstmals auch bei Wilms Tumoren. Bisher wurde das Risiko für das Auftreten eines Rezidivs aufgrund der klinischen und histologischen Ausprägung des Primärtumors abgeschätzt und entsprechend wurde über die Art und Intensität der postoperativen Behandlung entschieden. Allerdings sind diese klinischen Kriterien bei der Abschätzung der Prognose relativ unzuverlässig. Von den in diese Studie eingeschlossenen zehn Tumoren, die anschließend rezidierten, wiesen nur vier einen Hochrisikotyp bei der histologischen Klassifizierung auf. Die Mehrzahl der Rezidive trat somit bei Primärtumoren von Standardrisikotyp auf. Die vorliegende Arbeit gibt erste Hinweise darauf, dass das Expressionsmuster bei Wilms Tumoren prognostische Relevanz haben könnte. Gerade bei solchen Tumoren, deren klinischer Verlauf nicht auf eine schlechte Prognose hindeutet, kann das Expressionsmuster wichtige prognostische Informationen geben. Die Anzahl der untersuchten Tumoren ist bisher jedoch zu gering, um übergeordnete Prädiktionsraten zu berechnen.

Die Expressionsunterschiede zwischen metastasierten und lokal begrenzten Tumoren waren weniger ausgeprägt. Wahrscheinlich geht der Prozess der Metastasierung nur von einigen Tumorzellen aus, deren Expressionsmuster durch das umgebende Tumorgewebe überlagert wird und dadurch an Deutlichkeit verliert.

Beim Vergleich von Tumoren, die gut auf die Chemotherapie angesprochen haben (> 50%ige Tumorvolumenreduktion) und solchen Tumoren, die nur eine geringe (< 50%) oder keine Abnahme des Tumorvolumens nach der Chemotherapie gezeigt haben, zeigten sich erstaunlicherweise ebenfalls nur geringe Expressionsunterschiede. Gut auf die Chemotherapie ansprechende Tumoren sollten mit stärkerer Apoptose und einer Veränderung der Zellpopulation reagieren als solche Tumoren, die ihr Wachstumsverhalten trotz Chemotherapie kaum ändern. Es ist allerdings möglich, dass das Ansprechen auf die

Chemotherapie von nur wenigen Genen abhängig ist, die auf den eingesetzten Microarrays nur teilweise vertreten waren.

2.3.2 Kandidatengene für die Tumorprogression

Bis zum Abschluss dieser Arbeit (Ende 2005) fanden sich in der Literatur sechs Publikationen über Expressionsanalysen bei Wilms Tumoren (Rigolet et al. 2001; Li et al. 2002 und 2005; Takahashi et al. 2002; Takahashi et al. 2003; Williams et al. 2004). Diese Studien basieren überwiegend auf einer beschränkten Anzahl untersuchter Tumoren und beschäftigen sich mit Expressionsunterschieden zwischen Wilms Tumoren und gesundem Vergleichsgewebe, z.B. der fetalen Niere. Nur in zwei dieser Studien wird ein Bezug des Expressionsmusters zu klinischen Kriterien erwähnt. In der Studie von Williams et al. (2004) werden 27 Wilms Tumoren untersucht, von denen etwa die Hälfte anschließend rezidierte. Beim Vergleich beider Gruppen (rezidierte versus Rezidiv-freie Tumoren) fanden sich differentiell regulierte Gene, die nach Aussage der Autoren biologisch interessante Targets darstellen, jedoch keine prognostische Bedeutung haben. Im Vergleich zu unseren Auswertungen finden sich fast keine Übereinstimmungen an deregulierten Genen. Dies geht wahrscheinlich auf die unterschiedliche Vorbehandlung der Tumoren zurück, Williams et al. (2004) untersuchten ausschließlich primär operierte Tumoren entsprechend des amerikanischen NWTS Protokolls. Bei der zweiten Studie von Li et al. (2005) fanden sich vier deregulierte Gene, die ebenfalls in unseren Auswertungen dereguliert waren: *CENPF*, *CCNA1*, *CDC2* und *EZH2*. Diese Gene sind scheinbar unabhängig vom therapeutischen Vorgehen dereguliert, da auch Li et al. (2005) ausschließlich primär operierte Tumoren untersuchten, wohingegen unsere Untersuchungen ausschließlich Tumoren nach präoperativer Chemotherapie entsprechend des europäischen SIOP Protokolls einbeziehen.

Der hier beschriebene experimentelle Ansatz vergleicht die Expressionsmuster zwischen einer großen Anzahl von Wilms Tumoren in unterschiedlich fortgeschrittenen Stadien. Entsprechend wird insbesondere die Identifikation von Genen, die an der Tumorprogression beteiligt sind, ermöglicht. Hierzu wurde auch eine EASE (Expression Analysis Systematic Explorer)- Analyse durchgeführt. In rezidierten Wilms Tumoren waren dabei insbesondere Gene signifikant überrepräsentiert (EASE score < 0,05), die im Zellzyklus und an der Mitose beteiligt sind, z.B. *BUB1*, *CENPF*, *CENPE*, *CDC6*, *CKS2*, *CUL5*, *ESR1*, *UBE2C*, *MAD2L1*, *MAD2*, *CHEK1* und *STK6*. In Tumoren mit hoher histologischer Malignität zeigte sich eine signifikante Überrepräsentation von Genen, die bei der Immunantwort eine Rolle spielen, z.B. *C3AR1*, *TREM2*, *CSF1R*, *BF*, *IL16*, *HLA-C* und *IL1R1*.

2.3.3 Beteiligung des Retinsäure- und des E2F-Signalwegs an der Tumorprogression

Interessanterweise zeigte sich, dass insbesondere Gene aus zwei verschiedenen Signalwegen eine starke differentielle Regulation aufwiesen. Dies waren der Retinsäure und der *RB-E2F* Signalweg.

Gene aus dem Retinsäure Signalweg, wie z.B. *RARRES2*, *RARRES3*, *CTGF*, *NK4*, *RAMP* und *ENPP2/ATX*, waren in fortgeschrittenen im Vergleich zu Tumoren in weniger fortgeschrittenen Stadien überwiegend herunterreguliert. Dies entspricht den Beobachtungen in Zellkulturexperimenten, dass umgekehrt der angeschaltete Retinsäure Signalweg zu Zelldifferenzierung und Inhibition des Zellwachstums führt (Niles 2004).

Der *RB-E2F* Signalweg reguliert die Transkription einer Reihe von Genen, die für die Progression des Zellzyklus und damit für die Zellteilung verantwortlich sind (Muller et al. 2001). *E2F* bezeichnet eine Familie von Transkriptionsfaktoren, die wichtige Zielgene des *RB* Signalwegs darstellen. Gene des *RB-E2F* Signalwegs, z.B. *EZH2*, *CDC6*, *CDC2*, *MYCN*, *DHFR*, waren in fortgeschrittenen Wilms Tumoren entsprechend des gesteigerten Zellwachstums überwiegend hochreguliert. Insbesondere für *EZH2* wurde bereits eine Beteiligung am Tumorwachstum in Wilms Tumoren (Li et al. 2005; Takahashi et al. 2002) sowie in verschiedenen anderen Tumoren (z.B. Bracken et al. 2003) vorbeschrieben.

Zusammenfassend wurden in der hier beschriebenen Studie Gene identifiziert, die in fortgeschrittenen (insbesondere hochmalignen und später rezidivierenden) Wilms Tumoren dereguliert waren. Dabei ergaben sich erste Hinweise darauf, dass anhand der Genexpression auch prognostische Informationen gewonnen werden könnten. Insbesondere die Risikoabschätzung für das spätere Auftreten eines Rezidivs ist von großer klinischer Bedeutung, da diese die Entscheidung über die postoperative Chemotherapie beeinflusst. Die entsprechenden Gene können nun in prospektive Studien einbezogen werden. Das Ziel weiterer Untersuchungen sollte die Definition einer bestimmten Anzahl von Genen sein, deren Regulation bei der Risikoabschätzung für das Auftreten eines Rezidivs miteingesetzt werden kann. Somit könnten Patienten identifiziert werden, die ein erhöhtes Risiko für ein späteres Rezidiv haben und von einer intensivierten Überwachung oder einer zusätzlichen Chemotherapie profitieren würden.

3. Retinsäurebehandlung von Wilms Tumorzellen

3.1 Einsatz von all-trans Retinsäure in der Tumorbehandlung

All-trans Retinsäure (ATRA) ist ein Vitamin A Derivat und führt über Bindung an spezifische Retinsäure-Rezeptoren zur Aktivierung von Zielgenen. Der Retinsäure Signalweg spielt bei der Progression vieler Tumoren eine große Rolle. *In vitro* Untersuchungen mit Retinsäure an normalen Zellen und Tumorzellen zeigten, dass Retinsäure sowohl das Zellwachstum hemmt als auch zur Ausdifferenzierung von Zellen führt (Ross et al. 2000). Beide Effekte sind bei der Behandlung von Tumoren gewünscht. Daher wurden verschiedene klinische Studien durchgeführt, die die *in vitro* Effekte von Retinsäure auch *in vivo* nachweisen konnten (Niles 2004). Seit einigen Jahren wird all-trans Retinsäure in einer Kombinationstherapie bei einer Form der adulten Leukämie (APL, akute promyelozytische Leukämie) eingesetzt und führt in vielen Fällen zu kompletter Remission und Heilung (Freemantle et al. 2003). Bei pädiatrischen Tumoren laufen derzeit Phase III Studien mit Retinsäure bei fortgeschrittenen Neuroblastomen (Reynolds et al. 2003).

3.2 Retinsäure als neue Therapie bei fortgeschrittenen Wilms Tumoren?

Die in Kapitel 2 beschriebene Expressionsstudie an einer großen Serie von Wilms Tumoren führte zur Identifizierung von Genen, die mit der Tumorprogression assoziiert sind und zum Retinsäure Signalweg gehören. Daher stellte sich die Frage, ob Kinder mit fortgeschrittenen Wilms Tumoren von einer Retinsäure-Therapie profitieren. Im Falle eines positiven Ansprechens auf Retinsäure sollte sich die Expression dieser Gene, die mit einer schlechten Prognose assoziiert sind, umkehren lassen. Zudem sollte herausgefunden werden, welche weiteren Gene durch eine Retinsäurebehandlung in Wilms Tumoren dereguliert werden.

3.3 Durchführung der Experimente und Ergebnisse

Um das Ansprechen von Wilms Tumoren auf all-trans Retinsäure (ATRA) zu untersuchen, wurden zwei verschiedene Typen von Wilms Tumorzellen eingesetzt: (1) MZ 128 wurde von einem stromareichen Wilms Tumor kultiviert, der sowohl eine *WT1* Mutation als auch eine zytogenetisch erfassbare de novo 7/12 Chromosomen-Translokation aufwies (Lobbert et al. 1998); (2) WS 427 sind primär kultivierte Wilms Tumorzellen von einem triphasischen Tumor ohne *WT1* Mutation. Beide Typen von Wilms Tumorzellen wurden zunächst mit verschiedenen Konzentrationen von all-trans Retinsäure (100nM, 10µM and 1mM) über 24

Stunden behandelt (Abbildung 13). Anschließend wurde die Expression verschiedener Retinsäure-abhängiger Gene mittels Real Time PCR untersucht. Dabei wurden insbesondere solche Gene ausgewählt, die zuvor in fortgeschrittenen Wilms Tumoren stark dereguliert waren.

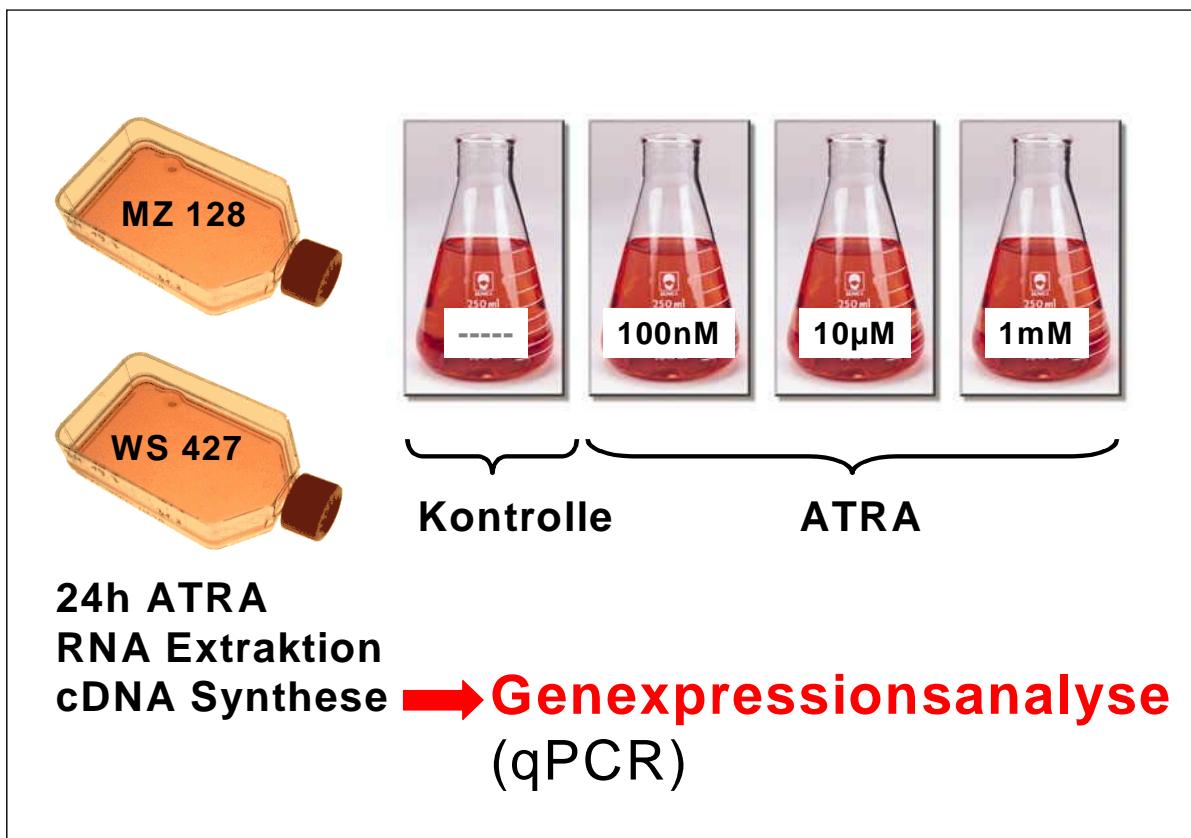


Abbildung 13: Schematische Darstellung der Experimente mit zwei verschiedenen Typen von Wilms Tumorzellen (MZ 128 und WS 427), die mit all-trans Retinsäure (100nM, 10 μ M and 1mM) über 24 Stunden behandelt wurden.

Die Expressionsänderungen werden in Abbildung 14 an einigen Beispielen dargestellt. Dabei sind folgende Aspekte hervorzuheben: (1) ATRA konnte sowohl zur Überexpression (z.B. *RARRES3*) als auch zur Herunterregulation (z.B. *ENPP2/ATX*) oder zu keiner Veränderung der Expression (z.B. *RARRES2*) führen. (2) Das Ausmaß der differentiellen Regulation war in beiden Zelltypen relativ ähnlich. (3) ATRA Konzentrationen von 100nM hatten nur einen geringen Effekt auf die differentielle Genregulation, wohingegen 10 μ M und 1mM zu starken Änderungen der Expression führten. Dabei ließ sich der Effekt von 10 μ M Retinsäure durch die Anwendung von 1mM nicht wesentlich weiter verstärken.

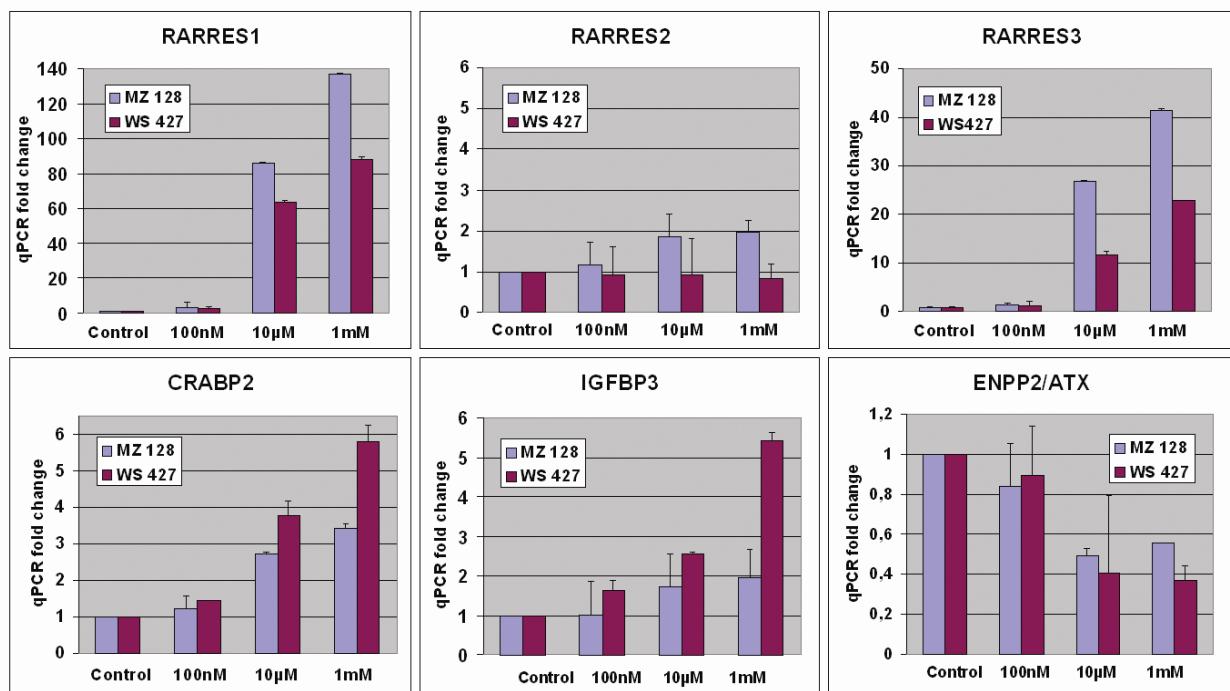


Abbildung 14: Quantitative Real Time PCR Analyse der differentiellen Genregulation in beiden Typen von Wilms Tumorzellen (MZ 128 und WS 427) nach Exposition mit verschiedenen ATRA-Konzentrationen. Beispielhaft sind sechs Gene dargestellt, von denen vier Gene durch ATRA in ihrer Expression induziert wurden (*RARRES1*, *RARRES3*, *CRABP2*, *IGFBP3*), wohingegen *ENPP2/ATX* durch ATRA herunterreguliert wurde. *RARRES2* wird nicht differentiell reguliert. Die Fold change Änderungen beziehen sich auf eine unbehandelte Kontrolle von Wilms Tumorzellen (Fold change = 1). Alle Versuche wurden zweimal zeitlich unabhängig voneinander durchgeführt, wobei jeweils zwei qPCR Messungen vorgenommen wurden.

Um zu untersuchen, wie das Zellwachstum durch eine kontinuierliche Behandlung mit Retinsäure beeinflusst wird, wurden beide Wilms Tumor Zelltypen zusätzlich mit den drei oben genannten ATRA-Konzentrationen über fünf Tage behandelt. Das Zellwachstum blieb bei einer Konzentration von 100nM ATRA fast unverändert, wohingegen höhere Konzentrationen zu einer starken Hemmung der Zellproliferation führten. Eine vollständige Hemmung des Zellwachstums wurde bei 1mM ATRA beobachtet.

Zuletzt wurden Microarray-Experimente durchgeführt, um weitere Retinsäure-regulierte Kandidatengene in Wilms Tumoren zu identifizieren. Beide Typen von Wilms Tumorzellen wurden dazu mit 10μM Retinsäure über 24 Stunden behandelt. Diese Konzentration wurde gewählt, da sie in den zuvor durchgeföhrten Real Time PCR Experimenten einen starken regulatorischen Effekt hatte und auch in anderen *in vitro* Studien eingesetzt wurde (Reynolds et al. 1991). Die 30 Gene mit der stärksten differentiellen Regulation in beiden Zelltypen

finden sich in Tabelle 6. Alle Gene, die bei beiden Zelltypen überschneidend selektiert wurden, waren übereinstimmend in positive oder negative Richtung reguliert. Einige differentiell regulierte Gene stellen auch bekannte Retinsäure Zielgene dar, z.B. *IGFBP3* und *CTGF/IGFBP8* (Freemantle et al. 2002), und ihre Regulation erfolgte in Übereinstimmung mit der Literatur.

3.4 Diskussion

3.4.1 Inverse Genregulation nach Retinsäure-Behandlung

Interessanterweise zeigte sich beim Vergleich der Expression der Gene, die sowohl in fortgeschrittenen Wilms Tumoren als auch in Folge der Retinsäure-Behandlung differentiell reguliert waren, dass sich die Richtung der Regulation durch die Retinsäure-Behandlung bei vielen Genen umkehren ließ. Zum Beispiel waren die Gene *RARRES1* und *RARRES3* in hochmalignen und rezidivierenden Wilms Tumoren im Vergleich zu niedrig/mittelgradig malignen und nicht rezidivierenden Tumoren häufig herunterreguliert, wohingegen ihre Expression nach der Behandlung mit Retinsäure meist gesteigert war (Tabelle 7). Diese inverse Expression gibt einen ersten molekularen Hinweis auf einen eventuell positiven therapeutischen Effekt von Retinsäure in Wilms Tumoren.

Tabelle 6: 30 Kandidatengene mit stärkster diffentieller Regulation in beiden Typen von Wilms Tumorzellen. Eine Expressionsanalyse mittels cDNA-Microarrays wurde nach 24 stündiger Behandlung mit 10 μ M all-trans Retinsäure durchgeführt. Die angegebenen Expressionsänderungen (Fold changes) entsprechen jeweils den aus den Sandwich-Hybridisierungen gemittelten log2 Expressionsunterschieden zwischen behandelten und unbehandelten Tumorzellen.

Typ der Tumorzellen	Gensymbol	Genname	fold change	Koregulation in anderem Zelltyp
MZ 128	DHRS3	Dehydrogenase/reductase (SDR family) member 3	13,6	4,6
	TLR5	toll-like receptor 5	-7,6	
	TAL1	T-cell acute lymphocytic leukemia 1	6,0	2,2
RARB	retinoic acid receptor, beta		5,3	2,3
	retinoic acid receptor, beta		5,1	2,0
RARRES1	retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 1		3,4	
	FLJ20344	hypothetical protein FLJ20344	-3,2	
ITGA1	integrin, alpha 1		3,0	
	SMAD3	SMAD, mothers against DPP homolog 3 (Drosophila)	2,9	
AQP1	Aquaporin 1 (channel-forming integral protein, 28kDa)		-2,7	
	CLDN11	claudin 11 (oligodendrocyte transmembrane protein)	2,6	
TYSND1	trypsin domain containing 1		-2,6	
	ETV1	ets variant gene 1	2,5	
GARP	glycoprotein A repetitions predominant		2,4	
	UPAR	plasminogen activator, urokinase receptor	2,4	3,2
CAPN7	calpain 7		2,4	
	KIT	v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog	2,4	
SFRS2IP	splicing factor, arginine/serine-rich 2, interacting protein		-2,3	
	NAV2	neuron navigator 2	2,3	
DLC1	deleted in liver cancer 1		2,2	
	PDGFRA	platelet-derived growth factor receptor, alpha polypeptide	2,2	
AKAP12	A kinase (PRKA) anchor protein (gravin) 12		2,2	2,0
	ZNF133	zinc finger protein 133 (clone pHZ-13)	2,2	
MIR16	Membrane interacting protein of RGS16		2,2	
	FLJ10081	hypothetical protein FLJ10081	2,1	
IGFBP6	insulin-like growth factor binding protein 6		2,1	1,4
	SNX8	sorting nexin 8	2,1	
COTL1	coactosin-like 1 (<i>Dictyostelium</i>)		2,1	
	ECE1	Endothelin converting enzyme 1	-2,1	
IGFBP3	insulin-like growth factor binding protein 3		2,1	
	EFG1	mitochondrial elongation factor G1	5,4	
WS 427	DHRS3	Dehydrogenase/reductase (SDR family) member 3	4,6	13,6
	UPAR	plasminogen activator, urokinase receptor	3,2	2,4
PLGL	plasminogen-like		3,1	
	MGC35048	hypothetical protein MGC35048	2,5	
LAMA4	laminin, alpha 4		2,4	
	RARB	retinoic acid receptor, beta	2,3	5,3
RARRES3	retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 3		2,3	
	TAL1	T-cell acute lymphocytic leukemia 1	2,2	6,0
PLK2	polo-like kinase 2 (Drosophila)		2,2	
	C3AR1	complement component 3a receptor 1	-2,2	
PLAC2	placenta-specific 2		2,1	
	CCL2	Chemokine (C-C motif) ligand 2	2,1	
FLJ13710	hypothetical protein FLJ13710		2,1	
	NID2	nidogen 2 (osteonidogen)	2,1	
AKAP12	A kinase (PRKA) anchor protein (gravin) 12		2,0	2,2
	RARB	retinoic acid receptor, beta	2,0	5,1
CLTC	clathrin, heavy polypeptide (Hc)		-2,0	
	SLCO2A1	solute carrier organic anion transporter family, member 2A1	1,9	
VMP1	likely ortholog of rat vacuole membrane protein 1		1,9	
	GREM1	gremlin 1 homolog, cysteine knot superfamily (<i>Xenopus laevis</i>)	-1,8	-1,9
FLJ38507	colon carcinoma related protein		1,8	
	TARSH	target of Nesh-SH3	-1,7	
SLC38A2	solute carrier family 38, member 2		1,6	
	RARG	retinoic acid receptor, gamma	1,6	
GREM1	gremlin 1 homolog, cysteine knot superfamily (<i>Xenopus laevis</i>)		-1,6	-1,9
	CTGF	Connective tissue growth factor	1,6	
PFN1	profilin 1		-1,5	
	SLC38A2	solute carrier family 38, member 2	1,5	
P2RY2	Purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 2		-1,5	

Tabelle 7: Differentielle Genregulation in Wilms Tumoren der Hochrisikogruppe und in rezidivierten Wilms Tumoren (linke Spalten) im Vergleich zur Regulation derselben Gene in ATRA-behandelten Wilms Tumorzellen (rechte Spalten). Rot hinterlegte Zellen enthalten überexprimierte Gene, grüne Zellen herunterregulierte Gene. Graue Zellen entsprechen fehlenden oder nicht ausreichend reproduzierbaren Expressionsmessungen.

	Regulation (fold change) in			
	Wilms tumors with		RA treated cells	
	high risk	relapse	MZ 128	WS 427
CCNA2	2,1	2,1	-1,8	-1,6
UBE2C	2,8	2,7	-1,8	-1,2
CKS2	2,8	2,3	-1,8	
RARRES3	-2,1	-2,1	1,1	2,3
RARRES1	-2,0	-1,7	3,4	
C3AR1	-3,2	-2,4		-2,2
CCL2	-2,4	-2,5	1,4	2,1
CTGF	-3,0	-3,7	1,1	1,6
ITM2B	-2,0	-1,7	1,1	1,5
IGFBP3	-2,2	-1,6	2,1	1,2
AQP1	-3,0	-1,8	-2,7	-1,2

3.4.2 Der Retinsäure Signalweg in Wilms Tumoren

Der Retinsäure Signalweg ist sowohl an normalen Entwicklungsprozessen, z.B. der Nierenentwicklung (Burrow 2000), als auch an der Entstehung verschiedener Tumoren beteiligt (Freemantle et al. 2003). Der Retinsäure Signalweg schließt zwei Familien von nukleären Rezeptoren ein, die Retinoid Rezeptoren *RARA*, *RARB* und *RARG* sowie die Retinoid X Rezeptoren *RXRA*, *RXRB* und *RXRG*, die als *RAR/RXR* Heterodimere wirken (Kastner et al. 1997). All-trans Retinsäure aktiviert ausschließlich *RARs*, wohingegen 9-cis Retinsäure *RARs* und *RXRs* stimuliert. Die Überexpression von *RARs* durch ATRA wurde bereits beschrieben (Farias et al. 2002; Reynolds et al. 2003).

In Wilms Tumorzellen wurden die Retinoid Rezeptoren *RARB* und *RARG* als Folge der Retinsäure-Behandlung hochreguliert (siehe Tabelle 6), wohingegen *RARA* in beiden Zelltypen nicht differentiell reguliert wurde. Zudem wurde die Expression der Tumor

Suppressor Gene *RARB1* and *RARB3* (retinoic acid receptor responders 1 und 3) durch Retinsäure induziert.

Die Expression der vier Gene *RARB*, *RARG*, *RARB1* and *RARB3* führt zu reduziertem Zellwachstum und zur Differenzierung. In verschiedenen anderen Tumoren wurden entsprechend reduzierte mRNA Konzentrationen dieser Gene gefunden (Freemantle et al. 2003; Shyu et al. 2003; Sriuranpong et al. 2004).

RARB and *RARB3* haben zudem prognostische Bedeutung bei Neuroblastomen (Cheung et al. 1998) und B-Zell Lymphomen (Casanova et al. 2001). Auch bei der in Kapitel 2 beschriebenen Expressionsuntersuchung waren *RARB1* and *RARB3* in hochmalignen und rezidivierenden Wilms Tumoren herunterreguliert. Die Überexpression dieser Gene nach Behandlung mit Retinsäure zeigt daher ein positives Ansprechen der Wilms Tumorzellen auf Retinsäure an.

Ein weiteres Gen, das in beiden Zelltypen eine ausgeprägte differentielle Regulation (13,6- und 4,6-fache Überexpression) auf Retinsäure zeigte, war *DHRS3* (dehydrogenase/reductase SDR family member 3; auch als *PSDR1* oder *retSDR1* (prostate and retinal short chain dehydrogenase/reductase) bezeichnet). *DHRS3* ist ein bekanntes Retinsäure-abhängiges Gen (Cerignoli et al. 2002) und kodiert eine Retinal Reduktase, ein Schlüsselenzym des Retinsäure Metabolismus (Kedishvili et al. 2002). *DHRS3* wird in vielen Geweben exprimiert und führt zur Regeneration von Retinol. Die Aktivität von *DHRS3* ist dabei von *CRABP2* (cellular retinoic acid binding protein 2) abhängig (Cerignoli et al. 2002), das in Retinsäure-behandelten Wilms Tumorzellen ebenfalls hochreguliert wurde.

3.4.3 Einfluß der Retinsäure Behandlung auf andere Signalwege

Zusätzlich zum oben beschriebenen Retinsäure Signalweg wurden auch andere Signalwege durch die Retinsäure Behandlung aktiviert, die ebenfalls Auswirkungen auf Zellwachstum und -differenzierung haben. Insbesondere waren mehrere Gene aus dem *Smad/TGFβ* Signalweg differentiell reguliert.

Der *TGFβ* (transforming growth factor β) Signalweg übt einen starken inhibitorischen Einfluß auf den Zellzyklus aus. *SMAD* Proteine übermitteln diese Wachstumshemmung in direkter Interaktion mit *RARG* (Pendaries et al. 2003). In ATRA-behandelten Wilms Tumorzellen fand sich eine Überexpression von *SMAD3*, welches den *TGFβ* Signalweg aktivieren und somit das Tumorwachstum hemmen könnte. Diese Annahme wird auch durch die Beobachtung unterstützt, dass umgekehrt die Inaktivierung von *SMADs* in einigen anderen Tumoren mit

einer schlechten Prognose assoziiert war, z. B. in Brustkarzinomen und Colorektalen Karzinomen (Xie et al. 2002; Xie et al. 2003).

Aber auch Gene aus dem *IGF* (insulin growth factor) Signalweg interagieren mit dem *TGF β* Signalweg. So übermitteln u.a. die Gene *IGFBP3* and *CTGF/IGFBP8*, die ebenfalls in Wilms Tumorzellen hochreguliert waren, die antiproliferativen Effekte des *TGF β* Signalwegs (Kansra et al. 2000; Koliopanos et al. 2002). Weiterhin sind die in Wilms Tumorzellen regulierten Gene *PDGFRA* (platelet-derived growth factor receptor alpha) and *uPAR* (plasminogen activator urokinase receptor) am *TGF β* Signalweg beteiligt.

Insgesamt zeigen diese Expressionsuntersuchungen an Retinsäure-behandelten Wilms Tumorzellen, dass zusätzlich zum Retinsäure Signalweg weitere Signalkaskaden involviert sind, wobei der *SMAD/TGF β* Signalweg scheinbar eine wichtige Rolle spielt.

3.4.4. Konsequenzen dieser Experimente für die potentielle klinische Anwendung von Retinsäure bei fortgeschrittenen Wilms Tumoren

Die in diesem Kapitel beschriebenen Experimente führten zur Identifikation neuer Kandidatengene von Retinsäure in Wilms Tumoren. Mehrere dieser Gene waren in fortgeschrittenen Wilms Tumoren differentiell exprimiert und zeigten nach Behandlung mit Retinsäure eine inverse Regulation. Somit lieferten diese Experimente den ersten molekularen Hinweis auf einen potentiellen Nutzen einer Retinsäuregabe bei Wilms Tumoren. Insbesondere Kinder mit Chemotherapie-resistenten Tumoren könnten von einer alternativen oder zusätzlichen Retinsäure-Therapie profitieren.

Sicherlich werden weitere Studien benötigt, um diese Wirkung von Retinsäure zu bestätigen. All-trans Retinsäure müßte zudem mit anderen Retinoiden, wie 13-cis Retinsäure und dem synthetischen Fenretinide verglichen werden, und die pharmakokinetischen Eigenschaften wären eingehender zu untersuchen. Bei fortgeschrittenen Neuroblastomen erwies sich eine hochdosierte Pulstherapie, bei der im Rahmen einer Phase III Studie alle 24 Stunden infundiert wurde, als besonders effektiv (Reynolds et al. 2003).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass ATRA-Konzentrationen von 10 μ M das Zellwachstum hemmen und zur Veränderung der Expression führen. Dieselben Wirkungen von Retinsäure zeigten sich auch bei Konzentrationen zwischen 1 und 10 μ M in anderen Studien mit Tumorzellen (Freemantle et al. 2003). Ähnliche Konzentrationen können nebenwirkungsarm ebenfalls in *in vivo* Zielgeweben erreicht werden (Reynolds et al. 2003).

Zusammenfassend weist die vorliegende Studie erstmals darauf hin, dass die Gabe von Retinsäure einen sinnvollen ergänzenden Ansatz bei der Therapie des Wilms Tumors darstellen könnte.

4. Wilms Tumoren und der *Wnt* Signalweg

Der *Wnt/β-catenin* Signalweg ist an der Entstehung verschiedener Tumoren beteiligt. *β-catenin* nimmt dabei eine Schlüsselrolle ein. Zum einen bildet es einen Komplex mit Cadherinen und vermittelt dadurch die Adhäsion zwischen verschiedenen Zellen, zum anderen bildet es eine zentrale Schaltstelle im *Wnt* Signalweg. Die Aktivierung dieser Signalkaskade führt über die Bindung an *Tcf* Faktoren zur vermehrten Expression verschiedener Gene, z.B. *c-myc* und *cyclin D* aus dem Zellzyklus. Normalweise wird *β-catenin* durch *GSK3* phosphoryliert und anschließend abgebaut. Bei Mutationen im *β-catenin* Gen kann dieser Abbau nicht mehr stattfinden, so dass der *Wnt* Signalweg kontinuierlich aktiviert wird.

Die Häufigkeit, Art und Lokalisation der *β-catenin* Mutationen variiert in verschiedenen Tumoren (Polakis 2000). Bei Wilms Tumoren lassen sich Mutationen des *β-catenin* Gens in etwa 10-15% aller Tumoren nachweisen (Huff 1998), wobei eine „Hot Spot“ Mutationsstelle im Codon 45 (Serin) von Exon 3 des *β-catenin* Gens besteht (Kusafuka et al. 2002). Dort finden sich zum einen Deletionen des Serin-Codons, aber auch Missense Mutationen, die zur Substitution von Serin durch Phenylalanin oder Cystein führen.

In diesem Kapitel werden zwei Untersuchungen beschrieben, die sich mit dem *Wnt* Signalweg in Wilms Tumoren beschäftigen. Kapitel 4.1 enthält eine Studie, deren Ziel die Identifizierung von Kandidatengenen war, die spezifisch in Wilms Tumoren dereguliert sind. Kapitel 4.2 fasst die Untersuchung des kürzlich entdeckten Gens *Chibby*, einem neuen Antagonisten des *Wnt* Signalweges, in Wilms Tumoren zusammen.

4.1 Identifizierung neuer Kandidatengene aus dem *Wnt/β-catenin* Signalweg in Wilms Tumoren

Die differentielle Regulation von Genen des *Wnt* Signalweg kann als Folge von Mutationen in verschiedenen Genen der *Wnt* Signalkaskade eintreten, z.B. *β-catenin*, *APC* oder *Axin*. Bei den häufigeren adulten Tumoren mit entsprechenden Mutationen, wie z.B. Brust- und Koloncarcinomen, wurden bereits einige Zielgene beschrieben. Dazu gehören u.a. *c-myc*, *cyclin D*, *PITX2* und *E-cadherin* (vergleiche *Wnt* Homepage, <http://www.stanford.edu/~rnusse/Wntwindow.html>).

Mutationen im *β-catenin* Gen treten in etwa 10-15% aller Wilms Tumore auf, deregulierte Zielgene des *Wnt/β-catenin* Signalwegs sind jedoch bisher nicht in Wilms Tumoren beschrieben worden. Daher wurde in einem Teilprojekt dieser PhD-Arbeit eine große Anzahl von Wilms Tumore auf *β-catenin* Mutationen untersucht. Der Vergleich der

Expressionsmuster beider Tumorgruppen (mit und ohne β -catenin Mutation) diente der Identifikation von Zielgenen des *Wnt*/ β -catenin Signalwegs, die spezifisch in Wilms Tumoren mit aktivierenden β -catenin Mutationen dereguliert sind.

4.1.1 Experimentelle Durchführung

4.1.1.1 Mutationsanalyse und Microarray Experimente

73 primäre Wilms Tumore der deutschen SIOP/GPOH 93-01 Studie wurden auf Mutationen und Deletionen im Exon 3 des β -catenin Gens untersucht. Dazu wurden die Exons 2 bis 4 mit den Primern b-catenin-ex2 (TGAAAATCCAGCGTGGACAATG) and b-catenin-ex4r (GATTGCACGTGTGGCAAGTTCT) amplifiziert und gelelektrophoretisch auf verkürzte Fragmente untersucht. Exon 3 wurde anschließend mit dem Primer b-catenin-in3r (TCTGACTTTCAGTAAGGCAATGAA) sequenziert (Beckman CEQ2000 Sequenzierer). Zusätzlich wurde das *WT1* Gen in 64 dieser Wilms Tumore untersucht. Dazu wurden sowohl SSCP (single strand confirmation polymorphism) als auch DHPLC (denaturing high-performance liquid chromatography) eingesetzt. Exons mit abweichenden SSCP oder DHPLC Profilen wurden anschließend sequenziert.

Die Durchführung der Microarray Expressionsanalysen wurde bereits in Kapitel 2.2 beschrieben. Nach Normalisierung und Qualitätskontrolle standen 11.552 replizierte Expressionsmessungen von 73 Wilms Tumoren zur Verfügung. Diese Expressionsdaten wurden bezüglich der beiden Tumorgruppen (mit und ohne β -catenin Mutation) mit T-Statistik und Fold change Analyse ausgewertet.

Zur Verifizierung der Expressionsdaten wurden Real Time PCR Analysen mit allen Wilms Tumor Proben mit β -catenin Mutation und 60 von 65 Tumoren ohne β -catenin Mutation durchgeführt (vergleiche Kapitel 2.2.3).

Zur Untersuchung, ob bestimmte Gene oder Gengruppen innerhalb der Kandidatengenlisten im Verhältnis zur Gesamtzahl der analysierten Gene überrepräsentiert sind, wurde auch eine EASE (Expression Analysis Systematic Explorer)-Analyse durchgeführt (vergleiche Kapitel 2.2.4). Das statistische Mass für eine Überrepräsentation ist der sog. „EASE score“, der bei Werten < 0.05 eine statistisch signifikante Überrepräsentation von Genen oder Gengruppen anzeigt (Hosack et al. 2003).

4.1.1.2 Immunhistochemische Untersuchungen

β-catenin Färbungen wurden an 47 von 73 Wilms Tumoren durchgeführt, deren Expressionsprofil durch Microarrays analysiert wurde. Hierzu wurden Schnitte aus Formalinfixiertem und Paraffin-eingebettetem Tumorgewebe entparaffiniert und mit einem monoklonalen anti-*β-catenin* Antikörper gefärbt. Die Färbungen wurden separat für verschiedene histologische Zelltypen (blastemreiche, stromareiche, epitheliale und myogene Zellen) und unterschiedliche Zellkompartimente (membranöse, nukleäre und cytoplasmatische Färbung) ausgewertet.

4.1.2 Ergebnisse und Diskussion

β-catenin Mutationen wurden in acht von 73 primären Wilms Tumoren gefunden. Alle Mutationen betrafen Codon 45, das eine spezifische Mutationsstelle für *β-catenin* Mutationen in Wilms Tumoren darstellt (Kusafuka et al. 2002). In vier Tumoren war Codon 45 (Serin) deletiert, in den anderen vier Tumoren traten Missense Mutationen mit Substitution des Serins durch Phenylalanin oder Cystein auf. Sechs von acht Tumoren mit *β-catenin* Mutation zeigten einen stromareichen Histotyp, zwei weitere Tumoren waren triphasisch (Tabelle 8).

Tabelle 8: Mutationen in *β-catenin* und *WT1*. *β-catenin* wurde in allen 73 Wilms Tumoren untersucht, *WT1* in 64 Tumoren (inklusive aller Tumoren mit *β-catenin* Mutation).

Tumor	β-catenin Mutation	Allel Status	WT1 Mutation	Art der Mutation	Allel Status	Histologie
WS-195	S45F	Heterozygot	Nein			Triphasisch
WS-230	S45del	Heterozygot	Nein			Stromareich
WS-246	S45del	Heterozygot	Nein			Stromareich
WS-275	S45F	Heterozygot	Nein			Triphasisch
WS-300	S45C	Heterozygot	Nein			Stromareich
WS-31	S45del	Homozygot	946-1G>T (exon 3)	Splice site Mutation	Homozygot	Stromareich
WS-208	S45del	Heterozygot	1373_1391dup19 nt (exon 7)	Frameshift	Heterozygot	Stromareich
WS 258	S45F	Heterozygot	548delG (exon 1)	Frameshift	Heterozygot	Stromareich
WS-104	Nein		Q298Stop (exon 6)	Trunkierende Mutation	Heterozygot	Regressiv
WS-197	Nein		1677_1678delCG (exon 10)	Frameshift	Heterozygot	Stromareich

Anschließend wurden die Expressionsdaten von Wilms Tumoren mit *β-catenin* Mutation mit den Daten von nicht-mutierten Tumoren verglichen. Bei der Erstellung von Kandidatengenlisten wurden sowohl T-Statistik Werte (>1.96) als auch Fold change

Unterschiede (> 2 -fold) berücksichtigt. Insgesamt wurden 136 differentiell regulierte Gene identifiziert. Diese waren in Tumoren mit β -catenin Mutationen überwiegend hochreguliert. Tabelle 9 enthält die ersten vierzig deregulierten Gene in Wilms Tumoren mit β -catenin Mutation.

β -catenin Mutationen in Wilms Tumoren sind häufig mit *WT1* Mutationen assoziiert (Maiti et al. 2000). Um auszuschließen, dass die Expressionsunterschiede in Tumoren mit β -catenin Mutationen durch zusätzliche *WT1* Mutationen in dieser Gruppe beeinflusst werden, wurde *WT1* in allen Tumoren mit β -catenin Mutationen und der Mehrheit der Tumoren ohne β -catenin Mutation (56 von 65) auf Mutationen untersucht. Dabei wurden fünf *WT1* Mutationen identifiziert, die aber sowohl in der Gruppe der Tumoren mit β -catenin Mutationen (drei *WT1* Mutationen) als auch in der Vergleichsgruppe der Tumoren ohne β -catenin Mutation (zwei *WT1* Mutationen). Udtha et al. (2003) analysierten Expressionsunterschiede zwischen Wilms Tumoren mit und ohne *WT1* Mutation. Es fanden sich jedoch keine Überschneidungen mit differentiell regulierten Genen in Tumoren mit β -catenin Mutation. Insbesondere für die in *WT1*-mutierten Tumoren deregulierten Gene *CMYC* und *EGR1* zeigten sich keine Expressionsunterschiede bei den nach unterschiedlichem β -catenin Status analysierten Tumoren (jeweils minimale Herunterregulation von 1,13 und 1,02 in Tumoren mit β -catenin Mutation). Demnach werden die hier beschriebenen Expressionsunterschiede in Wilms Tumoren mit β -catenin Mutationen wahrscheinlich nicht stark durch zusätzliche *WT1* Mutationen beeinflusst.

Tabelle 9: Differentiell regulierte Gene in Wilms Tumoren mit β -catenin Mutationen. Die Tabelle enthält die ersten 40 von insgesamt 136 Genen mit einem Fold change > 2 und einem T-Statistik (Absolut)Wert (abs(T)) von $> 1,96$. Schwarz hinterlegte Gene entsprechend bereits bekannten Zielgenen des *Wnt*/ β -catenin Signalwegs.

Zusätzlich wurden alle Gene auf eine Muskel-spezifische Überexpression untersucht. Hierzu wurde die Expressions-Datenbank SymAtlas v1.0.1 (<http://symatlas.gnf.org/SymAtlas/>) genutzt (++ sehr hohe, + relativ hohe, 0 keine Muskel-spezifische Regulation; n.a. nicht verfügbar in der SymAtlas Datenbank). Die Regulation der Gene *MYL2*, *MB*, *DPT*, *CASQ2* und *PITX2* wurden durch Real Time PCR Analyse verifiziert (vergleiche Abbildung 1 in Publikation 3).

Gensymbol	Beschreibung	Fold change	abs (T)	GNF SymAtlas
MYL2	myosin, light polypeptide 2, regulatory, cardiac, slow	21,18	3,23	++
MB	Myoglobin	12,53	3,56	++
ZDHHC2	Zinc finger, DHHC domain containing 2	12,17	3,64	0
SMPX	small muscle protein, X-linked	11,53	3,04	++
MYH1	myosin, heavy polypeptide 1, skeletal muscle, adult	8,84	3,06	++
DPT	Dermatopontin	8,50	4,16	0
STS	steroid sulfatase (microsomal), arylsulfatase C, isozyme S	8,40	3,76	0
MYL3	myosin, light polypeptide 3, alkali; ventricular, skeletal, slow	8,07	3,63	++
TNNI1	troponin I, skeletal, slow	8,00	3,50	++
TPM1	tropomyosin 1 (alpha)	7,42	3,17	++
CASQ2	calsequestrin 2 (cardiac muscle)	6,59	2,99	++
CKMT2	creatine kinase, mitochondrial 2 (sarcomeric)	5,96	4,20	++
LOC92346	LOC92346	5,78	3,36	0
PITX2	paired-like homeodomain transcription factor 2	5,38	3,31	0
MGC2744	hypothetical protein MGC2744	5,07	3,19	0
FRCP2	likely ortholog of mouse fibronectin type III repeat containing protein 2	4,83	3,11	n.a.
SGCA	sarcoglycan, alpha (50kDa dystrophin-associated glycoprotein)	4,81	2,89	++
ZNF207	Zinc finger protein 207	4,81	4,13	+
H11	protein kinase H11	4,74	2,96	+
AMPD1	adenosine monophosphate deaminase 1 (isoform M)	4,50	2,55	++
TNNI2	troponin I, skeletal, fast	4,48	3,10	++
FABP7	Fatty acid binding protein 7, brain	4,47	2,36	0
WIF1	WNT inhibitory factor 1	4,41	3,68	0
FLJ12921	hypothetical protein FLJ12921	4,36	2,86	++
NNAT	Neuronatin	4,31	2,75	0
KLK6	kallikrein 6 (neurosin, zyme)	-4,25	3,56	0
MLC1SA	myosin light chain 1 slow a	4,08	3,75	+
CYP2J2	Cytochrome P450, family 2, subfamily J, polypeptide 2	4,05	3,74	+
HSA243396	voltage-gated sodium channel beta-3 subunit (scn3b gene)	3,92	2,55	0
MEG3	maternally expressed 3	3,89	2,52	0
MGC2628	hypothetical protein MGC2628	3,88	3,72	+
APCDD1	adenomatosis polyposis coli down-regulated 1	3,78	2,50	0
TBX15	T-box 15	3,67	2,04	+
EDN3	endothelin 3	3,60	3,93	0
ITGB1BP2	integrin beta 1 binding protein (melusin) 2	3,59	2,83	++
CCL18	chemokine (C-C motif) ligand 18 (pulmonary and activation-regulated)	-3,44	2,48	0
CACNB1	calcium channel, voltage-dependent, beta 1 subunit	3,43	3,10	++
HSA243396	voltage-gated sodium channel beta-3 subunit (scn3b gene)	3,27	2,42	0
ITM2A	integral membrane protein 2°	3,22	2,39	0
ACTG2	actin, gamma 2, smooth muscle, enteric	3,22	3,09	0

4.1.2.1 Deregulierte Gene des *Wnt* Signalwegs in Wilms Tumoren

Interessanterweise fanden sich in Wilms Tumoren mit β -catenin Mutationen sowohl stark deregulierte Zielgene des *Wnt* Signalweges als auch in der *Wnt* Signalkaskade vorgeschaltete deregulierte Gene. Im Folgenden sollen einige dieser Gene diskutiert werden (vergleiche Abbildung 15).

Unter den Zielgenen des *Wnt* Signalweges, also den Genen die dem durch Mutation aktivierten β -catenin Gen nachgeschaltet sind, war *PITX2* mit 5,4-facher Regulation am stärksten überexprimiert. *PITX2* ist ein bekanntes direktes Zielgen des *Wnt*/ β -catenin Signalwegs und wirkt als Transkriptionsfaktor (Lin et al. 1999). Es spielt eine entscheidende Rolle in Entwicklungsprozessen, indem es vor allem die Zellproliferation fördert (Kioussi et al. 2002). *APCDD1* ist ein weiteres überexprimierte direkt Zielgen des *Wnt*/ β -catenin Signalwegs. Es wurde ursprünglich als *APC* induzierbares Gen in Koloncarcinom-Zellen isoliert (Kioussi et al. 2002). Die Überexpression von *APCDD1* ist mit Tumorprogression *in vitro* und *in vivo* assoziiert (Kioussi et al. 2002). Diese Proliferations-fördernde Wirkung von *PITX2* und *APCDD1* könnte auch in Wilms Tumoren mit β -catenin Mutation vorhanden sein und zum Tumorwachstum beitragen. Weitere Gene, die zur Proliferation von Wilms Tumoren mit β -catenin Mutationen betragen könnten, finden sich in Abbildung 15.

Ebenfalls fanden sich deregulierte Gene, die in der *Wnt*/ β -catenin Signalkaskade der β -catenin Mutation vorgeschaltet sind. Die am stärksten überexprimierten Gene waren *WIF1* und *PRDC*, die beide als *Wnt* Antagonisten wirken und der *sFRP* (secreted Frizzled-related protein) Familie zugeordnet werden. Beide Gene spielen eine direkte Rolle in der Tumorigenese. Die Expression von *WIF1* (*Wnt* inhibitory factor 1) ist in verschiedenen Tumorarten vermindert, z.B. in Prostata-, Brust- oder Lungentumoren (Wissmann et al. 2003). Allerdings fand sich keine Korrelation zum Tumorstadium, so dass angenommen wird, dass der Verlust von *WIF1* und damit eine Aktivierung der *Wnt* Signalkaskade in einem relativ frühen Stadium der Tumorentstehung eintritt. Die Überexpression von *WIF1* wurde kürzlich auch in Wilms Tumoren mit *WT1* Mutationen beschrieben, wobei etwa die Hälfte der Tumoren gleichzeitig auch eine β -catenin Mutation aufwies (Li et al. 2004). *PRDC* ist eine starker Antagonist von sog. Bone Morphogenetic Proteins (*BMPs*), die in Proliferationsprozesse während der Embryogenese und Carcinogenese involviert sind (Sudo et al. 2004). Umgekehrt hemmt die Überexpression von *PRDC* die Proliferation von Tumorzellen (Chen et al. 2002). Da die Gene *WIF1* und *PRDC* in Wilms Tumoren mit β -

catenin Mutationen überexprimiert waren, wirken sie somit der durch die β -*catenin* Mutation verursachten starken Aktivierung der Wnt Signalkaskade entgegen.

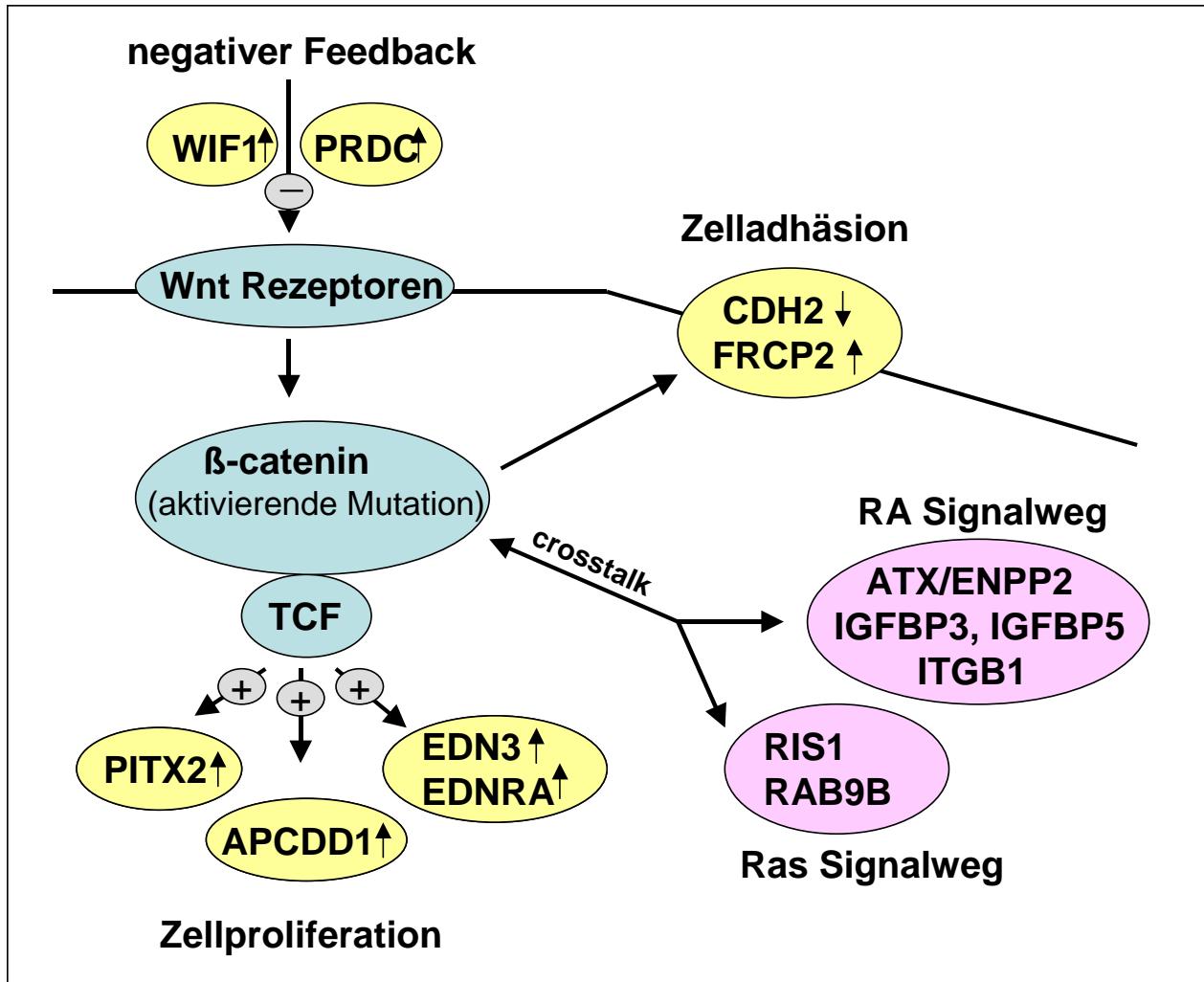


Abbildung 15: Deregulierte Wnt Zielgene in Wilms Tumoren mit β -*catenin* Mutationen. Mutiertes β -*catenin* kann nicht mehr abgebaut werden, was entsprechend zu einer dauerhaften und unregulierten Aktivierung von β -*catenin* Zielgenen, wie z.B. *PITX2* und *APCDD1*, führt. Als Reaktion auf die Daueraktivierung des Wnt Signalweges werden Wnt Inhibitoren wie *WIF1* und *PRDC* überexprimiert, wobei dieser negative Feedback Mechanismus aufgrund der β -*catenin* Mutation ineffektiv bleibt.

Das Expressionmuster in β -*catenin* mutierten Wilms Tumoren gibt ebenfalls Hinweise auf eine Regulation von Genen, die an der interzellulären Adhäsion beteiligt sind. Außerdem werden auch andere Signalkaskaden wie der Retinsäure und der Ras Signalweg im Sinne eines „Crosstalks“ beeinflusst.

Zusammenfassend finden sich also zwei Gruppen von überexprimierten Genen in Wilms Tumoren mit β -*catenin* Mutation: zum einen nachgeschaltete Zielgene wie z.B. *PITX2* und *APCDD1*, zum anderen der β -*catenin* Mutation vorgeschaltete Gene wie *WIF1* und *PRDC*. Die erste Gruppe dieser Gene vermittelt eine Aktivierung der Wnt Signalkaskade, wohingegen

die zweite Gruppe hemmende Wirkung auf den dauerhaft aktivierten *Wnt* Signalweg ausübt. Somit scheint die Überexpression von *Wnt* Antagonisten als Folge der unkontrollierten *Wnt* Aktivierung aufzutreten und einen negativen, aber ineffektiven Feedback Mechanismus darzustellen.

Weitere Komponenten des *WNT/β-catenin* Signalwegs waren jedoch nicht dereguliert. Die differentielle Expression der Gene *APC*, *CCND1-3*, *DVL2* und *3*, *FZD1,4* und *8*, *GSK3B*, *JUN*, *V-MYC*, *PSEN1*, *ROCK1*, *SMAD2* und *3*, *WNT2,4* und *5B* lag dabei jeweils unter einem Wert von 1,2-facher Regulation. Auch bei der EASE-Analyse waren Gene des *WNT/β-catenin* Signalwegs nicht signifikant in der Liste der deregulierten Gene überrepräsentiert (EASE score > 0.05). Dementsprechend scheint eine spezifische und ausgeprägte Dysregulation einer relativ begrenzten Anzahl von *WNT/β-catenin* Signalweg-abhängigen Genen in Wilms Tumoren mit *β-catenin* Mutationen vorzuliegen.

4.1.2.2 Differentielle Regulation Muskel-spezifischer Gene in Wilms Tumoren mit *β-catenin* Mutationen

Auffälligerweise fanden sich unter den stark regulierten Genen in Wilms Tumoren mit *β-catenin* Mutationen viele Muskel-spezifische Gene wie z.B. Myoglobin oder die leichten und schweren Ketten von Myosin (vergleiche Tabelle 9). Um zu untersuchen, ob diese Expression mit histologischen oder immunhistochemischen Kriterien korreliert, wurden *β-catenin* Färbungen an den meisten Tumoren vorgenommen. Dabei zeigte sich, dass stromareiche Tumoren einen großen Anteil myogen differenzierter Areale aufwiesen, und zwar unabhängig vom Mutationsstatus des *β-catenin* Gens. Dementsprechend hat die Deregulation von Muskel-spezifischen Genen ein histologisches Korrelat im Vorhandensein myogener Zelldifferenzierung in Wilms Tumoren mit *β-catenin* Mutationen.

Das Vorkommen myogener Anteile wurde zuvor nur beim fetalen rhabdomyomatösen Nephroblastom beschrieben (Maes et al. 1999). Dies ist eine Wilms Tumor Variante mit einer häufigen Chemotherapie-Resistenz, aber einer vergleichsweise guten Prognose. Diese Parameter verhielten sich in unseren Wilms Tumoren mit *β-catenin* ähnlich: Im Vergleich zu anderen Wilms Tumoren war das Ansprechen auf die Chemotherapie deutlich schlechter, wohingegen keiner der Tumoren mit *β-catenin* Mutation rezidierte.

In Wilms Tumoren ohne *β-catenin* Mutation entsprach die prädominierende *β-catenin* Färbung dem jeweils prädominant Zelltyp. Bei der subzellulären *β-catenin* Färbung fand sich folgendes Muster: (1) epitheliale und blastemale Zelltypen zeigten eine ausgeprägte zytoplasmatische und membranöse, aber keine nukleäre Färbung; (2) stromale und myogene

Zelltypen wurden cytoplasmatisch und nuklear gefärbt, aber nicht membranös. Daher scheint β -catenin in diesen unterschiedlich differenzierten Tumoren unterschiedliche Aufgaben einzunehmen: (1) in epithelialen und blastemalen Zellen ist es eher in Adhäsionsprozesse involviert, wohingegen (2) in stromalen und myogenen Zellen die Aktivierung des Wnt Signalweges im Vordergrund zu stehen scheint. Dieser Hypothese entsprechend findet sich in Wilms Tumoren mit β -catenin Mutationen häufig eine Translokation von β -catenin vom Cytoplasma in den Nukleus (Koesters et al. 2003).

Zusammenfassend wurden in diesem Teilprojekt Gene identifiziert, die spezifisch in Wilms Tumoren mit β -catenin Mutationen dereguliert waren. Dabei tragen deregulierte Zielgene von β -catenin wahrscheinlich zur vermehrten Zellproliferation bei. Die ebenfalls überexprimierten und vorgeschalteten Inhibitoren des Wnt Signalwegs deuten auf einen negativen Feedback Mechanismus hin, der allerdings im Fall einer vorliegenden β -catenin Mutation (und dadurch bewirkten Daueraktivierung des Wnt Signalwegs) unwirksam wäre.

Der große Anteil Muskel-spezifischer Gene unter den am stärksten regulierten Genen entspricht der histologischen Beobachtung von vermehrter myogener Differenzierung in diesen Tumoren und einer stärkeren β -catenin Färbung.

4.2 Untersuchung von Chibby, einem neuen Antagonisten des Wnt Signalweges

Das Gen *Chibby* (*C22ORF2*) wurde kürzlich als ein neuer Antagonist des Wnt Signalwegs entdeckt (Takemaru et al. 2003). *Chibby* ist in der chromosomal Bande 22q13 lokalisiert. Es kodiert für ein „coiled coil“ Protein, das mit dem Transkriptionsfaktor *Lef-1* um die Bindung an β -catenin konkurriert und somit die transkriptionelle Aktivierung von Zielgenen des Wnt Signalwegs hemmt. Eine differentielle Regulation von *Chibby* wurde in Uterus- und Schilddrüsencarcinomen gezeigt (Greaves 2003).

Analysen zur subzellulären Verteilung des β -catenin Proteins zeigten, dass Mutationen im β -catenin Gen mit einer verstärkten intranukleären Ansammlung von β -catenin in Wilms Tumorzellen einhergehen (Koesters et al. 2003). Allerdings konnte eine entsprechende intranukleäre β -catenin Färbung auch in einigen Wilms Tumoren ohne β -catenin Mutation beobachtet werden. Dies deutete darauf hin, dass der Wnt Signalweg auch in Tumoren ohne β -catenin Mutation aktiviert sein kann, und eine Mutation anderer beteiligter Gene in diesen Tumoren wahrscheinlich ist.

4.2.1 Durchführung der Experimente

Um eine mögliche Rolle von *Chibby* in Wilms Tumoren zu untersuchen, wurden zwei experimentelle Strategien angewandt:

Zum einen wurde die Expression von *Chibby* in 142 Wilms Tumoren der deutschen SIOP/GPOH 93-01 Studie analysiert. Dazu wurde RNA isoliert, cDNA synthetisiert und eine quantitative Real Time PCR Untersuchung durchgeführt. Zur Standardisierung wurde gleichzeitig die Expression des Haushaltsgens *HPRT* ermittelt. Die Expressionsdaten wurden nach verschiedenen klinischen und histologischen Kriterien analysiert. Die klinischen Kriterien waren das Vorliegen von Metastasen (ja/nein), das spätere Auftreten eines Rezidivs (ja/nein) und das Ansprechen auf die präoperative Chemotherapie (Tumorvolumenreduktion nach präoperativer Chemotherapie $>/< 50\%$). Bei der Stratifizierung der Tumorhistologie wurden mittelgradig maligne Tumoren (Standardrisiko: triphasische, regressive, stromareiche und epitheliale Tumoren) mit hochmalignen Tumoren (blastemreiche und anaplastische Tumoren) verglichen. Zusätzlich wurde der Mutationsstatus von *WT1* und β -*catenin* ermittelt und zur Stratifizierung der Expressionsdaten von *Chibby* eingesetzt. *WT1* wurde durch SSCP oder DHPLC untersucht, wobei Exons mit auffälligem Profil anschließend sequenziert wurden. β -*catenin* wurde direkt sequenziert.

Die zweite Strategie bestand in einer cDNA-Mutationsanalyse von *Chibby* bei einer Auswahl von 21 der 142 Wilms Tumoren. Hierbei wurden Tumoren mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit einer *Chibby* Mutation eingeschlossen: dazu zählten (1) stromareiche Tumoren und Tumoren mit (2) *WT1* Mutation und/oder (3) β -*catenin* Mutation. Die Tumor cDNAs wurden amplifiziert und aufgereinigt. Anschließend wurde der gesamte kodierende Bereich sequenziert.

4.2.2 Ergebnisse und Diskussion

Bei der Stratifizierung der Expressionsdaten von *Chibby* ergaben sich bei keinem der angewandten Kriterien (Metastasen, Rezidiv, präoperative Chemotherapie, *WT1* und β -*catenin* Mutationsstatus) signifikante Expressionsunterschiede (Abbildung 16).

Ebenfalls bei der Sequenzanalyse von *Chibby* konnten keine Mutationen im kodierenden Bereich festgestellt werden. Die einzige relevante Veränderung war eine bisher nicht beschriebene Splicevariante, die in allen Wilms Tumoren geringgradig ausgeprägt vorlag. Bei dieser Splicevariante in *Chibby* wird das Exon 4 bei der Translation übersprungen, und eine in Exon 5 auftretende Verschiebung des Leserasters führt zu einem verkürzten Protein. Es stellte

sich die Frage, ob diese Splicevariante auch in anderen Geweben vorliegt. Entsprechend wurden fetale Gewebeproben aus Niere, Leber, Milz, Gehirn und Lunge untersucht, wobei die Splicevariante in allen Geweben auf einem niedrigen Level vorlag. Entsprechend ist eine pathologische Bedeutung dieser neuen Splicevariante unwahrscheinlich.

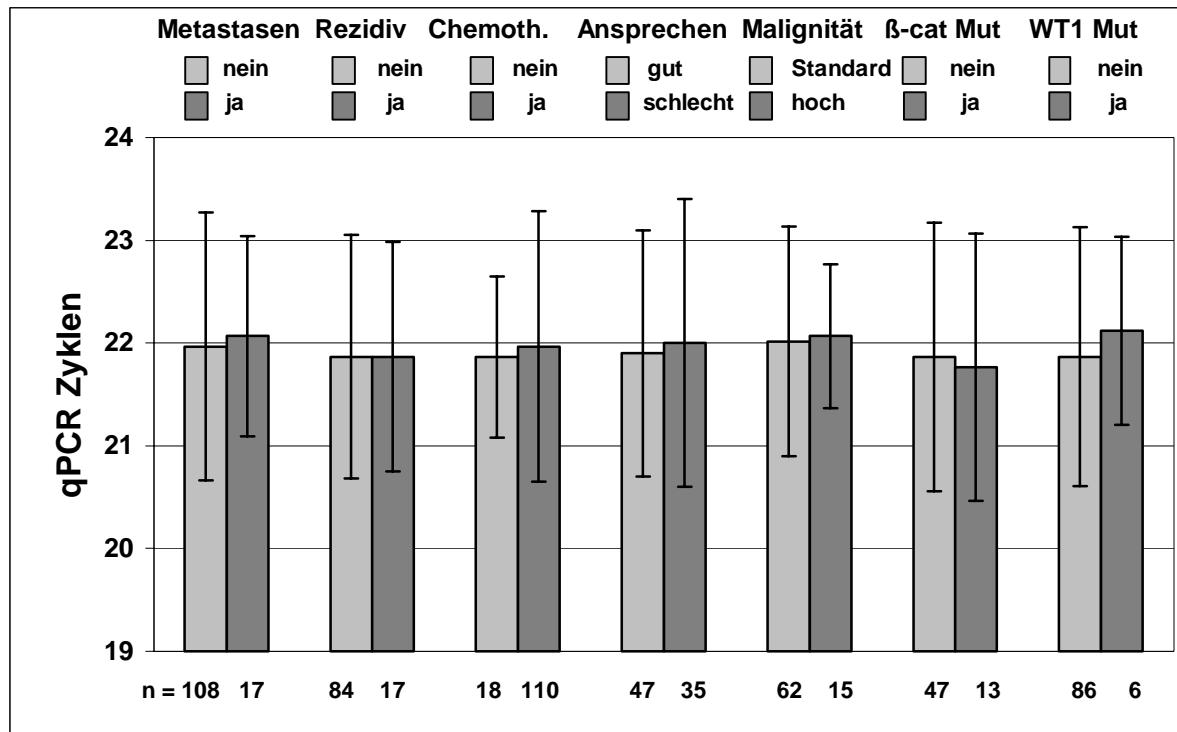


Abbildung 16: Expression von *Chibby* in 142 Wilms Tumoren, die nach verschiedenen klinischen und histologischen Kriterien sowie dem Mutationsstatus statifiziert wurden. Dargestellt sind die medianen Zyklusdifferenzen der Real Time RT-PCR Analyse mit den zugehörigen Standardabweichungen. Die Anzahl der Tumoren in einzelnen Gruppen ist unterhalb der Säulen angegeben. Die Gruppe der rezidiv-freien Tumoren enthält ausschließlich Tumoren von Kindern mit einem rezidiv-freien Follow-up von mindestens drei Jahren. Eine Tumorvolumenreduktion von > 50% nach präoperativer Chemotherapie wurde als gutes Ansprechen definiert, entsprechend wurden Tumoren mit einer Volumenreduktion < 50% oder einer Volumenzunahme der Gruppe mit schlechtem Ansprechen zugeordnet. Die Risikogruppen beziehen sich auf die histologische Subtypisierung. Die Standardrisikogruppe enthält 32 triphasische, 15 regressive, 7 stromareiche und 8 epitheliale Tumoren, die Hochrisikogruppe besteht aus 11 blastemreichen und 4 anaplastischen Tumoren.

Außerdem wurde in zehn der analysierten Wilms Tumoren ein (stiller) Polymorphismus (435T/C) in der *Chibby* Exon Sequenz entdeckt, der bei sieben Tumoren in heterozygoter Form und bei drei Tumoren in homozygoter Form vorlag. Dieser Polymorphismus wurde bereits beschrieben (snp 3747174; http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/geneview?db=&gene=ENSG00000100211). Die Häufigkeit seines Auftretens stimmt bei den untersuchten Tumoren mit der vorbeschriebenen Häufigkeit überein (ca. 40-50%).

Zusammenfassend wurde die Bedeutung von *Chibby*, einem neuen Antagonisten des *Wnt* Signalwegs, bei der Entstehung von Wilms Tumoren untersucht. Es konnten weder Mutationen noch Expressionsunterschiede bei verschiedenen Wilms Tumoren festgestellt werden, obwohl eine differentielle Regulation von *Chibby* in anderen Tumoren vorbeschrieben war. Daher scheint *Chibby* nicht an der Entstehung von Wilms Tumoren beteiligt zu sein.

5. Neue Keimbahn *WT1* Mutation in einer Familie mit Wilms Tumor und Nephropathie

Das Wilms Tumor Gen 1 (*WT1*) spielt eine Schlüsselrolle bei der Entwicklung der Nieren und der Gonaden. Ursprünglich wurde es als Tumor Suppressoren in Wilms Tumoren isoliert (Call et al. 1990; Gessler et al. 1990).

Wie in Kapitel 1.3.1 beschrieben, finden sich in etwa 10-15% aller sporadischen Wilms Tumore somatische Mutationen in *WT1*. Bei etwa vier Prozent aller Kinder treten Wilms Tumor-assoziierte Syndrome auf, z.B. das Denys-Drash, das Frasier oder das WAGR Syndrom. Bei diesen Kindern ist der Anteil der *WT1*-Mutationen mit etwa 90% wesentlich höher, allerdings handelt es sich um Keimbahn-Mutationen.

Die Mutationsmechanismen unterscheiden sich bei den drei genannten Syndromen: (1) Beim Denys-Drash Syndrom liegen häufig Missense Mutationen in den Exons 8 und 9 vor, die für die DNA-Bindung wichtigen Zink-Finger Domänen verändern (Royer-Pokora et al. 2004). (2) Das Frasier Syndrom wird dagegen durch eine spezifische *WT1*-Mutation in der Splicesstelle des Intron 9 verursacht. Dadurch verschiebt sich das Gleichgewicht zwischen zwei Splicevarianten (Barbaux et al. 1997; Klamt et al. 1998a). (3) Beim WAGR Syndrom finden sich zytogenetisch sichtbare Deletionen in der Chromosomenbande 11p13, die zum Ausfall mehrerer Gene führen. In den Wilms Tumoren von WAGR Patienten trägt das zweite *WT1*-Allel eine somatische Mutation (Huff 1998).

Vermutlich sind diese verschiedenen Mutationsmechanismen auch für die verschiedenen klinischen Symptome bei diesen Syndromen verantwortlich. Zusätzlich zum Wilms Tumor finden sich beim Denys-Drash Syndrom eine Nephropathie (meist eine diffuse mesangiale Sklerose, die zu frühem Nierenversagen führt) und eine Gonadendysgenesie (meist männlicher Hermaphroditismus). Die Nephropathie beim Frasier Syndrom ist eher fokal und segmental ausgeprägt und tritt später auf als beim Denys-Drash Syndrom. Die klinischen Symptome beim WAGR Syndrom (Aniridie, urogenitale Malformationen und geistige Retardierung) entsprechen der Ausdehnung der Deletion, wobei am häufigsten die Gene *WT1* und *PAX6* deletiert sind.

Nachfolgend wird die Entdeckung einer *WT1* Mutation in einer Familie mit Nephropathie und Wilms Tumor beschrieben, bei der ein neuer Mutationsmechanismus (Read-through) vorliegt.

5.1 Fallbeschreibung und methodische Durchführung

Die Indexpatientin entwickelte im Alter von neun Jahren einen unilateralen Wilms Tumor und wurde entsprechend des SIOP-Protokolls mit einer präoperativen Chemotherapie und einer

Tumornephrektomie behandelt. Die entfernte Niere zeigte eine Doppelanlage von Pyelon und Ureter. Da der Tumor dem Stadium III entsprach, wurde eine postoperative Strahlen- und Chemotherapie angeschlossen. Zusätzlich wurden eine Hypertrophie sowie eine Nephropathie der verbleibenden Niere festgestellt, die langsam progradient verliefen. Mehrere therapeutische Versuche mit Corticosteroiden und Antihypertensiva blieben erfolglos. Die Patientin ist derzeit 22 Jahre alt und wird aufgrund des fast vollständigen Nierenversagens in einem Dialysezentrum betreut.

Die Mutter der Indexpatientin entwickelte ebenfalls eine Nierensymptomatik mit Proteinurie und nephrotischem Syndrom, allerdings erst während ihrer zweiten Schwangerschaft mit 24 Jahren. Die Nephropathie war wie bei ihrer Tochter langsam progradient und führte zu Bluthochdruck und einer Lipidstoffwechselstörung. In der Nierenbiopsie zeigte sich eine fortgeschrittene Glomerulonephritis mit interstitieller Fibrose. Nach ebenfalls erfolgloser Corticosteroid-Therapie begann die Mutter der Indexpatientin eine Dialyse im 46. Lebensjahr. Der jüngere Bruder der Indexpatientin leidet unter starker Adipositas und Bluthochdruck, seine Nierenfunktion ist aber normal. Eine weitere Schwester und der Vater sind gesund.

Aus dem Blut aller Familienmitglieder wurde DNA extrahiert. Die *WT1* Exons 7-10 (bei der Indexpatientin ebenfalls die Exons 1-6) wurden amplifiziert und sequenziert. Die extrahierte DNA aus dem (mehr als zehn Jahre alten) Tumor der Indexpatientin war leider von schlechter Qualität, so dass sich *WT1* im Tumor nicht zuverlässig untersuchen ließ.

5.2 Ergebnisse und Diskussion

Die klinischen Symptome der Indexpatientin (Wilms Tumor und Nephropathie) und ihrer Mutter (Nephropathie) legten zunächst die Diagnose eines Denys-Drash Syndroms nahe. Jedoch wurde bei der molekularen Analyse keine der typischen Mutationen, z.B. in Exon 9 (R394W/Q/L) gefunden (Review von Royer-Pokora et al. 2004). Stattdessen konnte eine neue *WT1* Mutation im Exon 10 detektiert werden. Diese heterozygote Punktmutation (1730A/G) ist im Stop Codon des Exons 10 lokalisiert (X450W) und führt zu einer Verlängerung des *WT1* Proteins um 22 Aminosäuren. Zunächst ließ sich diese Mutation bei der Indexpatientin nachweisen und konnte anschließend ebenfalls bei ihrer Mutter und dem Bruder isoliert werden (siehe Abbildung 17).

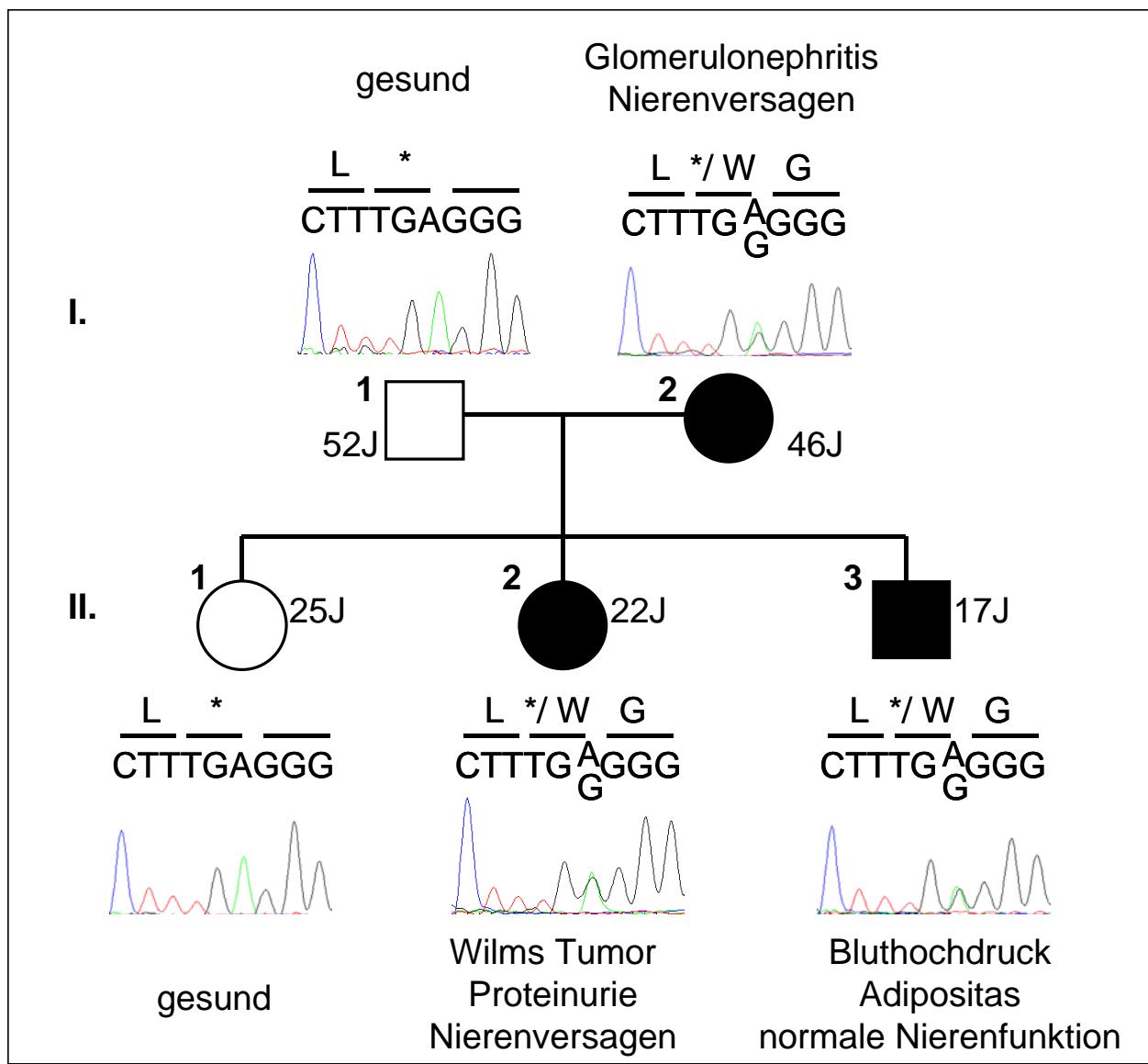


Abbildung 17: Familienstammbaum mit *WT1* Sequenzen (des Stop Codons in Exon 10 mit angrenzenden Triplets) und klinischen Informationen zu allen Familienmitgliedern.

Die *WT1* Keimbahn-Mutation im Stop Codon des Exon 10 (1730A/G; X450W) führt zu einem “Read-through” sowie einem dadurch verlängerten Protein und wurde bei drei Familienmitgliedern gefunden (I.2, II.2, II.3). Als klinische Manifestationen traten ein Wilms Tumor und eine Nephropathie bei einer Tochter (II.2) und eine Nephropathie bei der Mutter (I.2) auf. II.3 hatte eine normale Nierenfunktion.

Der Mechanismus dieser sog. Read-through Mutation ist bisher nicht bei Wilms Tumoren beschrieben worden. Allerdings ist der Mechanismus als Auslöser anderer Erkrankungen bekannt. So wird z.B. eine Form der α -Thalassämie durch eine Mutation im Stop Codon des Globin Gens verursacht (Clegg et al. 1971).

Die hier beschriebene *WT1* Read-through Mutation war mit einem vergleichsweise späten Auftreten des Wilms Tumors bei der Indexpatientin und der Nephropathie bei ihr und ihrer Mutter assoziiert. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass die Mutation zwar zu einem

verlängerten, aber sonst unveränderten Protein führt. Der Mutationstyp könnte auch erklären, warum die klinischen Symptome nicht genau mit den Symptomen anderer bekannter Wilms Tumor-assozierter Syndrome (Denys-Drash, Frasier und WAGR Syndrom) übereinstimmen. Das frühere Auftreten der Nephropathie bei der Indexpatientin im Vergleich zu ihrer Mutter könnte durch eine Schädigung ihrer verbleibenden Niere durch die Chemotherapie erklärt werden.

Urogenitale Fehlbildungen bei Wilms Tumor-assoziierten Syndromen betreffen wesentlich häufiger das männliche Geschlecht. Die hier beschriebene Indexpatientin hatte ebenfalls eine Nierenfehlbildung (Doppelanlage von Pyelon und Ureter), die ein Beispiel für eher geringgradig ausgeprägte Fehlbildungen beim weiblichen Geschlecht darstellen könnte.

Der 17-jährige Bruder der Indexpatientin, der ebenfalls die *WT1* Mutation trägt, hat bisher keine Einschränkung der Nierenfunktion und sein Bluthochdruck geht wahrscheinlich auf ausgeprägtes Übergewicht zurück. Da die Mutter jedoch mit 17 Jahren auch noch symptomfrei war, wird die Nierenfunktion des Bruders nun regelmäßig überprüft, um gegebenenfalls frühzeitig therapeutisch einzutreten.

Zusammenfassend stellt diese erstmals beschriebene *WT1* Mutation einen neuen Mutationsmechanismus (Read-through) dar, der mit einem relativ späten Auftreten von Wilms Tumor und Nephropathie assoziiert war.

6. Zusammenfassung

Das Nephroblastom, auch Wilms Tumor genannt, ist der häufigste bösartige Nierentumor bei Kindern und betrifft etwa eins von 10.000 Kindern. Bei 10-15% aller Wilms Tumoren finden sich Mutationen in *WT1* (Wilms Tumor Gen 1) und/oder β -catenin, wohingegen die molekulargenetischen Ursachen, die zur Entstehung der Mehrheit der Wilms Tumoren führen, noch unbekannt sind. Ebenfalls unerforscht sind Faktoren, die eine schlechte Prognose der Erkrankung vorhersagen.

Mittels cDNA-Microarray Expressionanalysen von 63 einheitlich therapierten Wilms Tumoren wurden Gene identifiziert, deren differentielle Regulation mit Tumorprogression und dem späteren Auftreten eines Rezidivs assoziiert ist. Bei der Clusteranalyse zeigten sich ausgeprägte Expressionsunterschiede besonders zwischen Rezidiv-freien und später rezidivierten Tumoren sowie zwischen Tumoren der histologischen Standardgruppe und der Hochrisikogruppe. Dabei waren mehrere differentiell regulierte Gene, wie z.B. *TRIM22*, *CENPF*, *MYCN*, *CTGF*, *RARRES3* und *EZH2*, mit Tumorprogression assoziiert. Die Expression dieser Gene wurde an denselben Tumoren mittels Real Time PCR bestätigt. Einige der Gene, die in Wilms Tumoren mit hoher Malignität und in rezidivierten Tumoren differentiell reguliert sind, gehören zum Retinsäure Signalweg. All-trans Retinsäure (ATRA) wird bereits bei einer Form der Leukämie (APL) und einigen pädiatrischen Tumoren therapeutisch eingesetzt. Daher stellte sich die Frage, ob auch Kinder mit fortgeschrittenen Wilms Tumoren von einer Retinsäure-Therapie profitieren.

Zur Beantwortung dieser Frage wurden Primärkulturen von Wilms Tumorzellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von all-trans Retinsäure behandelt. Anschließend wurde erneut die Genexpression mittels cDNA Microarrays und Real Time PCR untersucht. Viele Gene, die zuvor in fortgeschrittenen und rezidivierten Wilms Tumoren differentiell reguliert waren, zeigten nach der Behandlung mit Retinsäure eine entgegengesetzte Regulation. Zusätzlich zum aktivierten Retinsäure Signalweg wurden insbesondere Gene aus dem *TGF β* (tumor growth factor β) Signalweg stark reguliert. Sowohl der Retinsäure Signalweg als auch der *TGF β* Signalweg hemmen das Zellwachstum und stoppen daher das Fortschreiten einer Tumorerkrankung. Somit konnte auch auf molekularer Ebene nachgewiesen werden, dass Retinsäure eine neue Therapie bei Wilms Tumoren darstellen könnte.

Weiterhin wurden die Genexpressionsprofile von Wilms Tumoren mit und ohne Mutation in β -catenin (*CTNNB1*) untersucht, um spezifische Zielgene des *Wnt*/ β -catenin Signalwegs in Wilms Tumoren zu identifizieren. Durch den Vergleich dieser sich genetisch unterscheidenden Tumorgruppen konnten mehrere spezifisch in β -catenin mutierten Wilms

Tumoren deregulierte Gene beschrieben werden. Aber auch übergeordnete (d.h. in der *Wnt* Kaskade über dem *β-catenin* stehende) Gene waren dereguliert. Die Überexpression dieser Inhibitoren des *Wnt* Signalwegs könnte einen negativen (aber ineffektiven) Feedback-Mechanismus in Tumoren mit unkontrollierter *Wnt* Aktivierung darstellen. Zusätzlich fanden sich deregulierte Gene aus dem Retinsäure und dem *Ras* Signalweg, so dass eine Interaktion zwischen diesen Signalwegen und der *Wnt* Kaskade anzunehmen ist. Auffällig im Expressionsmuster von Wilms Tumoren mit *β-catenin* Mutationen war ein hoher Anteil von Muskel-spezifischen Genen. Passend dazu zeigte sich bei *β-catenin* Antikörper Färbungen von Wilms Tumor Gewebeschnitten ein hoher Anteil von myogen differenzierten Zellen in *β-catenin* mutierten Tumoren.

Da eine nukleäre *β-catenin* Färbung auch in Wilms Tumoren ohne *β-catenin* Mutation beschrieben wurde, sind wahrscheinlich weitere Gene an der Pathogenese des Wilms Tumors beteiligt. *Chibby* (*C22ORF2*) wurde kürzlich als ein neuer Antagonist in der *Wnt* Signalkaskade beschrieben, der die Transkriptionsaktivierung durch *β-catenin* hemmt. Die Expression von *Chibby* wurde in 142 Wilms Tumoren untersucht. Dabei ergaben sich jedoch keine signifikanten Expressionsunterschiede zwischen verschiedenen Tumorgruppen, die nach klinischen und histologischen Kriterien und dem Mutationsstatus stratifiziert wurden. Außerdem fanden sich keine Mutationen von *Chibby* in Wilms Tumoren. Eine Splice Variante, die zum Fehlen von Exon 4 in Wilms Tumoren führt, wurde ebenfalls in fetalen Normalgeweben entdeckt. Zudem wurde ein Polymorphismus in Exon 4 (435T/C) beschrieben. Zusammenfassend ergibt sich also kein Anhalt für eine Beteiligung von *Chibby* an der Entstehung von Wilms Tumoren.

Zuletzt wurde eine neue familiäre *WT1* Mutation im Stop Codon des Exon 10 (1730A/G; X450W) beschrieben, die mit dem Auftreten eines Wilms Tumors und einer Nephropathie in zwei Generationen assoziiert war. Es handelt sich um einen neuen Mutationstyp (Read-through), der in einem verlängerten aber sonst unveränderten *WT1* Protein resultiert. Entsprechend führte diese Mutation zu inkompletter Penetranz und einem relativ späten Auftreten von Wilms Tumor und Nephropathie in der beschriebenen Familie.

Summary

Among pediatric malignancies, Wilms tumor is one of the most frequent solid tumors affecting one in 10,000 children. It arises from embryonal blastema and most frequently presents as unilateral and sporadic tumor. Gene mutations in *WT1* and β -catenin are known to be involved in a subset of Wilms tumors (10-15%, respectively), whereas in the majority of Wilms tumors the genetic etiology of tumorigenesis is still unclear.

cDNA microarray experiments using 63 concordantly treated primary Wilms tumors were performed with the aim of detecting new candidate genes associated with malignancy grade and tumor progression. The stratification of expression data according to clinical criteria allowed a rather clear distinction between different subsets of Wilms tumors. Clear-cut differences in expression patterns were discovered between relapse-free as opposed to relapsed tumors and intermediate risk as opposed to high risk tumors. Several differentially expressed genes, e.g. *TRIM22*, *CENPF*, *MYCN*, *CTGF*, *RARRES3* and *EZH2*, were associated with Wilms tumor progression. For a subset of differentially expressed genes microarray data were confirmed by real time RT-PCR on the original set of tumors. Interestingly, the retinoic acid pathway was found to be deregulated at different levels in advanced tumors.

To investigate whether retinoic acid could be employed as a novel therapeutic agent in these tumors, cultured Wilms tumor cells were treated with different concentrations of all-trans retinoic acid (ATRA) and gene expression changes were assessed by real time RT-PCR as well as microarray analysis. Several genes that were previously found to be deregulated in advanced tumors exhibited opposite expression changes after ATRA treatment. In addition to enhanced retinoid signalling, the *TGF β* pathway was strongly activated by ATRA treatment of Wilms tumor cells. Both the retinoic acid and the *TGF β* pathway mediate inhibition of cell growth. These findings represent the first molecular evidence of a potential benefit from ATRA treatment in Wilms tumors.

Furthermore, to identify putative target genes of the *Wnt*/ β -catenin pathway in Wilms tumors, gene expression profiles in Wilms tumors with and without mutations in β -catenin (*CTNNB1*) were compared. The comparison of these genetically distinct sets of tumors revealed several target genes specifically deregulated in β -catenin mutated Wilms tumors. In addition to overexpressed downstream target genes, several upstream inhibitors of *Wnt*/ β -catenin signalling were also strongly upregulated and may represent a negative feedback mechanism in tumors with uncontrolled *Wnt* signalling. Moreover, deregulated genes in both the retinoic acid and the *Ras* pathway were identified, suggesting an association between these two

pathways and that of *Wnt*. Finally, the strong representation of muscle-related genes in the expression profile of β -catenin mutated Wilms tumors corresponded to histologically detectable areas of myomatous cells in these tumors which displayed intense β -catenin antibody staining.

Nuclear immunoreactivity for β -catenin has been described even in the absence of detectable β -catenin mutations. This suggested that other components of the *Wnt* pathway may be involved in the pathogenesis of a subgroup of Wilms tumors. *Chibby* (*C22ORF2*) is a recently identified antagonistic component of the *Wnt* pathway that inhibits the transcriptional activity of β -catenin. The expression of *Chibby* was analysed by real time RT-PCR in 142 Wilms tumors, but there was no significant expression difference in any group of tumors stratified according to clinical, histological and mutational criteria. Furthermore, mutation analysis did not reveal any mutations of the coding sequence. However, a constitutive splice variant leading to the absence of exon 4 in all Wilms tumors as well as in normal tissues and a frequent silent polymorphism in the *Chibby* exon 4 sequence (435T/C) were detected. These data strongly suggest that despite its attractive function as a modulator of β -catenin activity *Chibby* is not involved in Wilms tumorigenesis.

Finally, a novel familial *WT1* point mutation in the stop codon of exon 10 (1730A/G; X450W) is reported that was associated with Wilms tumor and slow progressive nephropathy. The type of mutation (read-through), which leads to an elongated but otherwise unchanged *WT1* protein, may be associated with incomplete penetrance and a relatively late onset of both Wilms tumor and nephropathy in the family described.

7. Literatur

- Arcellana-Panlilio MY, Egeler RM, Ujack E, Pinto A, Demetrick DJ, Robbins SM, Coppes MJ (2000) Decreased expression of the INK4 family of cyclin-dependent kinase inhibitors in Wilms tumor. *Genes Chromosomes Cancer* 29:63-9
- Barbaux S, Niaudet P, Gubler MC, Grunfeld JP, Jaubert F, Kuttenn F, Fekete CN, Souleyreau-Therville N, Thibaud E, Fellous M, McElreavey K (1997) Donor splice-site mutations in WT1 are responsible for Frasier syndrome. *Nat Genet* 17:467-70
- Baudry D, Faussillon M, Cabanis MO, Rigolet M, Zucker JM, Patte C, Sarnacki S, Boccon-Gibod L, Junien C, Jeanpierre C (2002) Changes in WT1 splicing are associated with a specific gene expression profile in Wilms' tumour. *Oncogene* 21:5566-73
- Bracken AP, Pasini D, Capra M, Prosperini E, Colli E, Helin K (2003) EZH2 is downstream of the pRB-E2F pathway, essential for proliferation and amplified in cancer. *Embo J* 22:5323-35
- Breslow N, Olshan A, Beckwith JB, Green DM (1993) Epidemiology of Wilms tumor. *Med Pediatr Oncol* 21:172-81
- Breslow NE, Olson J, Moksness J, Beckwith JB, Grundy P (1996) Familial Wilms' tumor: a descriptive study. *Med Pediatr Oncol* 27:398-403
- Burrow CR (2000) Regulatory molecules in kidney development. *Pediatr Nephrol* 14:240-53
- Call KM, Glaser T, Ito CY, Buckler AJ, Pelletier J, Haber DA, Rose EA, Kral A, Yeger H, Lewis WH, et al. (1990) Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus. *Cell* 60:509-20
- Callow MJ, Dudoit S, Gong EL, Speed TP, Rubin EM (2000) Microarray expression profiling identifies genes with altered expression in HDL-deficient mice. *Genome Res* 10:2022-9
- Casanova B, de la Fuente MT, Garcia-Gila M, Sanz L, Silva A, Garcia-Marco JA, Garcia-Pardo A (2001) The class II tumor-suppressor gene RARRES3 is expressed in B cell lymphocytic leukemias and down-regulated with disease progression. *Leukemia* 15:1521-6
- Cerignoli F, Guo X, Cardinali B, Rinaldi C, Casaleotto J, Frati L, Sclepanti I, Gudas LJ, Gulino A, Thiele CJ, Giannini G (2002) retSDR1, a short-chain retinol dehydrogenase/reductase, is retinoic acid-inducible and frequently deleted in human neuroblastoma cell lines. *Cancer Res* 62:1196-204

- Chen B, Athanasiou M, Gu Q, Blair DG (2002) Drm/Gremlin transcriptionally activates p21(Cip1) via a novel mechanism and inhibits neoplastic transformation. *Biochem Biophys Res Commun* 295:1135-41
- Cheung B, Hocker JE, Smith SA, Norris MD, Haber M, Marshall GM (1998) Favorable prognostic significance of high-level retinoic acid receptor beta expression in neuroblastoma mediated by effects on cell cycle regulation. *Oncogene* 17:751-9
- Clegg JB, Weatherall DJ, Milner PF (1971) Haemoglobin Constant Spring--a chain termination mutant? *Nature* 234:337-40
- Cohnheim J (1875) Congenitales, quergestreiftes Muskelsarcom der Niere. *Virchows Arch Pathol Anat Physiol* 65:64-69
- Coppes-Zantinga AR, Coppes MJ (1999) The eponym "Wilms": a reminder of a surgeon's lifelong contributions to medicine. *Med Pediatr Oncol* 32:438-9
- Dey BR, Sukhatme VP, Roberts AB, Sporn MB, Rauscher FJ, 3rd, Kim SJ (1994) Repression of the transforming growth factor-beta 1 gene by the Wilms' tumor suppressor WT1 gene product. *Mol Endocrinol* 8:595-602
- Dome JS, Chung S, Bergemann T, Umbricht CB, Saji M, Carey LA, Grundy PE, Perlman EJ, Breslow NE, Sukumar S (1999) High telomerase reverse transcriptase (hTERT) messenger RNA level correlates with tumor recurrence in patients with favorable histology Wilms' tumor. *Cancer Res* 59:4301-7
- Drummond IA, Madden SL, Rohwer-Nutter P, Bell GI, Sukhatme VP, Rauscher FJ, 3rd (1992) Repression of the insulin-like growth factor II gene by the Wilms tumor suppressor WT1. *Science* 257:674-8
- Eggert A, Grotzer MA, Ikegaki N, Zhao H, Cnaan A, Brodeur GM, Evans AE (2001) Expression of the neurotrophin receptor TrkB is associated with unfavorable outcome in Wilms' tumor. *J Clin Oncol* 19:689-96
- Farias EF, Arapshian A, Bleiweiss IJ, Waxman S, Zelent A, Mira YLR (2002) Retinoic acid receptor alpha2 is a growth suppressor epigenetically silenced in MCF-7 human breast cancer cells. *Cell Growth Differ* 13:335-41
- Freeman SJ, Kerley JS, Olsen SL, Gross RH, Spinella MJ (2002) Developmentally-related candidate retinoic acid target genes regulated early during neuronal differentiation of human embryonal carcinoma. *Oncogene* 21:2880-9
- Freeman SJ, Spinella MJ, Dmitrovsky E (2003) Retinoids in cancer therapy and chemoprevention: promise meets resistance. *Oncogene* 22:7305-15

- Gessler M, Konig A, Arden K, Grundy P, Orkin S, Sallan S, Peters C, Ruyle S, Mandell J, Li F, et al. (1994) Infrequent mutation of the WT1 gene in 77 Wilms' Tumors. *Hum Mutat* 3:212-22
- Gessler M, Poustka A, Cavenee W, Neve RL, Orkin SH, Bruns GA (1990) Homozygous deletion in Wilms tumours of a zinc-finger gene identified by chromosome jumping. *Nature* 343:774-8
- Ghanem MA, van Steenbrugge GJ, Sudaryo MK, Mathoera RB, Nijman JM, van der Kwast TH (2003) Expression and prognostic relevance of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor (FLT-1) in nephroblastoma. *J Clin Pathol* 56:107-13
- Graf N, Reinhard H (2003) [Wilms tumors. Diagnosis and therapy]. *Urologe A* 42:W391-407; quiz W408-9
- Greaves S (2003) Small changes in Wnt signalling. *Nat Cell Biol* 5:387
- Grundy P, Telzerow P, Moksness J, Breslow NE (1996) Clinicopathologic correlates of loss of heterozygosity in Wilm's tumor: a preliminary analysis. *Med Pediatr Oncol* 27:429-33
- Haber DA, Sohn RL, Buckler AJ, Pelletier J, Call KM, Housman DE (1991) Alternative splicing and genomic structure of the Wilms tumor gene WT1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:9618-22
- He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW (1998) Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* 281:1509-12
- Hosack DA, Dennis G, Jr., Sherman BT, Lane HC, Lempicki RA (2003) Identifying biological themes within lists of genes with EASE. *Genome Biol* 4:R70
- Huff V (1998) Wilms tumor genetics. *Am J Med Genet* 79:260-7
- Huff V, Amos CI, Douglass EC, Fisher R, Geiser CF, Krill CE, Li FP, Strong LC, McDonald JM (1997) Evidence for genetic heterogeneity in familial Wilms' tumor. *Cancer Res* 57:1859-62
- Kaatsch P, Kaletsch U, Krummenauer F, Meinert R, Miesner A, Haaf G, Michaelis J (1996) Case control study on childhood leukemia in Lower Saxony, Germany. Basic considerations, methodology, and summary of results. *Klin Padiatr* 208:179-85
- Kalapurakal JA, Dome JS, Perlman EJ, Malogolowkin M, Haase GM, Grundy P, Coppes MJ (2004) Management of Wilms' tumour: current practice and future goals. *Lancet Oncol* 5:37-46

- Kansra S, Ewton DZ, Wang J, Friedman E (2000) IGFBP-3 mediates TGF beta 1 proliferative response in colon cancer cells. *Int J Cancer* 87:373-8
- Kastner P, Mark M, Ghyselinck N, Krezel W, Dupe V, Grondona JM, Chambon P (1997) Genetic evidence that the retinoid signal is transduced by heterodimeric RXR/RAR functional units during mouse development. *Development* 124:313-26
- Kedishvili NY, Chumakova OV, Chetyrkin SV, Belyaeva OV, Lapshina EA, Lin DW, Matsumura M, Nelson PS (2002) Evidence that the human gene for prostate short-chain dehydrogenase/reductase (PSDR1) encodes a novel retinal reductase (RalR1). *J Biol Chem* 277:28909-15
- Kioussi C, Briata P, Baek SH, Rose DW, Hamblet NS, Herman T, Ohgi KA, Lin C, Gleiberman A, Wang J, Brault V, Ruiz-Lozano P, Nguyen HD, Kemler R, Glass CK, Wynshaw-Boris A, Rosenfeld MG (2002) Identification of a Wnt/Dvl/beta-Catenin --> Pitx2 pathway mediating cell-type-specific proliferation during development. *Cell* 111:673-85
- Klamt B, Koziell A, Poulat F, Wieacker P, Scambler P, Berta P, Gessler M (1998a) 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
- Klamt B, Schulze M, Thaté C, Mares J, Goetz P, Kodet R, Scheulen W, Weirich A, Graf N, Gessler M (1998b) Allele loss in Wilms tumors of chromosome arms 11q, 16q, and 22q correlate with clinicopathological parameters. *Genes Chromosomes Cancer* 22:287-94
- Knudson AG, Jr., Strong LC (1972) Mutation and cancer: a model for Wilms' tumor of the kidney. *J Natl Cancer Inst* 48:313-24
- Koesters R, Niggli F, von Knebel Doeberitz M, Stallmach T (2003) Nuclear accumulation of beta-catenin protein in Wilms' tumours. *J Pathol* 199:68-76
- Koesters R, Ridder R, Kopp-Schneider A, Betts D, Adams V, Niggli F, Briner J, von Knebel Doeberitz M (1999) Mutational activation of the beta-catenin proto-oncogene is a common event in the development of Wilms' tumors. *Cancer Res* 59:3880-2
- Koliopanos A, Friess H, di Mola FF, Tang WH, Kubulus D, Brigstock D, Zimmermann A, Buchler MW (2002) Connective tissue growth factor gene expression alters tumor progression in esophageal cancer. *World J Surg* 26:420-7
- Kreidberg JA, Sariola H, Loring JM, Maeda M, Pelletier J, Housman D, Jaenisch R (1993) WT-1 is required for early kidney development. *Cell* 74:679-91

- Kusafuka T, Miao J, Kuroda S, Udatsu Y, Yoneda A (2002) Codon 45 of the beta-catenin gene, a specific mutational target site of Wilms' tumor. *Int J Mol Med* 10:395-9
- Li CM, Guo M, Borczuk A, Powell CA, Wei M, Thaker HM, Friedman R, Klein U, Tycko B (2002) Gene expression in Wilms' tumor mimics the earliest committed stage in the metanephric mesenchymal-epithelial transition. *Am J Pathol* 160:2181-90
- Li W, Kessler P, Williams BR (2005) Transcript profiling of Wilms tumors reveals connections to kidney morphogenesis and expression patterns associated with anaplasia. *Oncogene* 24:457-68
- Li CM, Kim CE, Margolin AA, Guo M, Zhu J, Mason JM, Hensle TW, Murty VV, Grundy PE, Fearon ER, D'Agati V, Licht JD, Tycko B (2004) CTNNB1 mutations and overexpression of Wnt/beta-catenin target genes in WT1-mutant Wilms' tumors. *Am J Pathol* 165:1943-53
- Lin CR, Kioussi C, O'Connell S, Briata P, Szeto D, Liu F, Izpisua-Belmonte JC, Rosenfeld MG (1999) Pitx2 regulates lung asymmetry, cardiac positioning and pituitary and tooth morphogenesis. *Nature* 401:279-82
- Lobbert RW, Klemm G, Gruttner HP, Harms D, Winterpacht A, Zabel BU (1998) Novel WT1 mutation, 11p LOH, and t(7;12) (p22;q22) chromosomal translocation identified in a Wilms' tumor case. *Genes Chromosomes Cancer* 21:347-50
- Maes P, Delemarre J, de Kraker J, Ninane J (1999) Fetal rhabdomyomatous nephroblastoma: a tumour of good prognosis but resistant to chemotherapy. *Eur J Cancer* 35:1356-60
- Maiti S, Alam R, Amos CI, Huff V (2000) Frequent association of beta-catenin and WT1 mutations in Wilms tumors. *Cancer Res* 60:6288-92
- Matsunaga E (1981) Genetics of Wilms' tumor. *Hum Genet* 57:231-46
- Maw MA, Grundy PE, Millow LJ, Eccles MR, Dunn RS, Smith PJ, Feinberg AP, Law DJ, Paterson MC, Telzerow PE, et al. (1992) A third Wilms' tumor locus on chromosome 16q. *Cancer Res* 52:3094-8
- Muller H, Bracken AP, Vernell R, Moroni MC, Christians F, Grassilli E, Prosperini E, Vigo E, Oliner JD, Helin K (2001) E2Fs regulate the expression of genes involved in differentiation, development, proliferation, and apoptosis. *Genes Dev* 15:267-85
- Niles RM (2004) Signaling pathways in retinoid chemoprevention and treatment of cancer. *Mutat Res* 555:81-96
- Pelletier J, Bruening W, Li FP, Haber DA, Glaser T, Housman DE (1991) WT1 mutations contribute to abnormal genital system development and hereditary Wilms' tumour. *Nature* 353:431-4

- Pendaries V, Verrecchia F, Michel S, Mauviel A (2003) Retinoic acid receptors interfere with the TGF-beta/Smad signaling pathway in a ligand-specific manner. *Oncogene* 22:8212-20
- Polakis P (2000) Wnt signaling and cancer. *Genes Dev* 14:1837-51
- Rance TM (1814) Case of fungus haematodes of the kidneys. *Med Phys J* 32:312-315
- Reynolds CP, Kane DJ, Einhorn PA, Matthay KK, Crouse VL, Wilbur JR, Shurin SB, Seeger RC (1991) Response of neuroblastoma to retinoic acid in vitro and in vivo. *Prog Clin Biol Res* 366:203-11
- Reynolds CP, Matthay KK, Villablanca JG, Maurer BJ (2003) Retinoid therapy of high-risk neuroblastoma. *Cancer Lett* 197:185-92
- Rigolet M, Faussillon M, Baudry D, Junien C, Jeanpierre C (2001) Profiling of differential gene expression in Wilms tumor by cDNA expression array. *Pediatr Nephrol* 16:1113-21
- Ross SA, McCaffery PJ, Drager UC, De Luca LM (2000) Retinoids in embryonal development. *Physiol Rev* 80:1021-54
- Royer-Pokora B, Beier M, Henzler M, Alam R, Schumacher V, Weirich A, Huff V (2004) 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
- Rubinfeld B, Robbins P, El-Gamil M, Albert I, Porfiri E, Polakis P (1997) Stabilization of beta-catenin by genetic defects in melanoma cell lines. *Science* 275:1790-2
- Russo G, Zegar C, Giordano A (2003) Advantages and limitations of microarray technology in human cancer. *Oncogene* 22:6497-507
- Ryan G, Steele-Perkins V, Morris JF, Rauscher FJ, 3rd, Dressler GR (1995) Repression of Pax-2 by WT1 during normal kidney development. *Development* 121:867-75
- Shyu RY, Jiang SY, Chou JM, Shih YL, Lee MS, Yu JC, Chao PC, Hsu YJ, Jao SW (2003) RARRES3 expression positively correlated to tumour differentiation in tissues of colorectal adenocarcinoma. *Br J Cancer* 89:146-51
- Sriuranpong V, Mutirangura A, Gillespie JW, Patel V, Amornphimoltham P, Molinolo AA, Kerekhanjanarong V, Supanakorn S, Supiyaphun P, Rangdaeng S, Voravud N, Gutkind JS (2004) Global gene expression profile of nasopharyngeal carcinoma by laser capture microdissection and complementary DNA microarrays. *Clin Cancer Res* 10:4944-58

- Sturn A, Quackenbush J, Trajanoski Z (2002) Genesis: cluster analysis of microarray data. *Bioinformatics* 18:207-8
- Sudo S, Avsian-Kretchmer O, Wang LS, Hsueh AJ (2004) Protein related to DAN and cerberus is a bone morphogenetic protein antagonist that participates in ovarian paracrine regulation. *J Biol Chem* 279:23134-41
- Takahashi M, Yang XJ, Lavery TT, Furge KA, Williams BO, Tretiakova M, Montag A, Vogelzang NJ, Re GG, Garvin AJ, Soderhall S, Kagawa S, Hazel-Martin D, Nordenskjold A, Teh BT (2002) Gene expression profiling of favorable histology Wilms tumors and its correlation with clinical features. *Cancer Res* 62:6598-605
- Takahashi M, Yang XJ, Sugimura J, Backdahl J, Tretiakova M, Qian CN, Gray SG, Knapp R, Anema J, Kahnoski R, Nicol D, Vogelzang NJ, Furge KA, Kanayama H, Kagawa S, Teh BT (2003) Molecular subclassification of kidney tumors and the discovery of new diagnostic markers. *Oncogene* 22:6810-8
- Takemaru K, Yamaguchi S, Lee YS, Zhang Y, Carthew RW, Moon RT (2003) Chibby, a nuclear beta-catenin-associated antagonist of the Wnt/Wingless pathway. *Nature* 422:905-9
- Tetsu O, McCormick F (1999) Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* 398:422-6
- Udtha M, Lee SJ, Alam R, Coombes K, Huff V (2003) Upregulation of c-MYC in WT1-mutant tumors: assessment of WT1 putative transcriptional targets using cDNA microarray expression profiling of genetically defined Wilms' tumors. *Oncogene* 22:3821-6
- van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M, Peterse HL, van der Kooy K, Marton MJ, Witteveen AT, Schreiber GJ, Kerkhoven RM, Roberts C, Linsley PS, Bernards R, Friend SH (2002) Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 415:530-6
- Vujanic GM, Sandstedt B, Harms D, Kelsey A, Leuschner I, de Kraker J (2002) Revised International Society of Paediatric Oncology (SIOP) working classification of renal tumors of childhood. *Med Pediatr Oncol* 38:79-82
- Weirich A, Ludwig R, Graf N, Abel U, Leuschner I, Vujanic GM, Mehls O, Boos J, Beck J, Royer-Pokora B, Voute PA (2004) Survival in nephroblastoma treated according to the trial and study SIOP-9/GPOH with respect to relapse and morbidity. *Ann Oncol* 15:808-20

- Williams RD, Hing SN, Greer BT, Whiteford CC, Wei JS, Natrajan R, et al. (2004) Prognostic classification of relapsing favorable histology Wilms tumor using cDNA microarray expression profiling and support vector machines. *Genes Chromosomes Cancer* 41:65-79
- Wilms M (1897) Diagnostischer und therapeutischer Werth der Lumbalpunktion. Druckbestimmung mit Quecksilbermanometer. *Münchener Medizinische Wochenschrift* 3:53-57
- Wilms M (1899) Die Mischgeschwülste der Niere. Verlag von Arthur Georgi, Leipzig
- Wissmann C, Wild PJ, Kaiser S, Roepcke S, Stoehr R, Woenckhaus M, Kristiansen G, Hsieh JC, Hofstaedter F, Hartmann A, Knuechel R, Rosenthal A, Pilarsky C (2003) WIF1, a component of the Wnt pathway, is down-regulated in prostate, breast, lung, and bladder cancer. *J Pathol* 201:204-12
- Wullstein W, Wilms M (1918) Lehrbuch der Chirurgie. Verlag von Gustav Fischer, Jena
- Xie W, Mertens JC, Reiss DJ, Rimm DL, Camp RL, Haffty BG, Reiss M (2002) Alterations of Smad signaling in human breast carcinoma are associated with poor outcome: a tissue microarray study. *Cancer Res* 62:497-505
- Xie W, Rimm DL, Lin Y, Shih WJ, Reiss M (2003) Loss of Smad signaling in human colorectal cancer is associated with advanced disease and poor prognosis. *Cancer J* 9:302-12
- Yang YH, Dudoit S, Luu P, Lin DM, Peng V, Ngai J, Speed TP (2002) Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation. *Nucleic Acids Res* 30:e15

Danksagung

Mein Dank gilt in erster Linie dem Betreuer meines MD-PhD Projektes, Herrn Prof. Dr. Manfred Gessler. Seine geduldige und immer hilfsbereite Art sowie die vielen wissenschaftlichen Diskussionen trugen entscheidend zur Entstehung der vorliegenden Arbeit bei. Herr Prof. Gessler versteht es, nicht nur wissenschaftliches Denken, Experimentieren und Publizieren zu vermitteln, sondern auch eine generelle Begeisterung für wissenschaftliches Arbeiten.

Herrn Prof. Dr. Manfred Schartl danke ich für die Möglichkeit, meine Arbeit am Lehrstuhl für Physiologische Chemie I durchführen zu können. Allen Mitarbeitern der Physiologischen Chemie I, insbesondere natürlich den „Gesslers“, möchte ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die Hilfsbereitschaft bei experimentellen und organisatorischen Problemen danken. Über das Postdoktoranden-Stipendium des Graduiertenkollegs 639 „Tumorinstabilität“ wurden mir zudem der Austausch mit Stipendiaten aus anderen Abteilungen sowie die Teilnahme an verschiedenen Kongressen und Kursen ermöglicht.

Einen Teil der Experimente habe ich am Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung der Universität Marburg durchgeführt. Dort möchte ich mich für die hilfreiche Betreuung durch Herrn Prof. Dr. Martin Eilers, Herrn Dr. Michael Krause und Frau Angelika Filmer bedanken. Birgit Samans und Oliver Hartmann gilt mein besonderer Dank für die statistische Auswertung der Microarray-Daten.

Bei Herrn Prof. Dr. N. Graf der Universitäts-Kinderklinik des Saarlandes möchte ich mich für die Beratung bei vielen klinisch-onkologischen Fragestellungen bedanken. Ohne die Bereitstellung der klinischen Datensammlung zu allen in diese Arbeit einbezogenen Wilms Tumoren der GPOH-Studie wäre eine detaillierte Auswertung der Expressionsdaten nach klinischen Kriterien nicht möglich gewesen.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. U. Walter und Herrn Prof. Dr. H.K. Müller-Hermelink für die Aufnahme und Betreuung im MD-PhD Programm. Insbesondere Herr Prof. Walter hat durch fortwährende persönliche Beratung und die Organisation des „MD-PhD-Stammtischs“ zum wissenschaftlichen Austausch zwischen den Stipendiaten und den verschiedenen Instituten beigetragen. Bei den „inoffiziellen MD-PhD-Treffen“ verbrachten wir (insbesondere Robert, Christian, Karin, Steffi und Peter) auch viele nette Stunden, in denen es nicht ausschließlich um Wissenschaft ging.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Dr. Birgit Zirn, geb. Maurer
Geburtsdatum: 18.03.1975
Geburtsort: Köln
Familienstand: verheiratet, ein Sohn

Private Anschrift: Weinküppel 4, 35041 Marburg
Berufl. Anschrift: Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums Giessen und Marburg, Schlangenzahl 14, 35392 Giessen
e-mail: Birgit.Zirn@humangenetik.med.uni-giessen.de

Schulausbildung:

1981-1985: Mariengrundschule Münster-Roxel
1985-1994: Annette-von-Droste-Hülshoff Gymnasium in Münster
1994: Abitur

Medizinstudium und Approbation:

1994 - 1998: Medizinstudium an der Universität Münster
1998 - 1999: Medizinstudium an der Universität Nantes, Frankreich
2000 - 2001: Praktisches Jahr:
Universitätsklinik Oxford, England
Universitätsklinik Padua, Italien
Institut für Humangenetik, Universität Würzburg
Mai 2001: Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
März 2003: Approbation als Ärztin

Medizinische Promotion:

„Prävalenz und Bedeutung von Mikrodeletionen des Y-Chromosoms bei männlicher Infertilität“, Institut für Reproduktionsmedizin der Universität Münster (Prof. Dr. E. Nieschlag, Prof. Dr. M. Simoni)
Abschluß der Promotion: 04.02.2002

Biologiestudium:

2001- 2002: Im Rahmen des MD/PhD-Programms der Universität Würzburg
Juli 2002: Zulassungsprüfung zur Promotion

Biologisches Promotionsprojekt:

“Expressions- und Mutationsanalysen in kindlichen Wilms Tumoren“
im Rahmen des MD/PhD-Programms der Universität Würzburg am Lehrstuhl
für Physiologische Chemie I, Prof. Dr. M. Gessler

Berufliche Tätigkeit:

Juli 01- Dez. 02: ÄiP in der Universitäts-Kinderklinik Würzburg und in der
Neurologischen Universitätsklinik Würzburg
Jan. 03 – Dez. 04: Lehrstuhl für Physiologische Chemie I, Universität Würzburg,
Postdoktoranden-Stipendium im Graduiertenkolleg 639
„Tumorinstabilität“ mit Koordinationsfunktion
Seit Jan. 2005: Assistenzärztin (wiss. Mitarbeiterin) am Institut für
Humangenetik des Universitätsklinikums Giessen und Marburg

Auszeichnungen:

Juni 2004: Nachwuchspreis der Europäischen Gesellschaft für Humangenetik
(„ESHG Young Scientist Award 2004“)

Sprachen:

Englisch
Französisch
Italienisch

Marburg, Juni 2006

Publikationen:

Maurer B, Simoni M. Y chromosome microdeletion screening in infertile men. *Journal of Endocrinological Investigation* 23:664-670 (2000).

Maurer B, Gromoll J, Simoni M, Nieschlag E. Prevalence of Y chromosome microdeletions in infertile men who consulted a tertiary care medical centre: the Münster experience. *Andrologia* 33:27-33 (2001).

Maurer B, Haaf T, Stout K, Reissmann N, Steinlein C, Schmid M. Two supernumerary marker chromosomes, derived from chromosomes 6 and 11, in a girl with craniofacial dysmorphism and developmental delay. *Cytogenetics and Cell Genetics* 93:182-187 (2001).

Maurer B, Guttenbach M, Schmid M. Chromosomal instability and normative aging. In: Hishama FM, Weissman SM and Martin G (eds.) *Chromosomal Instability and Aging: Basic Science and Clinical Implications*. Marcel Dekker Inc., New York, pp. 125-147 (2003).

Zirn B, Samans B, Spangenberg C, Graf N, Eilers M, Gessler M. All-trans retinoic acid treatment of Wilms tumor cells reverses expression of genes associated with high risk and relapse *in vivo*. *Oncogene*, 24(33):5246-51 (2005).

Zirn B, Wittmann S, Graf N, and Gessler M. Chibby, a novel antagonist of the Wnt pathway, is not involved in Wilms tumor development. *Cancer Lett*, 220(1):115-20 (2005).

Zirn B, Wittmann S, Gessler M. Novel familial WT1 read-through mutation associated with Wilms tumor and slow progressive nephropathy. *Am J Kidney Dis*, 45(6):1100-4 (2005).

Zirn B, Hartmann O, Samans B, Krause M, Wittmann S, Graf N, Eilers M, and Gessler M. Expression profiling in Wilms tumors reveals novel prognostic markers. *Int J Cancer*, 118(8):1954-62 (2006).

Zirn B, Samans B, Wittmann S, Pietsch T, Leuschner I, Eilers M, Gessler M. Putative target genes of the *Wnt/β-catenin* pathway in Wilms tumors. *Genes Chromosomes Cancer*, 45(6):565-74 (2006).

Poster (im Rahmen der PhD-Arbeit):

Maurer B, Niederführ A, Jochem T, Leuschner I, Graf N, Gessler M. The German Wilms' Tumor Bank: Sample Collection and Evaluation of Molecular Markers. UKCCSG Biology of Childhood Cancer Meeting. London, Dezember 2002.

Maurer B, Jochem T, Klamt B, Meusert A, Leuschner I, Graf N, Gessler M. Genetic profiling of Wilms' tumors (nephroblastoma). AEK Cancer Congress, Würzburg, März 2003.

Maurer B, Wittmann S, Jochem T, Klamt B, Meusert A, Leuschner I, Graf N, Gessler M. Genetic characterization of Wilms' tumors (nephroblastoma). Kongreß der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik, Marburg, Oktober 2003.

Zirn B, Samans B, Graf N, Eilers M, Gessler M. All-trans retinoic acid treatment of Wilms tumor cells reverses expression of genes associated with high risk and relapse *in vivo*. AEK Cancer Congress, Würzburg, März 2005.

Vorträge (im Rahmen der PhD-Arbeit):

Maurer B, Wittmann S, Hartmann O, Samans B, Krause M, Eilers M, Graf N, Gessler M. Wilms' tumor: expression profiling reveals new candidate genes and novel prognostic markers. Deutscher Krebskongreß, Berlin, März 2004.

Zirn B, Hartmann O, Samans B, Krause M, Wittmann S, Eilers M, Gessler M. Expression profiling of Wilms tumors reveals novel prognostic markers. Conference of the European Society of Human Genetics, München, Juni 2004.

Zirn B. Expression profiling in Wilms tumors. International Graduate Day, Würzburg, Juli 2004.

Zirn B, Samans B, Spangenberg C, Graf N, Eilers M, Gessler M. All-trans retinoic acid treatment of Wilms tumor cells reverses expression of genes associated with high risk and relapse *in vivo*. Conference of the European Society of Human Genetics, Prag, Mai 2005.

Anhang mit Publikationen 1 bis 5

Publikation 1

Expression profiling of Wilms tumors reveals new candidate genes for different clinical parameters

Zirn B¹, Hartmann O², Samans B², Krause M³, Wittmann S¹, Mertens F⁴, Graf N⁵, Eilers M³, Gessler M¹.

¹ Physiological Chemistry I, Biozentrum, University of Wuerzburg, Germany

² Institute of Medical Biometry and Epidemiology, University of Marburg, Germany

³ Institute of Molecular Biology and Tumor Research (IMT), University of Marburg, Germany

⁴ Department of Clinical Genetics, Lund University Hospital, Lund, Sweden

⁵ Children's Hospital, Department of Paediatric Oncology and Haematology, University of the Saarland, Germany

Int J Cancer, 118(8):1954-62 (2006).

Expression profiling of Wilms tumors reveals new candidate genes for different clinical parameters

B. Zirn¹, O. Hartmann², B. Samans², M. Krause³, S. Wittmann¹, F. Mertens⁴, N. Graf⁵, M. Eilers³ and M. Gessler^{1*}

¹Physiological Chemistry I, Biozentrum, University of Wuerzburg, Germany

²Institute of Medical Biometry and Epidemiology, University of Marburg, Germany

³Institute of Molecular Biology and Tumor Research (IMT), University of Marburg, Germany

⁴Department of Clinical Genetics, Lund University Hospital, Lund, Sweden

⁵Children's Hospital, Department of Paediatric Oncology and Haematology, University of the Saarland, Germany

Wilms tumor is the most frequent renal neoplasm in children, but our understanding of its genetic basis is still limited. We performed cDNA microarray experiments using 63 primary Wilms tumors with the aim of detecting new candidate genes associated with malignancy grade and tumor progression. All tumors had received preoperative chemotherapy as mandated by the SIOP protocol, which sets this study apart from related approaches in the United States that are based on untreated samples. The stratification of expression data according to clinical criteria allowed a rather clear distinction between different subsets of Wilms tumors. Clear-cut differences in expression patterns were discovered between relapse-free as opposed to relapsed tumors and tumors with intermediate risk as opposed to high risk histology. Several differentially expressed genes, e.g. *TRIM22*, *CENPF*, *MYCN*, *CTGF*, *RARRES3* and *EZH2*, were associated with Wilms tumor progression. For a subset of differentially expressed genes, microarray data were confirmed by real-time RT-PCR on the original set of tumors. Interestingly, we found the retinoic acid pathway to be deregulated at different levels in advanced tumors suggesting that treatment of these tumors with retinoic acid may represent a promising novel therapeutic approach.

© 2005 Wiley-Liss, Inc.

Key words: Wilms tumor; nephroblastoma; retinoic acid; microarray; E2F

Wilms tumor or nephroblastoma is one of the most common solid tumors in childhood, with an incidence of 1:10,000 live births. It arises from embryonic kidney cells and most frequently presents as a unilateral (95%) and sporadic (98%) tumor. According to the SIOP (International Society of Pediatric Oncology) protocol, the treatment of children over the age of 6 months is initiated with preoperative chemotherapy comprising actinomycin-D and vincristine for 4 weeks. Postoperative treatment after tumor nephrectomy depends on tumor histology, detection of metastases and local tumor stage. The overall 5-year-survival rate is approximately 90%.¹

For most Wilms tumors, the molecular pathogenesis is still unclear. Mutations in *WT1*, a tumor suppressor gene at 11p13² and in β-catenin (*CTNNB1*)³, a component of the Wnt signaling pathway, are known to be involved in Wilms tumorigenesis. Both mutations are frequently associated with each other,⁴ but account for only 10–15% of Wilms tumors.⁵ However, they do not have a predictive value. Furthermore, p53 mutations frequently occur in anaplastic Wilms tumors, which belong to the group of tumors with high-risk histology.⁶

Allele loss studies and comparative genomic hybridization have identified several chromosomal regions that are frequently deleted. Alterations in some of these chromosomal regions are associated with poor outcome, e.g. chromosomes 1 and 16q.⁷ Nevertheless, it has not been possible up to now to delineate individual genes within these regions that initiate or promote Wilms tumor growth.

With the aim of detecting novel candidate genes important for malignancy grade and tumor progression, we performed cDNA microarray experiments based on 11,500 clones, using 63 primary

Wilms tumors treated with preoperative chemotherapy, the largest cohort analyzed to date.

Materials and methods

Wilms tumors

Primary tumor tissue was initially obtained from 77 Wilms tumors from the German SIOP/GPOH 93-01 Wilms tumor study. Detailed clinical data were collected for all samples. Sixty-seven of 77 tumors received preoperative chemotherapy as mandated by the SIOP protocol. To exclude expression differences due to the therapeutic approach (preoperative chemotherapy vs. primary operation), we included only those 67 tumors that were preoperatively treated in our final analysis. In most cases, histological diagnosis was available from both local and reference pathologists. Informed consent for biological studies had been obtained before surgery.

Isolation and amplification of RNA

Total RNA was isolated from frozen tumor tissue, using the RNA/DNA Midi Kit (Qiagen, Germany) or Trizol reagent (Life Technologies). RNA was treated with 30 U DNase, again purified (RNeasy Kit, Qiagen) and stored in water at –80°C. The reference sample for array hybridizations consists of an RNA pool from 14 Wilms tumors with different clinical data.

Since the amount of extracted RNA was not sufficient for array hybridization in most cases, we amplified mRNA from all total RNA samples using the MessageAmp aRNA Kit (Ambion, Huntingdon, UK). Briefly, the procedure consists of reverse transcription with an oligo(dT) primer bearing a T7 promoter and *in vitro* transcription of the resulting cDNA with T7 RNA polymerase to generate multiple copies of each mRNA. After one round of *in vitro* transcription starting with 1 µg of total RNA, the yield of amplified mRNA ranged between 10 and 50 µg.

cDNA labeling

Hybridization probes were generated by indirect labeling with Cy3 and Cy5 dyes, using the CyScribe cDNA Post Labeling Kit (Amersham Biosciences Europe, Freiburg, Germany). Three micrograms of amplified tumor and reference RNA, respectively, were reverse transcribed with nonamer primers, incorporating modified amino-allyl-dUTP. The RNA template was then degraded with 2 µl NaOH (2.5 N) at 37°C for 15 min, followed by neutralization with 10 µl HEPES (2 M). The cDNA was purified

This article contains supplementary material available via the Internet at <http://www.interscience.wiley.com/jpages/0020-7136/suppmat>.

*Correspondence to: Physiological Chemistry I, Theodor-Boveri-Institute, Biocenter of the University of Wuerzburg, 97074 Wuerzburg, Germany. E-mail: gessler@biozentrum.uni-wuerzburg.de

Received 25 March 2005; Accepted after revision 19 August 2005

DOI 10.1002/ijc.21564

Published online 14 November 2005 in Wiley InterScience ([www.interscience.wiley.com](http://interscience.wiley.com)).

(PCR Purification Kit, Qiagen, Hilden, Germany) and labeled with Cy5 (tumor samples) and Cy3 (reference samples). Labeled tumor and reference samples were then combined and again purified to remove unbound Cy dyes.

Microarray experiments

Microarrays were generated as previously described⁸ using a GMS 417 arrayer (MWG Biotech, Ebersberg, Germany). The chips contained 11,500 clones from the human sequence-verified UniGene cDNA sets gf200, gf201 and gf202 (<http://www.resgen.com>). Each experiment was performed as sandwich hybridization, *i.e.* instead of a cover slip, a second microarray slide was used. This provides a replicated measurement for each hybridization, which can be used for quality control and for reduction of technical variability.

Arrays were prehybridized for 30 min at 55°C with a blocking solution containing 1% bovine serum albumin, 3× SSC and 0.1% SDS. After washing with water, arrays were dried by brief centrifugation. To reduce unspecific background signals, Cot1 DNA and polyA were added to the labeled cDNAs. The addition of 10 µl SSC (20×) and 4 µl SDS (2%) resulted in a final volume of 100 µl. Hybridization samples were boiled for 2 min immediately before sandwich hybridization. After incubation in a humid chamber at 55°C for 16 hr, arrays were separated again and 4 washing steps were carried out, twice with 0.1× SSC/0.1% SDS and twice with 0.1× SSC. Finally, the arrays were washed in water and dried by centrifugation.

Standardization and quality control

Arrays were scanned separately for both Cy dyes, using a GMS 418 microarray scanner (MWG Biotech, Ebersberg, Germany). Spot intensities were extracted from a scanned image with ImaGene 3.0 software (BioDiscovery Inc., Marina Del Rey, USA). Software parameters such as “signal range” or “spot detection threshold” were optimized for maximum reproducibility prior to image analysis (not shown). For each spot, median signal and background intensities were obtained for both channels. To account for spot differences, the background was corrected and the ratio of the two channels was calculated and log₂-transformed.

In order to balance fluorescence intensities for the two dyes and to allow for comparison of expression levels across experiments, the raw data were standardized. The first step consisted of a spatial-and intensity-dependent standardization similar to that in Ref. 9 to correct for inherent bias on each chip. As each gene was measured twice in the sandwich hybridization, mean log-ratios M were calculated from replicates. When gene replicates differed more than the maximum of 3-fold and 75% of the calculated average log-ratio or when background intensity was higher than signal intensity, the spot was excluded from that array. In total, 1.3% (~150 spots per chip) of all spots had to be flagged and filtered out.

Sandwich hybridizations were highly reproducible. Only 4 hybridizations (5%) were excluded because of inconsistencies between replicated measurements. In 1 tumor sample, one of the sandwich slides showed strong spatial effects; therefore only 1 measurement from this tumor was used in the final data analysis. Ten tumors were excluded from further analysis because they were primarily operated and did not receive preoperative chemotherapy as the majority of tumors did. The final data matrix consisted of 11,552 standardized gene expression measurements (log₂-ratios) from 63 individual tumors.

Statistical methods

To compare expression profiles between two independent groups, the 2-sample Welch t -statistic was used for ranking the genes. To account for multiple testing, we estimated the false discovery rate (FDR), a procedure introduced by Benjamini and Hochberg.¹⁰ The FDR is based on permutation p -values and it estimates the proportion of false discoveries within a given set of genes. As a second method, to correct for multiple testing, we cal-

culated the familywise error rate (FWER). This method has already been applied to microarrays by Callow *et al.*¹¹ It represents a step-down permutation algorithm¹² that takes the correlation of the variables into account. The procedure does not rely upon a normality assumption. For example, evaluating all genes with an adjusted p -value of less than 5% means that the probability of having one or more false positive genes within the whole list is less than 5%. Because of the small sample size for most groups, in combination with the pronounced heterogeneity typically seen in Wilms tumors, the usual selection criteria (FWER or FDR < 0.05) were inappropriate to show differences in marker list quality between the different clinical questions. Therefore, higher adjusted p -values were used as cut-off criteria to generate lists of potentially interesting genes and the quality of the resulting lists was then further evaluated using FDR.

Both methods are implemented in the multtest package of the Bioconductor project (<http://www.bioconductor.org>).¹³ The open source project Bioconductor provides a collection of statistical tools developed for the analysis of microarray data.

To avoid losing interesting candidate genes with large fold change differences, we generated additional lists with candidate genes in an exploratory manner by selecting only genes with a fold change difference of at least 2 and an absolute value of the t -statistic of more than 1.96. Because of the *ad hoc* selection procedure, p -values or FDRs were not calculated for these lists.

Note that the primary goal of this study was to screen for differentially expressed genes for further analysis. FDRs and adjusted p -values were therefore only composed for descriptive purposes, not to prove statistical significance. The cut off used for comparison of the different clinical criteria was derived from estimated adjusted p -values (FWER).

Cluster analysis

Prior to cluster analysis, the expression profile of each gene was centered by subtracting the mean observed value. Average linkage hierarchical clustering was then performed for genes as well as for chips, using the Euclidean distance metric as implemented in the program Genesis.¹⁴

Analysis of over-represented genes and themes within gene lists by EASE

EASE (Expression Analysis Systematic Explorer) is a software application that automates the process of biological theme determination. EASE calculates over-representation of certain genes in a given list of deregulated genes with respect to the total number of genes assayed. Statistical measure of over-representation is the “EASE score,” which was shown to reliably identify most robust categories of differentially regulated groups of genes (EASE score < 0.05).¹⁵

Real time RT-PCR

Real-time PCR reactions were performed on all original Wilms tumor samples. About 0.5 µg of the amplified RNA was used for cDNA synthesis with the RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit, respectively (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Germany). For RNA degradation, each reaction mix was then incubated with 1.25 U of RNaseH at 37°C for 30 min. Finally, water was added to a final volume of 200 µl.

Real-time PCR was conducted in the iCycler (Bio-Rad, Munich, Germany). The standard PCR reactions (22 µl) contained 2 µl cDNA, 0.13 pmol FITC (Bio-Rad, Munich, Germany) and 0.75 µl SybrGreen (1:20,000 diluted, Eurogentec, Seraing, Belgium) for detection. PCR conditions were 40 cycles of denaturation at 95°C for 15 sec, followed by annealing and elongation at 60°C for 1 min. Finally, melt curves were established (50–93°C) in order to check the accuracy of the amplification. Real-time PCR reactions with the housekeeping gene HPRT were performed with the aim of equalizing concentration differences between the tumor sam-

TABLE I – STRATIFICATION OF WILMS TUMORS AND NUMBER OF DIFFERENTIALLY EXPRESSED GENES SELECTED BASED ON *t*-STATISTIC RANKING AND FALSE DISCOVERY ESTIMATES

Clinical criteria	No. of Wilms tumors		No. of differentially expressed genes with adjusted <i>p</i> -value <0.9 (FWER)	False discovery rate (%)
	Group 1	Group 2		
Histological risk grade (1 = intermediate, 2 = high)	52	8	20	27.5
Relapse ¹ (1 = no (>3 yr), 2 = yes)	27	10	22	25.6
Survival ² (1 = relapse-free (>3 yr), 2 = death)	27	5	12	31.5
Metastasis (1 = no, 2 = yes)	54	12	7	50.5
Response to chemotherapy ³ (1 = good, 2 = poor)	38	19	6	67.5

¹As nearly all relapses occur within three years after therapy, this timeframe was used for definition of relapse-free tumors.²The same group of relapse-free tumors was used as for comparison of relapsed tumors.³Tumor reduction of more than 50% after chemotherapy was defined as good response, tumor reduction of less than 50% or increase of tumor volume was defined as poor response.

plexes. All primer sequences are available in the online supplementary Table 1.

Results

Evaluation of expression data according to clinical criteria

A collection of Wilms tumors from the SIOP/GPOH 93-01 Wilms tumor study was used to isolate RNA and to hybridize cDNA microarrays with 2-color labeling as described. Microarray hybridizations of primarily operated tumors were excluded from further analysis. Expression data of 63 Wilms tumors that had received preoperative chemotherapy were finally evaluated for the following clinical criteria: metastasis, response to chemotherapy, histological risk grade (malignancy), relapse and survival. All these clinical criteria allowed stratification into two separate groups. The respective criteria, the number of tumors categorized in those groups and the number of genes selected as differentially expressed by FWER for every clinical criterion are summarized in Table I. Complete raw data are available as MIAMExpress submission A-MEXP-221 (<http://www.ebi.ac.uk/miamexpress>). As expected, the resulting differences in expression were not statistically significant for several of the clinical criteria tested, which may be due to heterogeneity within tumor subpopulations, small sample sizes for individual groups or the fact that some of the clinically observed differences just have no genetic basis. Strongest differences in expression were detected for different histological risk groups and for relapse. However, the gene lists generated contain a number of potentially interesting genes that can now be used for further analysis.

Cluster analysis

On the basis of genes selected by lowest adjusted *p*-values for histological risk grade (intermediate/high risk) and for relapse (yes/no), we performed hierarchical clustering to visualize the discriminative potential of these genes. The Euclidean distance metric was used after centering the expression profile of each gene by subtracting the mean value.

In Figure 1a, intermediate risk histology is compared with high risk histology, using 74 differentially expressed genes with lowest adjusted *p*-values. There is a rather good separation between these two groups. Even within the intermediate risk group tumors with predominantly regressive changes are well separated. On the other hand, additional subclusters that are visually apparent do not correlate with either the indicated histological subtypes or with other clinical variables. Figure 1b shows the cluster analysis of relapsed tumors in comparison to all tumors with a relapse-free follow-up of at least 3 years (thus reducing the number of included tumors). In order to evaluate the potential predictive power of microarray analysis, we analyzed which tumors with high risk histology had relapsed later. High risk histology, i.e. blastemal predominant or

anaplastic subtype, is the currently best criterion to predict outcome in affected children. Only 4 of the 10 relapsed Wilms tumors had been diagnosed with a high risk histotype. In contrast, the other 6 Wilms tumors that actually relapsed belong to the intermediate risk group, but they are recognizable by similar differential gene expression.

“Top candidate” genes

With the intention of finding additional candidate genes with large fold change differences that may be more readily scorable in a diagnostic setting, we established further gene lists on the basis of combined selection criteria considering *t*-statistics and fold change differences. In this exploratory approach, genes with expression differences of at least 2-fold and an absolute *t*-statistics value of more than 1.96 were selected. Because of the *ad hoc* selection procedure, *p*-values and FDRs were not calculated for these lists. Since the comparison of relapsed and relapse-free tumors is of particular interest, the first 40 genes with highest *t*-statistic value are summarized in Table II. This table also contains the 10 “top candidates” of further lists for the histological risk, metastasis and survival. Complete lists are available as online supplementary Table 2.

Analysis of over-represented genes in relapsed and high risk tumors

EASE was applied to calculate over-representation of certain genes in our two lists of deregulated genes in relapsed and high risk tumors with respect to the total number of genes assayed. Genes involved in cell cycle progression and mitosis are significantly over-represented in relapsed tumors. In contrast, we found a significant over-representation of defense and immune response genes in high risk tumors. Complete lists of over-represented genes of different categories (EASE score < 0.05) are provided as supplementary Table 3.

Validation of array data by qPCR

A subset of array data was validated by real-time or quantitative RT-PCR (qPCR) on the original set of tumors. We designed primers for 9 genes with diverse biological functions and strong fold changes that had been selected in the relapsed vs. relapse-free tumor comparison. Expression levels were standardized with the housekeeping gene HPRT. Median cycle differences were calculated for the same groups of relapsed and relapse-free tumors that had been used for array data stratification (Fig. 2). Genes are listed according to their *t*-statistic values, i.e. in the order of Table 2 and online supplementary Table 2. Three of the validated genes are also included in Figure 1b (*CTPS*, *TRIM22*, *THRA*).

There was an overall good or even excellent correspondence between qPCR median values and array data. Even at the level of

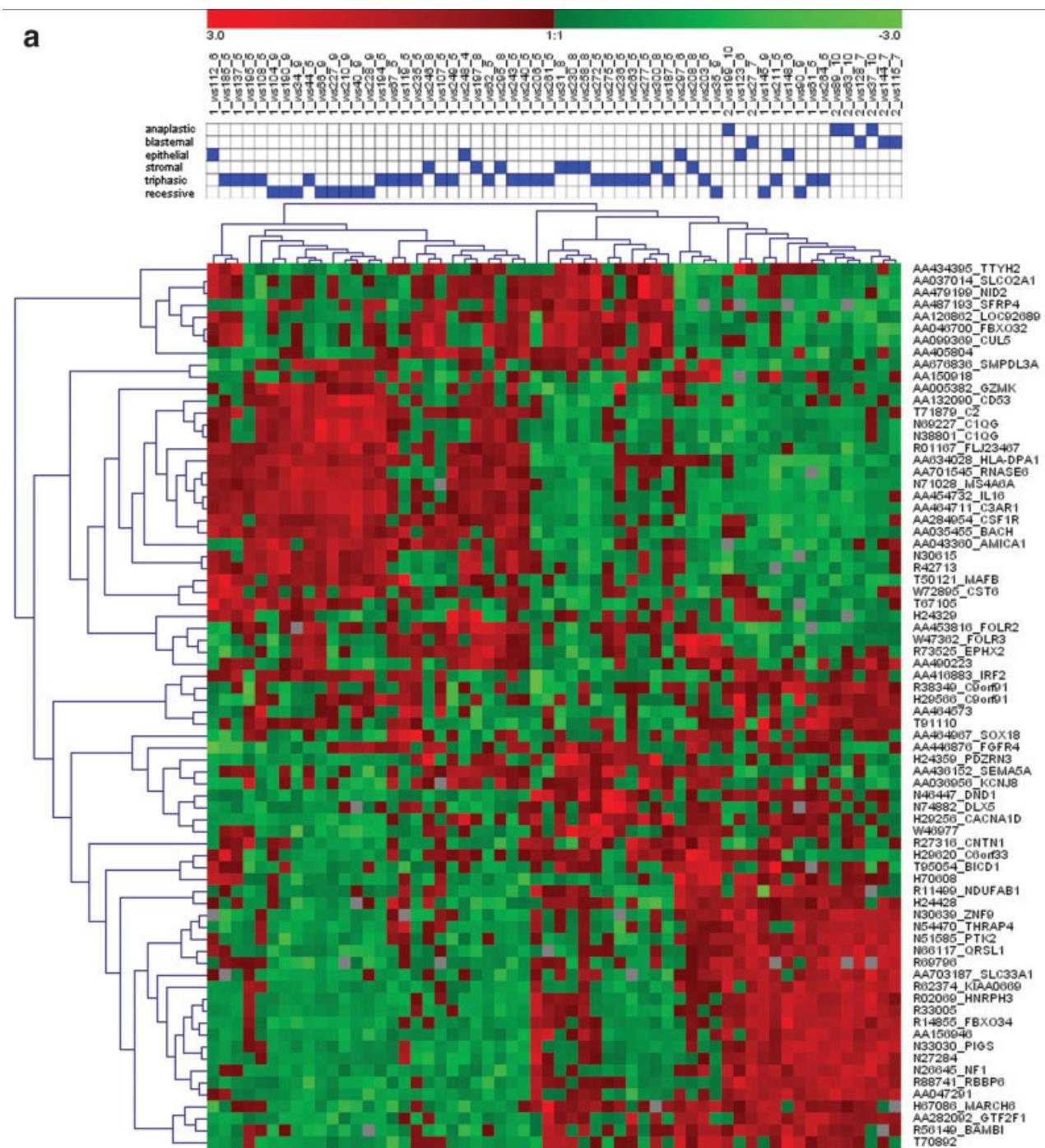


FIGURE 1 – Hierarchical cluster analysis of intermediate vs. high risk and relapse-free vs. relapsed Wilms tumors. Individual tumors are represented by vertical columns with additional histological or clinical information denoted by black squares. For each of the genes accession numbers and gene symbols (where available) are listed on the right. Green squares designate downregulation of a gene in a given tumor; red designates upregulation relative to the mean. Gray spots indicate missing or poorly reproducible data between replicated measurements of a given tumor. (a) Cluster analysis of 52 intermediate risk (predominantly regressive, stromal and epithelial as well as triphasic tumors) and 8 high-risk (anaplastic and blastemal) tumors using 74 differentially expressed genes with lowest adjusted *p*-values (FWER). Numbers in front of ws (Wilms tumor) numbers indicate intermediate-risk tumors (1) and high-risk tumors (2). Histological subtypes are given behind ws numbers (5 = triphasic, 4, 6 = epithelial, 7 = blastemal, 8 = stromal, 9 = regressive, 10 = anaplastic) and are additionally visualized as cluster below ws numbers. Additional subgroups of tumors become apparent especially among the intermediate risk group. (b) For the cluster of relapse-free (>3 years, group 1 as indicated before ws number) versus relapsed (group 2 as indicated before ws number) Wilms tumors 77 differentially expressed genes with lowest adjusted *p*-values (FWER) were used. The total number of tumors is reduced since tumors with a follow-up of less than 3 years had to be excluded. Note that only 4 of the 10 relapses occurred in Wilms tumors with histologically defined high risk (ws89, ws128, ws144, ws199).

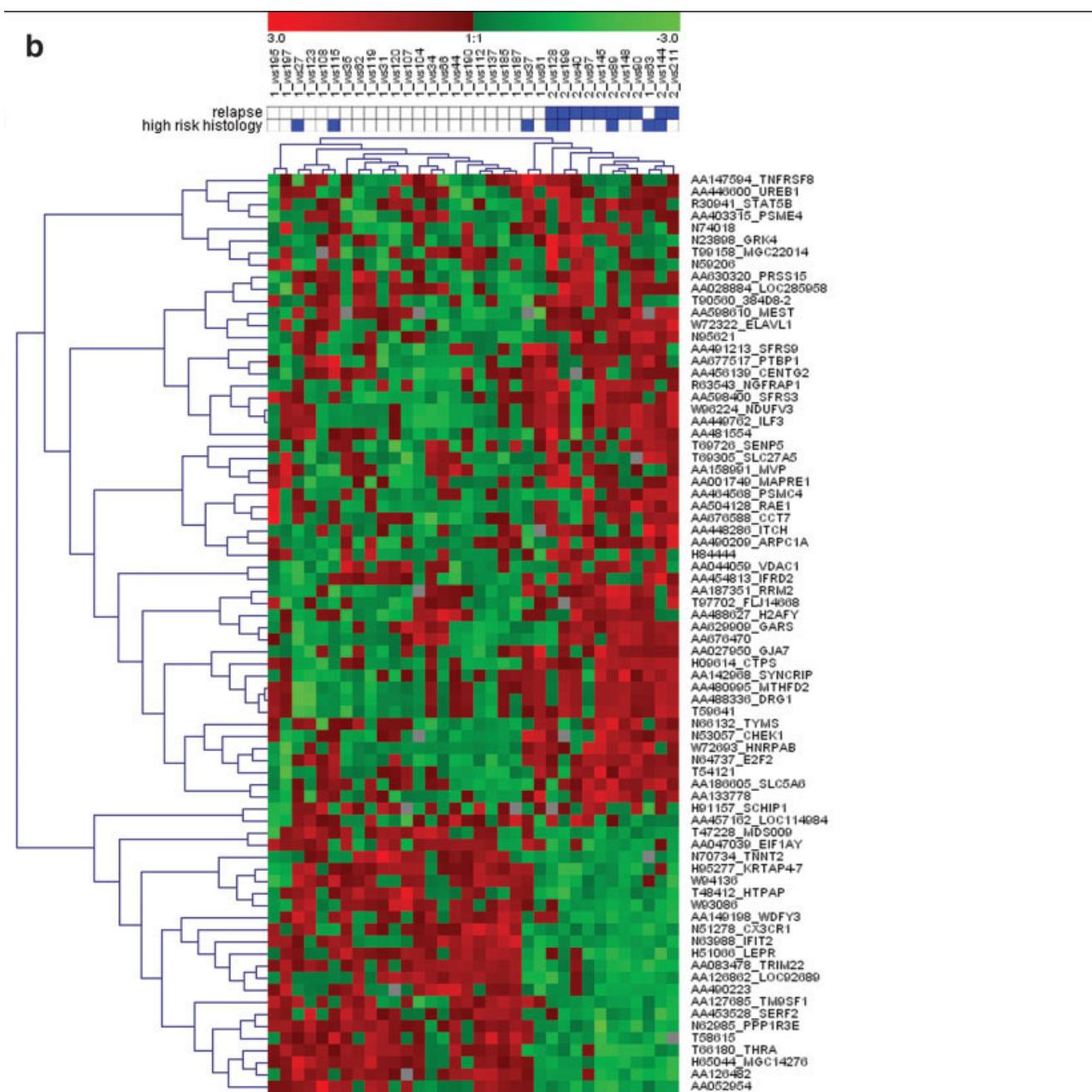


FIGURE 1 – CONTINUED.

individual tumor samples, there was a good agreement between array and qPCR data (data not shown).

Discussion

We performed cDNA microarray experiments in 77 primary Wilms tumor samples and selected putative candidate genes according to different clinical stratifications. The final analysis contained 63 Wilms tumors all of which had undergone preoperative chemotherapy as mandated by the SIOP protocol.

Malignancy grade

Cluster analysis for histological risk grade clearly distinguishes between Wilms tumors of intermediate and high risk histology

(Fig. 1a). The stratification was performed according to the revised Stockholm–Working-Classification.¹⁶ It should be stressed that therapeutic regimens in the European SIOP study mandate preoperative chemotherapy in most cases, which is different from the American NWTS study. It has been well documented that this leads to a quite different distribution of histological subtypes of Wilms tumor and concomitantly altered clinical course.¹⁷ Thus, it will remain open as to what extent the expression changes found in our patient cohort are different from those in the North American study.

The high risk tumor group comprises four predominantly blastemal and four anaplastic tumors. Despite histological differences between these high risk tumors they seem to have a common molecular basis that sets them apart from the intermediate risk

TABLE II – “TOP CANDIDATE GENES” FOR DIFFERENT CLINICAL CRITERIA WITH EXPRESSION DIFFERENCES OF AT LEAST 2-FOLD AND *t*-STATISTIC VALUES OF MORE THAN 1.96

<i>t</i> + fc	<i>t</i> -Stat	Fold change ²	GenBank accession	Gene symbol
Relapse (yes/no)				
	5.19	2.40	AA488336	<i>DRG1</i>
	5.11	2.02	H09614	<i>CTPS</i>
	5.06	2.34	AA480995	<i>MTHFD2</i>
	4.79	2.23	T59641	<i>PBX2</i>
	4.63	2.11	AA449762	<i>ILF3</i>
	–4.47	–2.15	N70734	<i>TNNT2</i>
	4.46	2.14	W96224	<i>NDUFV3</i>
	–3.84	–2.22	T66180	<i>THRA</i>
	–3.81	–2.82	AA047039	<i>EIF1AY</i>
	–3.81	–2.33	AA083478	<i>TRIM22</i>
	3.71	2.13	AA598610	<i>MEST</i>
	–3.70	–2.49	N51278	<i>CX3CR1</i>
	3.65	2.42	N53057	<i>CHEK1</i>
	3.58	2.02	R00884	<i>DHFR</i>
	3.54	2.13	H56918	<i>EIF4A1</i>
	–3.53	–2.14	AA099369	<i>CUL5</i>
	3.50	2.35	H59204	<i>CDC6</i>
	–3.43	–2.40	AA046700	<i>FBXO32</i>
	–3.42	–2.47	AA046679	
	3.40	2.22	AA430744	<i>EZH2</i>
	–3.38	–2.23	H11453	
	3.36	2.17	N70010	<i>CDC45</i>
	–3.27	–2.03	AA192166	
	–3.27	–2.66	T70352	<i>OLFML2A</i>
	3.23	2.64	AA446462	<i>BUB1</i>
	–3.22	–2.05	AA458965	<i>NK4</i>
	–3.22	–2.34	AA427947	
	–3.20	–2.68	R34224	<i>MGC16121</i>
	3.17	2.40	R06900	<i>RAMP</i>
	3.15	2.32	AA968443	
	–3.14	–2.15	R91916	<i>CXCR6</i>
	–3.11	–2.17	W84612	<i>YPEL3</i>
	3.10	2.21	H25560	<i>DGAT2</i>
	–3.09	–2.35	AA291749	<i>ESR1</i>
	–3.02	–2.00	W47350	<i>RARRES3</i>
	3.01	2.34	T66935	<i>DKFZp762E1312</i>
	2.96	2.70	AA701455	<i>CENPF</i>
	–2.92	–2.64	T53298	<i>IGFBP7</i>
	–2.92	–2.31	H73914	<i>LDB2</i>
	–2.89	–2.19	H09111	<i>I3CDNA73</i>
Histological risk (high/standard)	–6.19	–2.21	R01167	<i>FLJ23467</i>
	–6.15	–2.26	AA126862	<i>LOC92689</i>
	–5.89	–2.75	N30615	
	–5.79	–3.28	AA046700	<i>FBXO32</i>
	–5.75	–2.77	AA4464711	<i>C3ARI</i>
	–5.61	–2.63	AA099369	<i>CUL5</i>
	–5.45	–2.52	R42713	<i>IDI2</i>
	–5.38	–2.68	N71028	<i>MS4A6A</i>
	–5.21	–2.22	AA035455	<i>BACH</i>
	–5.15	–2.29	AA701545	<i>RNASE6</i>
Survival (no/yes)	7.96	2.79	AA480995	<i>MTHFD2</i>
	7.48	2.88	AA488336	<i>DRG1</i>
	6.62	2.62	T59641	<i>PBX2</i>
	–6.22	–3.45	N30615	
	5.84	2.04	AA186605	<i>SLC5A6</i>
	5.60	2.71	N53057	<i>CHEK1</i>
	–5.13	–2.57	N30436	
	5.12	2.36	AA278749	<i>NCBP1</i>
	5.11	2.14	H09614	<i>CTPS</i>
	–5.03	–2.16	W47179	<i>CTSB</i>
Metastasis (yes/no)	4.68	2.32	AA489246	<i>ST14</i>
	3.40	2.89	AA401441	<i>BF</i>
	3.29	2.95	AA664406	<i>C4A</i>
	3.26	2.16	AA129777	<i>SLC16A3</i>
	3.12	2.05	AA424584	<i>LTBP2</i>
	2.90	2.06	AA430625	<i>DPYD</i>
	2.77	2.03	N93686	
	2.68	2.45	N30986	
	–2.61	–2.22	W68220	<i>KIAA0101</i>
	2.53	2.89	AA485867	<i>MARCO</i>

¹For relapsed tumors, the 40 genes with highest *t*-statistic values are shown. Genes whose deregulation was validated by real time qPCR on the original set of tumors (see Fig. 2) are given in boldface. For the clinical criteria high risk histology, survival and metastasis, the first 10 genes are given. Complete lists are available as online supplementary Table 2. ²The regulation refers to the group in italic of tumors in column 1.

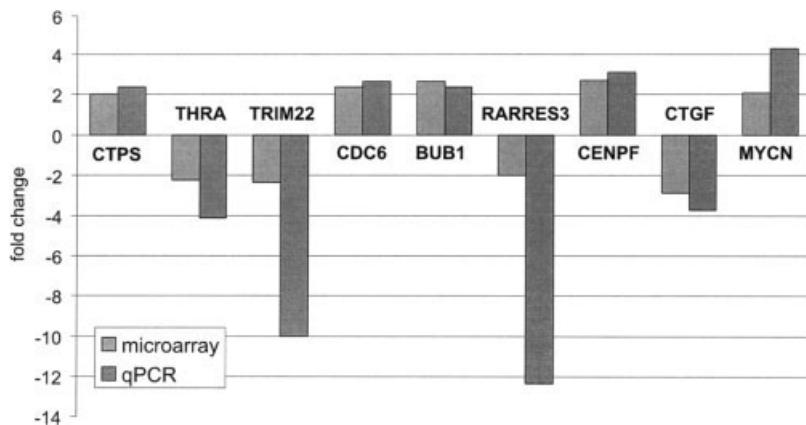


FIGURE 2 – Comparison of the magnitude of gene expression changes between relapsed as opposed to nonrelapsed Wilms tumors as measured by microarray analysis and qPCR on the same set of tumors. The genes selected were differentially expressed by microarray analysis and were then assessed by qPCR for the same stratified tumor groups. Bars represent median values in each case. Genes are shown in their order of decreasing *t*-statistic values (cf. Table 2 and online supplementary Table 2).

group. The intermediate risk group comprises 52 Wilms tumors. Half of these were “classic” triphasic Wilms tumors presenting with a mixture of epithelial, stromal and blastemal cell types. The other half consists of predominantly stromal or epithelial and of regressive tumors. A partial clustering of histological subtypes can be seen, especially for regressive Wilms tumors in the left third of the cluster picture. Nevertheless, the separation of intermediate risk histologies into several subclusters lacks a clear clinicopathologic correlate. This suggests that there may be additional underlying factors that are not covered by current diagnostic means. Part of this may also be due to the fact that the tumors generally display histological heterogeneity to different degrees, and thus, rather represent a continuum of histological subtypes with one often being predominant.

Relapse and survival

The cluster comparison between relapse-free tumors and those that later relapsed is based on 77 genes with lowest adjusted *p*-values. These genes clearly distinguished between the two groups (Fig. 1b). Only tumors with a relapse-free follow-up of at least 3 years were included in the first group. Expression data for survival overlap with those for relapse because most deaths in children with Wilms tumor occur as a consequence of relapse. More than half of the genes selected for survival were concurrently selected for relapsed tumors. In relapsed Wilms tumors, more genes with a lower FDR were selected due to the larger tumor cohort available in comparison to the stratification for survival.

An association between gene expression and prediction of outcome has recently been described in several other human cancers.¹⁸ Studies on breast cancer have delivered the most extensive and informative prognostic profiles.¹⁹ These studies suggest that the predictive power of microarray approaches may be even greater than that of other known predictive markers. However, the overall positive prediction of tumors rarely exceeded 60%. Here, we show that in Wilms tumors expression analysis may also help to predict tumor recurrence and outcome in future. Up to now, the risk for relapse in Wilms tumors is estimated from clinical and histological parameters and this stratifies the extent of postoperative therapy.¹⁶ Only 4 of the 10 relapsed tumors had high risk histology, whereas the majority of relapses occurred in tumors with intermediate risk histology. The stratification based on microarray data for relapsed vs. relapse-free Wilms tumors (Fig. 1b) points at a potential predictive value of expression data, in addition to histology. At this point, the number of analyzed Wilms tumors is definitely too small to calculate overall prediction rates. Prediction studies need both larger training and validation groups. However, expression profiling appears to deliver additional prognostic information, which may help to guide future research and to further optimize treatment of affected children.

Evaluation of other clinical features

Interestingly, cluster analysis for the stratification of tumors with and without metastasis was not unequivocal. The propensity of tumor cells to spread and colonize more distant sites is not easily identifiable in our tumor set. It may well be that the metastatic potential of individual subclones of tumor cells may get lost in a global analysis that is based on a comparatively large piece of tumor tissue. This is supported by the fact that in the literature metastasis-associated gene expression profiles are only available for comparisons between cell lines with different metastatic potential or genuine comparisons of primary tumor and metastases.

For the stratification of the clinical criterion response to chemotherapy, almost no expression difference could be detected. Response to preoperative chemotherapy was determined by measuring pre- and postchemotherapeutic tumor volumes. Tumor reduction of more than 50% was defined as good response (38 children), whereas tumor reduction of less than 50% or increase of tumor volume despite preoperative chemotherapy was defined as poor response (19 children). The lack of clear differentiating expression patterns was somewhat surprising in this case. Strongly hit tumors with massive apoptosis and large numbers of secondary cell types should be quite different from tumors that continue to grow almost unaffected by chemotherapy. However, it is possible that response to chemotherapy is controlled by relatively few genes that may not be represented on our microarrays.

Candidate genes for Wilms tumor development and progression

To date, 6 publications reported on microarray expression screening in Wilms tumors.^{20–25} The aim of several of these studies, most of which are based on rather small numbers of Wilms tumor samples, was to identify genes differentially regulated in Wilms tumors compared to normal kidney tissue. Two recent studies sought to correlate expression profiles to clinical features. The study by Williams *et al.*²² compares 27 Wilms tumors with favorable histology, half of which later relapsed. The authors identified genes with potential biological interest, but state that their data are not useful for prediction. Probably due to the fact that they used prechemotherapy samples, there is only little overlap in genes associated with relapse compared to our study. The second recent study by Li *et al.*²¹ compares anaplastic tumors to tumors with favorable histology and additionally contains an overall comparison of Wilms tumors to normal kidney. Compared to our study, several genes were concordantly identified: *CENPF*, *CCNA1*, *CDC2* (anaplastic vs. favorable histology) and *EZH2* (Wilms tumor vs. fetal kidney). The first group of genes deregulated in advanced Wilms tumors is involved in cell cycle progression. The only difference between samples included in our study and that of Li *et al.* is the therapeutic approach: Wilms tumors analyzed by Li *et al.* were all primarily operated according to the American NWTS protocol, whereas tumor samples included in our study

were derived from children who were treated with preoperative chemotherapy according to the European SIOP protocol. Since these genes were concordantly deregulated in both studies, they seem to be involved in tumor progression independent of the therapeutic approach.

Compared to previous expression studies on Wilms tumors, we analyzed a much larger set of 63 preoperatively treated tumors and considered several clinical criteria for the evaluation of expression data. The aim of our study was to assess relative expression differences between these tumors and to search for genes affecting tumor progression. To investigate whether certain groups of genes may be over-represented among differentially regulated genes, we performed EASE analysis of different gene lists. Among genes that were deregulated in relapsed tumors, those involved in cell cycle progression and mitosis were significantly over-represented. *BUB1*, *CENPF*, *CENPE*, *CDC6*, *CKS2*, *CUL5*, *ESR1*, *UBE2C*, *MAD2L1*, *MAD2*, *CHEK1* and *STK6* are examples of significantly (EASE score < 0.05) over-represented mitosis-associated genes in relapsed Wilms tumors. In tumors with high-risk histology that were compared to standard-risk tumors, we found a slightly different picture with significant over-representation of defense and immune response genes, e.g. *C3AR1*, *TREM2*, *CSF1R*, *BF*, *IL16*, *HLA-C*, *IL1R1*, and genes coding for extracellular region proteins, e.g. *COL15A1*, *ELN*, *MMP2*, *NID2*, *SFRP4* and *OSF2*. Although high-risk histology is the best predictor for later relapse, it is intriguing that these two criteria appear to be characterized by rather different sets of biological processes, i.e. mitosis vs. defense.

Previous studies have proposed further genes with prognostic relevance in Wilms tumors, e.g. members of the *INK4* family,²⁶ *TERT*,²⁷ *VEGF* and its receptor *FLT1*,^{28,29} *DKK1*,³⁰ *TrkBfull*,³¹ *TGFA* and *EGFR*.³² In our study, however, no significant regulation of these genes could be found in any stratification of clinical features in Wilms tumors. The expression differences reported before may be due to the small number of tumors included in most of these studies. Furthermore, it may generally be rather difficult to predict outcome in Wilms tumors by the assessment of single genes. The range of single gene expression values measured by microarray and qPCR approaches in relapsed tumors also supports this assumption (data not shown). We therefore speculate that only a combination of expression data from a set of different genes may represent a reliable new approach for prediction of outcome in Wilms tumors.

The retinoic acid and E2F pathways as potential new targets

Interestingly, our analysis identified several retinol-related genes belonging to the retinoic acid receptor responder family. *RARRES2* was found to be 2.2-fold downregulated in high malignant tumors, while *RARRES3* was 2-fold downregulated in relapsed tumors and in tumors that led to death of the affected children.

Another retinoic acid induced gene, *CTGF* (connective tissue growth factor; also known as *IGFBP8*), has been identified in a screen for WT1-induced genes.³³ Compared to normal kidney tissue, *CTGF* was overexpressed in a subset of Wilms tumors. We found *CTGF* to be downregulated in the evaluation of relapse and survival (2.9- and 3.8-fold downregulation, respectively), which represent important criteria for the prediction of prognosis.

sis. It is conceivable that *CTGF* is activated in nephrogenesis and early tumorigenesis, while its expression decreases with tumor progression.

Additionally, *NK4* (natural killer cell transcript 4), *RAMP* (RA-regulated nuclear matrix-associated protein) and *ENPP2* (Autotaxin) represent genes regulated by retinoic acid,^{34,35} and they were also found to be strongly deregulated in relapsed Wilms tumors. Therefore, it appears that the retinoic acid pathway can be deregulated at different levels. We have since tested whether retinoic acid could be employed as a novel therapeutic agent in Wilms tumors by exposing cultured tumor cells.³⁶ Our data suggest that retinoic acid may represent a novel therapeutic approach to treat tumors with evidence for impaired retinoic acid signaling.

Another pathway potentially involved in Wilms tumor progression is the RB-E2F pathway. Members of the E2F transcription factor family are important targets of the retinoblastoma (RB) pathway and they regulate transcription of a number of genes that control cell cycle progression.³⁷ *EZH2* (enhancer of zeste homolog 2) is a direct target of E2F transcription factors.³⁸ Overexpression of *EZH2* and involvement in tumor progression was shown in different human cancers, e.g. breast cancer.³⁸ Takahashi *et al.*²⁰ and Li *et al.*²¹ found *EZH2* overexpressed in Wilms tumors with favorable histology compared to normal kidney tissue. Our results confirm the involvement of *EZH2* in Wilms tumorigenesis and additionally imply that *EZH2* acts as a tumor progression factor since its expression is upregulated in recurrent Wilms tumors. In addition to *EZH2*, several other genes are known to be controlled by E2F³⁹ and 4 of these were highly overexpressed in recurrent vs. nonrecurrent Wilms tumors (*CDC6*, *CDC2*, *MYCN*, *DHFR*). These results suggest an important role of the RB-E2F pathway in Wilms tumor formation and progression.

In summary, we identified several candidate genes involved in Wilms tumor development and progression. Since expression profiling harbors the potential to predict prognosis, which has already been shown in several other cancer types, the genes identified in relapsed Wilms tumors are of special interest. These differentially expressed candidate genes can now be screened in extended tumor cohorts to corroborate our findings. Our goal is to select a minimal set of genes whose expression can be used to identify patients at risk for relapse who may benefit from intensified therapeutic regimens or enhanced surveillance. Such screening procedures could be implemented in future study protocols as prospective prognostic studies. From a basic science perspective it will be very interesting to identify gene expression in individual cell types by mRNA *in situ* hybridization or antibody staining to better characterize their individual contribution to Wilms tumor development.

Acknowledgements

The authors would like to thank Angelika Filmer, Barbara Klamt and Sabine Erhardt for excellent technical assistance and Susan Nieschlag for language editing. This work is part of the PhD thesis of Birgit Zirn. This work was funded by the Graduiertenkolleg 639, the BMBF "Kompetenznetz für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie", the Sander Stiftung and parent donations. We gratefully acknowledge the efforts of all clinicians, nurses and patients who made it possible to collect the tumor specimens.

References

- 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* 2000;27:443-54.
- 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* 1990;343:774-8.
- Koesters R, Ridder R, Kopp-Schneider A, Betts D, Adams V, Niggli F, Briner J, von Knebel Doeberitz M. Mutational activation of the β -catenin proto-oncogene is a common event in the development of Wilms' tumors. *Cancer Res* 1999;59:3880-2.
- Maiti S, Alam R, Amos CI, Huff V. Frequent association of β -catenin and WT1 mutations in Wilms tumors. *Cancer Res* 2000;60:6288-92.
- Gessler M, Konig A, Arden K, Grundy P, Orkin S, Sallan S, Peters C, Ruyse S, Mandell J, Li F, et al. Infrequent mutation of the WT1 gene in 77 Wilms' Tumors. *Hum Mutat* 1994;3:212-22.
- Hill DA, Shear TD, Liu T, Billups CA, Singh PK, Dome JS. Clinical and biologic significance of nuclear unrest in Wilms tumor. *Cancer* 2003;97:2318-26.
- Grundy RG, Pritchard J, Scambler P, Cowell JK. Loss of heterozygosity on chromosome 16 in sporadic Wilms' tumour. *Br J Cancer* 1998;78:1181-7.

8. Berwanger B, Hartmann O, Bergmann E, Bernard S, Nielsen D, Krause M, Kartal A, Flynn D, Wiedemeyer R, Schwab M, Schaefer H, Christiansen H, et al. Loss of a FYN-regulated differentiation and growth arrest pathway in advanced stage neuroblastoma. *Cancer Cell* 2002;2:377–86.
9. Yang YH, Dudoit S, Luu P. Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation. *Nucleic Acids Res* 2002;30:15.
10. Benjamini Y, Hochberg YH. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach for multiple testing. *J R Statist Soc B* 1995;57:289–300.
11. Callow MJ, Dudoit S, Gong EL, Speed TP, Rubin EM. Microarray expression profiling identifies genes with altered expression in HDL-deficient mice. *Genome Res* 2000;10:2022–9.
12. Westfall PH, Young SS. Resampling-based multiple testing: examples and methods for p-value adjustment. New York: Wiley, 1993.
13. Ross I, Gentleman RR. A language for data analysis and graphics. *J Comput Graphical Stat* 1996;5:299–314.
14. Sturm A, Quackenbush J, Trajanoski Z. Genesis: cluster analysis of microarray data. *Bioinformatics* 2002;18:207–8.
15. Hosack DA, Dennis G, Jr., Sherman BT, Lane HC, Lempicki RA. Identifying biological themes within lists of genes with EASE. *Genome Biol* 2003;4:R70.
16. Vujanic GM, Sandstedt B, Harms D, Kelsey A, Leuschner I, de Kraker J. Revised International Society of Paediatric Oncology (SIOP) working classification of renal tumors of childhood. *Med Pediatr Oncol* 2002;38:79–82.
17. 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* 2001;12:311–9.
18. Russo G, Zegar C, Giordano A. Advantages and limitations of microarray technology in human cancer. *Oncogene* 2003;22:6497–507.
19. van't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M, Peterse HL, van der Kooy K, Marton MJ, Witteveen AT, Schreiber GJ, Kerkhoven RM, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 2002;415:530–6.
20. Takahashi M, Yang XJ, Lavery TT, Furge KA, Williams BO, Tretiakova M, Montag A, Vogelzang NJ, Re GG, Garvin AJ, Soderhall S, Kagawa S, et al. Gene expression profiling of favorable histology Wilms tumors and its correlation with clinical features. *Cancer Res* 2002;62:6598–605.
21. Li W, Kessler P, Williams BR. Transcript profiling of Wilms tumors reveals connections to kidney morphogenesis and expression patterns associated with anaplasia. *Oncogene* 2005;24:457–68.
22. Williams RD, Hing SN, Greer BT, Whiteford CC, Wei JS, Natrajan R, Kelsey A, Rogers S, Campbell C, Pritchard-Jones K, Khan J. Prognostic classification of relapsing favorable histology Wilms tumor using cDNA microarray expression profiling and support vector machines. *Genes Chromosomes Cancer* 2004;41:65–79.
23. Takahashi M, Yang XJ, Sugimura J, Backdahl J, Tretiakova M, Qian CN, Gray SG, Knapp R, Anema J, Kahnoski R, Nicol D, Vogelzang NJ, et al. Molecular subclassification of kidney tumors and the discovery of new diagnostic markers. *Oncogene* 2003;22:6810–8.
24. Rigolet M, Faussillon M, Baudry D, Junien C, Jeanpierre C. Profiling of differential gene expression in Wilms tumor by cDNA expression array. *Pediatr Nephrol* 2001;16:1113–21.
25. Li CM, Guo M, Borczuk A, Powell CA, Wei M, Thaker HM, Friedman R, Klein U, Tycko B. Gene expression in Wilms' tumor mimics the earliest committed stage in the metanephric mesenchymal-epithelial transition. *Am J Pathol* 2002;160:2181–90.
26. Arcellana-Panlilio MY, Egeler RM, Ujack E, Pinto A, Demetrick DJ, Robbins SM, Coppes MJ. Decreased expression of the INK4 family of cyclin-dependent kinase inhibitors in Wilms tumor. *Genes Chromosomes Cancer* 2000;29:63–9.
27. Dome JS, Chung S, Bergemann T, Umbrecht CB, Saji M, Carey LA, Grundy PE, Perlman EJ, Breslow NE, Sukumar S. High telomerase reverse transcriptase (hTERT) messenger RNA level correlates with tumor recurrence in patients with favorable histology Wilms' tumor. *Cancer Res* 1999;59:4301–7.
28. Baudry D, Faussillon M, Cabanis MO, Rigolet M, Zucker JM, Patte C, Sarnacki S, Boccon-Gibod L, Junien C, Jeanpierre C. Changes in WT1 splicing are associated with a specific gene expression profile in Wilms' tumour. *Oncogene* 2002;21:5566–73.
29. Ghanem MA, van Steenbrugge GJ, Sudaryo MK, Mathoera RB, Nijman JM, van der Kwast TH. Expression and prognostic relevance of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor (FLT-1) in nephroblastoma. *J Clin Pathol* 2003;56:107–13.
30. Wirths O, Waha A, Weggen S, Schirmacher P, Kuhne T, Goodyer CG, Albrecht S, Von Schweinitz D, Pietsch T. Overexpression of human Dickkopf-1, an antagonist of wingless/WNT signaling, in human hepatoblastomas and Wilms' tumors. *Lab Invest* 2003;83:429–34.
31. Eggert A, Grotzer MA, Ikegaki N, Zhao H, Cnaan A, Brodeur GM, Evans AE. Expression of the neurotrophin receptor TrkB is associated with unfavorable outcome in Wilms' tumor. *J Clin Oncol* 2001;19:689–96.
32. Grundy P, Telzerow P, Moksness J, Breslow NE. Clinicopathologic correlates of loss of heterozygosity in Wilms' tumor: a preliminary analysis. *Med Pediatr Oncol* 1996;27:429–33.
33. Stanhope-Baker P, Williams BR. Identification of connective tissue growth factor as a target of WT1 transcriptional regulation. *J Biol Chem* 2000;275:38139–50.
34. Park DJ, Vuong PT, de Vos S, Douer D, Koeffler HP. Comparative analysis of genes regulated by PML/RAR alpha and PLZF/RAR alpha in response to retinoic acid using oligonucleotide arrays. *Blood* 2003;102:3727–36.
35. Tice DA, Szeto W, Soloviev I, Rubinfeld B, Fong SE, Dugger DL, Winer J, Williams PM, Wieand D, Smith V, Schwall RH, Pennica D, et al. Synergistic induction of tumor antigens by Wnt-1 signaling and retinoic acid revealed by gene expression profiling. *J Biol Chem* 2002;277:14329–35.
36. Zim B, Samans B, Spangenberg C, Graf N, Eilers M, Gessler M. All-trans retinoic acid treatment of Wilms tumor cells reverses expression of genes associated with high risk and relapse in vivo. *Oncogene* 2005;24:5246–51.
37. Muller H, Bracken AP, Vernell R, Moroni MC, Christians F, Grassilli E, Prosperini E, Vigo E, Oliner JD, Helin K. E2Fs regulate the expression of genes involved in differentiation, development, proliferation, and apoptosis. *Genes Dev* 2001;15:267–85.
38. Bracken AP, Pasini D, Capra M, Prosperini E, Colli E, Helin K. EZH2 is downstream of the PRB-E2F pathway, essential for proliferation and amplified in cancer. *EMBO J* 2003;22:5323–35.
39. Trimarchi JM, Lees JA. Sibling rivalry in the E2F family. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3:11–20.

Publikation 2

All-trans retinoic acid treatment of Wilms tumor cells reverses expression of genes associated with high risk and relapse in vivo

Zirn B¹, Samans B², Spangenberg C³, Graf N⁴, Eilers M², Gessler M¹.

¹ Physiological Chemistry I, Biozentrum, University of Wuerzburg, Germany

² Institute of Molecular Biology and Tumor Research (IMT), University of Marburg, Germany

³ Children's Hospital, Department of Molecular Genetics, University of Mainz, Germany

⁴ Children's Hospital, Department of Paediatric Oncology and Haematology, University of the Saarland, Germany

Oncogene, 24(33):5246-51 (2005).

SHORT REPORTS

All-trans retinoic acid treatment of Wilms tumor cells reverses expression of genes associated with high risk and relapse *in vivo*

Birgit Zirn¹, Birgit Samans², Christian Spangenberg³, Norbert Graf⁴, Martin Eilers² and Manfred Gessler*,¹

¹Physiological Chemistry I, Theodor-Boveri-Institute, Biocenter of the University of Wuerzburg, Wuerzburg 97074, Germany;

²Institute of Molecular Biology and Tumor Research (IMT), University of Marburg, Marburg, Germany; ³Children's Hospital, Department of Molecular Genetics, University of Mainz, Mainz, Germany; ⁴Children's Hospital, Department of Paediatric Oncology and Haematology, University of the Saarland, Saarland, Germany

Wilms tumor is one of the most frequent neoplasias in children. Our previous microarray screening in a large series of Wilms tumors revealed several candidate genes that are deregulated in advanced tumors and are part of the retinoic acid signaling pathway. To investigate whether retinoic acid could be employed as a novel therapeutic agent in these tumors, we treated cultured Wilms tumor cells with different concentrations of all-trans retinoic acid (ATRA) and assessed gene expression changes by real-time RT-PCR as well as microarray analysis. Several genes like *RARRES1*, *RARRES3*, *CTGF*, *CKS2*, *CCNA2*, *IGFBP3*, *UBE2C*, *CCL2* or *ITM2B* that were previously found to be deregulated in advanced tumors exhibited opposite expression changes after ATRA treatment. In addition to enhanced retinoid signaling, the transforming growth factor-beta (TGF β) pathway was strongly activated by ATRA treatment of Wilms tumor cells. Both the retinoic acid and the TGF β pathway mediate inhibition of cell growth. These findings represent the first molecular evidence of a potential benefit from ATRA treatment in Wilms tumors.

Oncogene (2005) 24, 5246–5251. doi:10.1038/sj.onc.1208725; published online 9 May 2005

Keywords: Wilms tumor; nephroblastoma; retinoic acid; ATRA; TGF β

Wilms tumor or nephroblastoma is a malignant kidney tumor that affects one in 10 000 children. Only a minority of Wilms tumors (10–15%) carries mutations in *WT1*, the Wilms tumor gene 1, and/or β -catenin (*CTNNB1*), whereas the molecular basis of Wilms tumorigenesis remains unclear in most cases. With the aim of detecting new candidate genes associated with malignancy grade and tumor progression, we recently performed cDNA microarray experiments using a large series of 77 primary Wilms tumors (Zirn *et al.*, 2005). Several differentially

expressed genes, for example, *RARRES3*, *CTGF* and *CRABP2*, were not only associated with disease progression but are also part of the retinoic acid signaling pathway. We therefore speculated that retinoic acid treatment may represent a novel therapeutic approach in advanced tumors. Expression of these previously identified retinoic acid-regulated genes that are deregulated in advanced Wilms tumors should then be reversed after treatment with retinoic acid. Additionally, we aimed at the identification of novel retinoic acid-dependent genes in Wilms tumors through expression profiling of treated cells (See Supplementary Material).

All-trans retinoic acid (ATRA) is a vitamin A derivative capable of inhibiting cell proliferation and inducing cell differentiation (Ross *et al.*, 2000). These regulatory effects have been demonstrated in normal cells as well as in several types of cancer cells. A direct consequence of these experimental data has been the use of ATRA in the induction treatment of acute promyelocytic leukemia leading to high rates of complete remission and cure in combination with chemotherapy (for a review see Freemantle *et al.*, 2003). In several other cancer types, clinical trials with retinoic acid are currently performed, for example, in advanced neuroblastoma (Reynolds *et al.*, 2003).

To investigate the response of Wilms tumors to ATRA, we used two different sources of Wilms tumor cells: (1) MZ 128 are derived from a tumor with predominantly stromal histology, a *WT1* mutation, and a cytogenetically detectable *de novo* chromosome 7/12 translocation (Lobbert *et al.*, 1998); (2) WS 427 are primary cells from a triphasic tumor without *WT1* mutation, where the majority of cells grew in a cobblestone-like pattern during short-term culture. Both types of cells were initially treated with different concentrations of ATRA (100 nM, 10 μ M and 1 mM) for 24 h. Gene expression was then assayed by real-time qPCR for a series of RA-regulated genes, especially ones that had shown differential regulation in advanced Wilms tumors in our previous microarray study. Altogether 11 genes were studied by qPCR: *RARRES1*, *RARRES3*, *CRABP2*, *IGFBP3*, *RARB*, *RARG* and *TRIM22* were upregulated by ATRA treatment, whereas *ENPP2* was downregulated. *RARRES2*, *IGF2*

*Correspondence: M Gessler;
E-mail: gessler@biozentrum.uni-wuerzburg.de

Received 10 December 2004; revised 23 February 2005; accepted 1 April 2005; published online 9 May 2005

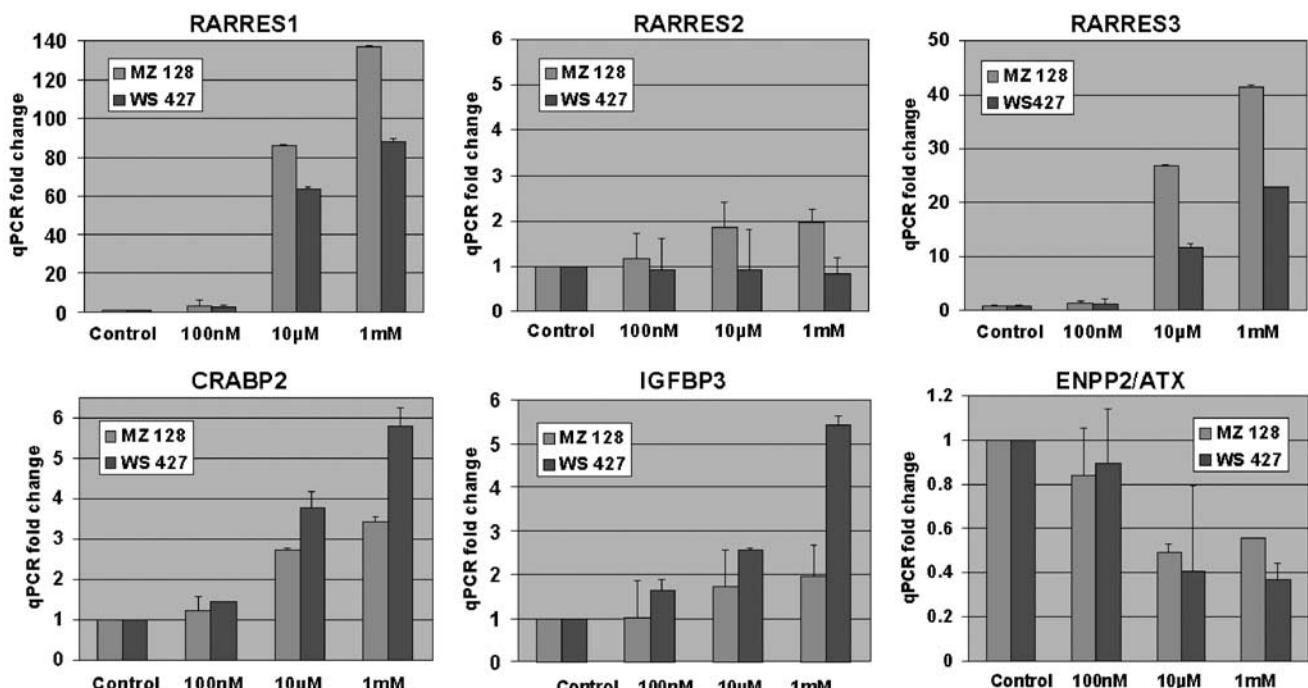


Figure 1 Examples of differential gene expression in both types of Wilms tumor cells after exposure to various concentrations of ATRA (Sigma, Taufkirchen, Germany) for 24 h. After RNA extraction with Trizol Reagent (Invitrogen, Karlsruhe, Germany), cDNA synthesis and real-time PCR were performed as described previously (Zirn *et al.*, 2005). qPCR fold changes refer to untreated control cells (fold change = 1). Four genes were induced by ATRA (*RARRES1*, *RARRES3*, *CRABP2*, *IGFBP3*), whereas *ENPP2/ATX* represents an example of a downregulated gene. *RARRES2* is not differentially regulated in a consistent manner

and *RARA* remained unchanged. The latter three genes also remained unchanged in advanced Wilms tumors. Data for six of these genes are shown in Figure 1. It is important to note that differential gene expression occurred concordantly in both types of cells. ATRA concentrations of 100 nM had little effect, whereas 10 μM and 1 mM strongly altered gene regulation. Compared to 10 μM, application of 1 mM ATRA did not further enhance differential gene regulation.

To investigate how cell growth is influenced by continuous ATRA treatment, we additionally exposed both types of cells to ATRA for 5 days. The ATRA-containing medium was changed once in between. Whereas cell growth was almost unchanged at a concentration of 100 nM ATRA as compared to untreated cells, higher concentrations markedly inhibited cell proliferation. Cell growth was completely stopped when a concentration of 1 mM ATRA was applied for 5 days (data not shown).

To assess global gene expression changes and to identify additional retinoic acid-regulated candidate genes in Wilms tumors, we performed microarray analysis of both cell lines after 24 h ATRA treatment. In these experiments, an ATRA concentration of 10 μM was chosen for two reasons: firstly, it exerted a strong regulatory effect in qPCR (compare Figure 1), and secondly, previous experiments suggested similar concentrations to be effective *in vivo* (Reynolds *et al.*, 1991). For quality control, each experiment was performed as sandwich hybridization, that is, instead of a coverslip, a

second microarray slide was used. The mean log-ratios M were calculated from replicates. Only gene replicates with optimal reproducibility, that is, difference of less than 75% of the calculated average log-ratio and signal intensity that was higher than background intensity were included in the final analysis.

For both types of cells, the 30 candidate genes with highest fold changes due to ATRA treatment are listed in Table 1. Several of the genes identified are known ATRA targets, for example, *IGFBP3* and *CTGF/IGFBP8* (Freemantle *et al.*, 2002), and their regulation was in accordance with the literature. All overlapping genes were concordantly regulated, that is, in the same direction.

We then performed hierarchical clustering of those genes that (1) were differentially regulated in advanced tumors and (2) changed their expression in ATRA-treated tumor cells. Hierarchical clustering of these genes revealed a frequent coregulation in individual tumors from our previous study, despite the heterogeneity of that collection (Figure 2). Additionally, most genes exhibited opposite regulation after ATRA treatment as compared to their overall regulation in high risk and relapsed Wilms tumors. For example, the genes *RARRES1* and *RARRES3* had been frequently downregulated in high-risk and relapsed tumors, whereas their expression was increased after ATRA treatment. This ATRA-induced inverse expression of genes associated with disease progression is an important finding since it represents the first molecular evidence of a

Table 1 Top 30 candidate genes from both types of Wilms tumor cells with highest fold changes in microarray analysis after exposure to 10 μM ATRA for 24 h

Gene symbol	Gene name	Fold change in MZ 128	Coregulation in WS 427
DHRS3	Dehydrogenase/reductase (SDR family) member 3	13.6	4.6
TLR5	Toll-like receptor 5	-7.6	
TAL1	T-cell acute lymphocytic leukemia 1	6.0	2.2
RARB	Retinoic acid receptor, beta	5.3	2.3
RARB	Retinoic acid receptor, beta	5.1	2.0
RARRES1	Retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 1	3.4	
FLJ20344	Hypothetical protein FLJ20344	-3.2	
ITGA1	Integrin, alpha 1	3.0	
SMAD3	SMAD, mothers against DPP homolog 3 (<i>Drosophila</i>)	2.9	
AQP1	Aquaporin 1 (channel-forming integral protein, 28 kDa)	-2.7	
CLDN11	Claudin 11 (oligodendrocyte transmembrane protein)	2.6	
TYSND1	Trypsin domain containing 1	-2.6	
ETV1	Ets variant gene 1	2.5	
GARP	Glycoprotein A repetitions predominant	2.4	
uPAR	Plasminogen activator, urokinase receptor	2.4	3.2
CAPN7	Calpain 7	2.4	
KIT	v-Kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog	2.4	
SFRS2IP	Splicing factor, arginine/serine-rich 2, interacting protein	-2.3	
NAV2	Neuron navigator 2	2.3	
DLC1	Deleted in liver cancer 1	2.2	
PDGFRA	Platelet-derived growth factor receptor, alpha polypeptide	2.2	
AKAP12	A kinase (PRKA) anchor protein (gravin) 12	2.2	2.0
ZNF133	Zinc-finger protein 133 (clone pHZ-13)	2.2	
MIR16	Membrane-interacting protein of RGS16	2.2	
FLJ10081	Hypothetical protein FLJ10081	2.1	
IGFBP6	Insulin-like growth factor binding protein 6	2.1	1.4
SNX8	Sorting nexin 8	2.1	
COTL1	Coactosin-like 1 (<i>Dictyostelium</i>)	2.1	
ECE1	Endothelin-converting enzyme 1	-2.1	
IGFBP3	Insulin-like growth factor binding protein 3	2.1	
		Fold change in WS 427	Coregulation in MZ 128
EFG1	Mitochondrial elongation factor G1	5.4	
DHRS3	Dehydrogenase/reductase (SDR family) member 3	4.6	13.6
uPAR	Plasminogen activator, urokinase receptor	3.2	2.4
PLGL	Plasminogen-like	3.1	
MGC35048	Hypothetical protein MGC35048	2.5	
LAMA4	Laminin, alpha 4	2.4	
RARB	Retinoic acid receptor, beta	2.3	5.3
RARRES3	Retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 3	2.3	
TAL1	T-cell acute lymphocytic leukemia 1	2.2	6.0
PLK2	Polo-like kinase 2 (<i>Drosophila</i>)	2.2	
C3ARI	Complement component 3a receptor 1	-2.2	
PLAC2	Placenta-specific 2	2.1	
CCL2	Chemokine (C-C motif) ligand 2	2.1	
FLJ13710	Hypothetical protein FLJ13710	2.1	
NID2	Nidogen 2 (osteonidogen)	2.1	
AKAP12	A kinase (PRKA) anchor protein (gravin) 12	2.0	2.2
RARB	Retinoic acid receptor, beta	2.0	5.1
CLTC	Clathrin, heavy polypeptide (Hc)	-2.0	
SLCO2A1	Solute carrier organic anion transporter family, member 2A1	1.9	
VMP1	Likely ortholog of rat vacuole membrane protein 1	1.9	
GREM1	Gremlin 1 homolog, cysteine knot superfamily (<i>Xenopus laevis</i>)	-1.8	-1.9
FLJ38507	Colon carcinoma-related protein	1.8	
TARSH	Target of Nesh-SH3	-1.7	
SLC38A2	Solute carrier family 38, member 2	1.6	
RARG	Retinoic acid receptor, gamma	1.6	
GREM1	Gremlin 1 homolog, cysteine knot superfamily (<i>Xenopus laevis</i>)	-1.6	-1.9
CTGF	Connective tissue growth factor	1.6	
PFN1	Profilin 1	-1.5	
SLC38A2	Solute carrier family 38, member 2	1.5	
P2RY2	Purinergic receptor P2Y, G-protein-coupled, 2	-1.5	

cDNA microarray experiments were performed as sandwich hybridizations and standardized as described previously (Zirn et al., 2005). To compare expression profiles, the difference of the mean log 2-ratios between ATRA-treated cells and control was calculated, respectively, based on replicated measurements

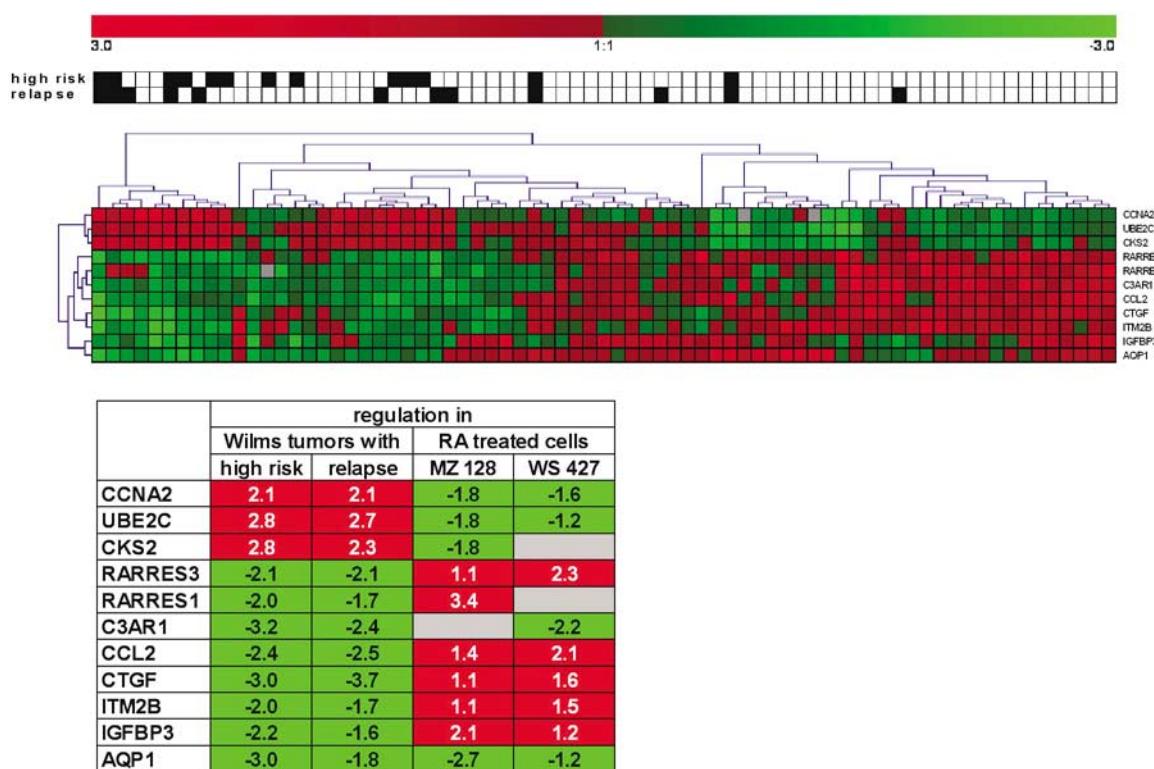


Figure 2 Hierarchical clustering of several genes regulated by ATRA and associated with disease progression in our previous analysis of Wilms tumors (Zirn *et al.*, in press). Individual tumors are represented by vertical columns. High-risk and relapsed tumors are denoted by black squares in the middle bar. Gene symbols are listed on the right. The table below the red-green cluster lists the overall fold changes of these genes in high-risk (as opposed to intermediate risk) and relapsed (as opposed to 3-year relapse-free) tumors from our previous study. On the right side, the mean fold changes in both types of cells after ATRA treatment are displayed. In both, the microarray cluster and the table, green squares designate downregulation of a gene and red squares designate upregulation. Gray squares indicate missing or poorly reproducible data between replicated measurements

potential benefit of retinoic acid treatment in Wilms tumors.

Retinoid signaling

The retinoid signal is transduced by two families of nuclear receptors, the retinoic acid receptors (RARs) (*RARA*, *RARB* and *RARG*) and the retinoid X receptors (*RXRA*, *RXRB* and *RXRG*), which cooperate as *RAR/RXR* heterodimers (Kastner *et al.*, 1997). ATRA exclusively activates *RARs*, whereas 9-*cis* RA stimulates both *RARs* and *RXRs*. The upregulation of the *RARs* by ATRA has been described previously (Farias *et al.*, 2002; Reynolds *et al.*, 2003). As a consequence of ATRA exposure in Wilms tumor cells, we found the *RARs RARB* and *RARG* to be upregulated (Table 1), whereas *RARA* remained unchanged in both types of ATRA-treated Wilms tumor cells. *RARB* was represented in two different clones on the array, which were both independently upregulated in replicated measurements in both cell types. *RARG* was only upregulated in WS 427.

Additionally, the RAR responders *RARRES1* and *RARRES3*, which represent retinoid-inducible tumor suppressor genes, were induced by ATRA treatment.

For both genes, replicated gene expression measurements on the array resulted in strong upregulation in one cell type, but minor changes or poor reproducibility in the other (Figure 2). We therefore analysed both genes by real-time RT-PCR and found a strong and reproducible upregulation of both genes in both cell types (Figure 1).

The expression of *RARB*, *RARG*, *RARRES1* and *RARRES3* strongly inhibits cellular proliferation and mediates differentiation of normal and cancer tissues. Correspondingly, *RARB*, *RARRES1* and *RARRES3* mRNA levels were found to be repressed in many different tumors (Freemantle *et al.*, 2003; Shyu *et al.*, 2003; Sriuranpong *et al.*, 2004). Moreover, downregulation of *RARB* and *RARRES3* could be associated with disease progression in neuroblastoma (Cheung *et al.*, 1998) and B-cell lymphocytic leukemia (Casanova *et al.*, 2001), respectively. In our previous microarray analysis of 77 Wilms tumors, *RARRES1* and *RARRES3* were also downregulated in advanced tumors. Therefore, we interpret the inverse expression of *RARRES1* and *RARRES3* following ATRA treatment as a positive response to ATRA. Together with *RARB* and *RARG*, these genes may be involved in differentiation processes in ATRA-treated Wilms tumor cells. During normal kidney development, retinoic acid is one of the

important factors involved in primary pattern formation and this may in part be recapitulated in these tumor cells (Burrow, 2000).

DHRS3 (dehydrogenase/reductase SDR family member 3) also known as *PSDR1* or *retSDR1* (prostate and retinal short chain dehydrogenase/reductase) was also found to be strongly upregulated in both cell lines (13.6- and 4.6-fold). *DHRS3* is a known retinoic acid-inducible gene (Cerignoli *et al.*, 2002) that encodes a retinal reductase (Kedishvili *et al.*, 2002). Retinol regeneration by *DHRS3* depends on the presence of the cellular retinoic acid binding protein *CRABP2* (Cerignoli *et al.*, 2002), a gene that was concordantly upregulated in ATRA-treated Wilms tumor cells. In addition to classical RA signaling, further pathways appear to be affected by ATRA treatment that may mediate effects on growth control and differentiation as discussed below.

Smad/transforming growth factor-beta (TGF β) signaling

The activation of the TGF β pathway strongly inhibits cell cycle progression at the G1 phase with SMAD proteins as the principal intracellular transducers. Their capacity to activate TGF β target genes is enhanced by a direct interaction with *RARG* (Pendares *et al.*, 2003). The upregulation of *SMAD3* and *RARG*, which we found in ATRA-treated Wilms tumor cells, may contribute to enhanced TGF β signaling and may thereby counteract disease progression. This is consistent with the observation that inactivation of SMADs was associated with poor outcome in several cancer types, for example, breast and colorectal cancer (Xie *et al.*, 2002; Xie *et al.*, 2003).

Interestingly, the ATRA-induced *IGFBP6*, *IGFBP8* and *CTGF/IGFBP8* genes are also thought to exhibit antiproliferative activities *in vivo* since upregulation, especially of the latter two, was inversely associated with tumor progression in several cancer types (Petridou *et al.*, 2001; Xie *et al.*, 2004). These factors were further shown to mediate directly the antiproliferative and proapoptotic effects of TGF β (Kansra *et al.*, 2000; Koliopanos *et al.*, 2002). Additionally, *PDGF* (platelet-derived growth factor) and plasminogen activators have been described as mediators of TGF β signaling (Battegay *et al.*, 1990; Imai *et al.*, 1997). We found the receptors *PDGFRA* and *uPAR* (plasminogen activator urokinase receptor) to be upregulated in ATRA exposed Wilms tumor cells. Of note, overexpression of *uPAR* has been associated with longer survival in children with neuroblastoma (Li *et al.*, 2004). Taken together, this combination of differentially expressed genes strongly hints at a connection between retinoic acid and other signaling systems in tumor progression, of which the SMAD/TGF β pathway may play the most prominent role.

Genes involved in cell proliferation and matrix remodeling

Several genes differentially expressed as a consequence of ATRA exposure in Wilms tumors have previously

described functions in cell proliferation: these are the upregulated genes *DLC1*, *AKAP12/gravin* and *ITM2B*, as well as the downregulated genes *CKS2* and *CCNA2*. *DLC1* and *AKAP12/gravin* were reported to be either deleted or downregulated in human cancer, whereas restoration of their expression induced apoptosis (Yuan *et al.*, 2003; Choi *et al.*, 2004). *ITM2B* is a known regulator of cell death that promotes apoptosis and interacts with *BCL2* (Fleischer *et al.*, 2002). Therefore, upregulation of these genes may contribute to growth inhibition in ATRA-treated Wilms tumor cells. *CCNA2* and *CKS2* are well-known cell cycle checkpoint genes whose overexpression was linked to cell proliferation and tumor progression (Urbanowicz-Kachnowicz *et al.*, 1999; Bahnassy *et al.*, 2004). Hence, downregulation of these genes in Wilms tumors may convey antiproliferative effects.

The removal or modification of cell adhesion is a prerequisite of both tumor growth or spreading and tumor angiogenesis. Several integrins are involved in these processes and they not only mediate cellular adhesion to extracellular matrix proteins but also transduce intracellular signals that promote the attachment and migration of cells on the surrounding extracellular matrix (for a review see Jin and Varner, 2004). We found the expression of *ITGB1* (fibronectin receptor) and *ITGA1* to be altered by ATRA. In addition, several components of the basement membrane that interact with integrins were differentially expressed after ATRA exposure, for example, *laminin α 4* (Gonzalez *et al.*, 2002), *nidogen-2* (Salmivirta *et al.*, 2002) and *CTGF/IGFBP8* (Chang *et al.*, 2004). Therefore, matrix remodeling may also contribute to inhibition of cell growth in Wilms tumor cells.

Consequences for the potential clinical application of ATRA in advanced wilms tumors

The current study has identified a variety of regulatory genes that are candidate targets of ATRA in Wilms tumors. Several genes that had previously been associated with Wilms tumor progression were inversely regulated after ATRA treatment. This provides the first molecular evidence of a potential benefit of retinoic acid treatment in Wilms tumors. Especially in those tumors that resist conventional therapy, ATRA-induced growth inhibition may provide an alternative or additional therapeutic approach.

Further biological studies are clearly needed to confirm these positive effects of ATRA in Wilms tumors before first clinical trials with retinoids in advanced tumors could be envisaged. ATRA needs to be compared to other retinoids such as 13-cis RA and fenretinide that exhibit partially different pharmacological effects. Moreover, the mode of administration (continuous versus pulse therapy) influences pharmacokinetic properties and thereby impacts on the effectiveness of retinoid therapy. For example, in high-risk neuroblastoma, a phase III trial with high-dose pulse

therapy significantly improved event-free survival (Reynolds *et al.*, 2003). Pulse therapy may be of advantage since continuous ATRA application was shown to induce its own metabolism, thus reducing peak levels of the drug (Adamson *et al.*, 1997).

Our study suggests that an ATRA concentration of 10 μ M effectively inhibits cell growth and induces gene regulation. Drug levels between 1 and 10 μ M were also reported to lead to growth inhibition in other *in vitro* studies in cancer cells and were suggested to be effectively reached in target tissues *in vivo* (Reynolds

et al., 2003). These are only some of the practical issues that would have to be addressed before retinoids could be clinically applied in advanced Wilms tumors, but our data suggest that it may be well worth the effort.

Acknowledgements

We thank Dr Michael Krause for excellent technical help with microarray hybridizations. This work is part of the PhD thesis of Birgit Zirn. This work was funded by the Graduiertenkolleg 639, the BMBF 'Kompetenznetz für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie', the Sander Stiftung and parent donations.

References

- Adamson PC, Reaman G, Finklestein JZ, Feusner J, Berg SL, Blaney SM, O'Brien M, Murphy RF and Balis FM. (1997). *J. Clin. Oncol.*, **15**, 3330–3337.
- Bahnassy AA, Zekri AR, El-Houssini S, El-Shehaby AM, Mahmoud MR, Abdallah S and El-Serafi M. (2004). *BMC Gastroenterol.*, **4**, 22.
- Battegay EJ, Raines EW, Seifert RA, Bowen-Pope DF and Ross R. (1990). *Cell*, **63**, 515–524.
- Burrow CR. (2000). *Pediatr. Nephrol.*, **14**, 240–253.
- Casanova B, de la Fuente MT, Garcia-Gila M, Sanz L, Silva A, Garcia-Marco JA and Garcia-Pardo A. (2001). *Leukemia*, **15**, 1521–1526.
- Cerignoli F, Guo X, Cardinali B, Rinaldi C, Casaleotto J, Frati L, Scarpanti I, Gudas LJ, Gulino A, Thiele CJ and Giannini G. (2002). *Cancer Res.*, **62**, 1196–1204.
- Chang CC, Shih JY, Jeng YM, Su JL, Lin BZ, Chen ST, Chau YP, Yang PC and Kuo ML. (2004). *J. Natl. Cancer Inst.*, **96**, 364–375.
- Cheung B, Hocker JE, Smith SA, Norris MD, Haber M and Marshall GM. (1998). *Oncogene*, **17**, 751–759.
- Choi MC, Jong HS, Kim TY, Song SH, Lee DS, Lee JW, Kim NK and Bang YJ. (2004). *Oncogene*, **23**, 7095–7103.
- Farias EF, Arapshian A, Bleiweiss IJ, Waxman S, Zelent A and Mira YLR. (2002). *Cell Growth Differ.*, **13**, 335–341.
- Fleischer A, Aylon V, Dumoutier L, Renaud JC and Rebollo A. (2002). *Oncogene*, **21**, 3181–3189.
- Freemantle SJ, Kerley JS, Olsen SL, Gross RH and Spinella MJ. (2002). *Oncogene*, **21**, 2880–2889.
- Freemantle SJ, Spinella MJ and Dmitrovsky E. (2003). *Oncogene*, **22**, 7305–7315.
- Gonzalez AM, Gonzales M, Herron GS, Nagavarapu U, Hopkinson SB, Tsuruta D and Jones JC. (2002). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 16075–16080.
- Imai S, Okuno M, Moriwaki H, Muto Y, Murakami K, Shudo K, Suzuki Y and Kojima S. (1997). *FEBS Lett.*, **411**, 102–106.
- Jin H and Varner J. (2004). *Br. J. Cancer*, **90**, 561–565.
- Kansra S, Ewton DZ, Wang J and Friedman E. (2000). *Int. J. Cancer*, **87**, 373–378.
- Kastner P, Mark M, Ghyselinck N, Krezel W, Dupe V, Grondona JM and Chambon P. (1997). *Development*, **124**, 313–326.
- Kedishvili NY, Chumakova OV, Chetyrkin SV, Belyaeva OV, Lapshina EA, Lin DW, Matsumura M and Nelson PS. (2002). *J. Biol. Chem.*, **277**, 28909–28915.
- Koliopanos A, Friess H, di Mola FF, Tang WH, Kubulus D, Brigstock D, Zimmermann A and Buchler MW. (2002). *World J. Surg.*, **26**, 420–427.
- Li P, Gao Y, Ji Z, Zhang X, Xu Q, Li G, Guo Z, Zheng B and Guo X. (2004). *J. Pediatr. Surg.*, **39**, 1512–1519.
- Lobbert RW, Klemm G, Gruttmann HP, Harms D, Winterpacht A and Zabel BU. (1998). *Genes Chromosomes Cancer*, **21**, 347–350.
- Pendaries V, Verrecchia F, Michel S and Mauviel A. (2003). *Oncogene*, **22**, 8212–8220.
- Petridou E, Skalkidou A, Dessypris N, Moustaki M, Mantzoros C, Spanos E and Trichopoulos D. (2001). *Oncology*, **60**, 252–257.
- Reynolds CP, Kane DJ, Einhorn PA, Matthay KK, Crouse VL, Wilbur JR, Shurin SB and Seeger RC. (1991). *Prog. Clin. Biol. Res.*, **366**, 203–211.
- Reynolds CP, Matthay KK, Villablanca JG and Maurer BJ. (2003). *Cancer Lett.*, **197**, 185–192.
- Ross SA, McCaffery PJ, Drager UC and De Luca LM. (2000). *Physiol. Rev.*, **80**, 1021–1054.
- Salmivirta K, Talts JF, Olsson M, Sasaki T, Timpl R and Ekblom P. (2002). *Exp. Cell Res.*, **279**, 188–201.
- Shyu RY, Jiang SY, Chou JM, Shih YL, Lee MS, Yu JC, Chao PC, Hsu YJ and Jao SW. (2003). *Br. J. Cancer*, **89**, 146–151.
- Sriuranpong V, Mutirangura A, Gillespie JW, Patel V, Amornphimoltham P, Molinolo AA, Kerekhanjanarong V, Supanakorn S, Supiyaphun P, Rangdaeng S, Voravud N and Gutkind JS. (2004). *Clin. Cancer Res.*, **10**, 4944–4958.
- Urbanowicz-Kachnowicz I, Baghdassarian N, Nakache C, Gracia D, Mekki Y, Bryon PA and Ffrench M. (1999). *Int. J. Cancer*, **82**, 98–104.
- Xie D, Yin D, Wang HJ, Liu GT, Elashoff R, Black K and Koeffler HP. (2004). *Clin. Cancer Res.*, **10**, 2072–2081.
- Xie W, Mertens JC, Reiss DJ, Rimm DL, Camp RL, Haffty BG and Reiss M. (2002). *Cancer Res.*, **62**, 497–505.
- Xie W, Rimm DL, Lin Y, Shih WJ and Reiss M. (2003). *Cancer J.*, **9**, 302–312.
- Yuan BZ, Zhou X, Durkin ME, Zimonjic DB, Gumundsdottir K, Eyrjord JE, Thorgerisson SS and Popescu NC. (2003). *Oncogene*, **22**, 445–450.
- Zirn B, Wittmann S, Graf N and Gessler M. (2005). *Cancer Lett.*, **220**, 115–120.

Supplementary information accompanies the paper on Oncogene website (<http://www.nature.com/onc>)

Publikation 3

Target genes of the WNT/ β -catenin pathway in Wilms tumors

Zirn B¹, Samans B², Wittmann S¹, Pietsch T³, Leuschner I⁴, Graf N⁵, Gessler M¹.

¹Physiological Chemistry I, Biozentrum, University of Wuerzburg, Germany

²Institute of Molecular Biology and Tumor Research (IMT), University of Marburg, Germany

³Institute of Neuropathology, University of Bonn, Germany

⁴Institute of Paidopathology, University of Kiel, Germany

⁵ Children's Hospital, Department of Paediatric Oncology and Haematology, University of the Saarland, Germany

Genes Chromosomes Cancer, 45(6):565-74 (2006).

Target Genes of the WNT/β-Catenin Pathway in Wilms Tumors

Birgit Zirn,¹ Birgit Samans,² Stefanie Wittmann,¹ Thorsten Pietsch,³ Ivo Leuschner,⁴ Norbert Graf,⁵ and Manfred Gessler^{1*}

¹Physiological Chemistry I, Biozentrum, University of Wuerzburg, Germany

²Institute of Molecular Biology and Tumor Research (IMT), University of Marburg, Germany

³Institute of Neuropathology, University of Bonn, Germany

⁴Institute of Paedopathology, University of Kiel, Germany

⁵Children's Hospital, Department of Paediatric Oncology and Haematology, University of the Saarland, Germany

The WNT/β-catenin pathway is involved in numerous human cancers. Mutations of the *CTNNB1* (β-catenin) gene have also been detected in a subset of pediatric Wilms tumors, but the target genes of the deregulated WNT/β-catenin pathway in these tumors have yet to be identified. To compare gene expression profiles of Wilms tumors with and without mutations of *CTNNB1*, we used 11.5-k cDNA microarrays. Most of the tumors (86%) had received preoperative chemotherapy as mandated by the European SIOP protocol. The comparison between Wilms tumors with and without *CTNNB1* mutations revealed several target genes specifically deregulated in *CTNNB1*-mutated Wilms tumors. Among these, *PITX2*, *APCDD1*, and two members of the endothelin axis (*EDN3* and *EDNRA*) are directly activated downstream targets of the WNT/β-catenin pathway that may enhance proliferation of these tumor cells. In addition, several upstream inhibitors of WNT/β-catenin signaling like *WIF1* and *PRDC* were also strongly up-regulated in the *CTNNB1*-mutated Wilms tumors. This overexpression may be a negative feedback mechanism in tumors with uncontrolled WNT signaling. Moreover, we identified deregulated genes in both the retinoic acid and the RAS pathways, such as *ATX/ENPP2* and *RIS1*, suggesting an association between these two pathways with that of WNT. In addition, the strong representation of muscle-related genes in the expression profile of *CTNNB1*-mutated Wilms tumors corresponded to histologically detectable areas of myomatous cells in these tumors that displayed intense and preferential nuclear β-catenin antibody staining. This article contains Supplementary Material available at <http://www.interscience.wiley.com/jpages/1045-2257/suppmat>. © 2006 Wiley-Liss, Inc.

INTRODUCTION

Wilms tumor is one of the most frequent pediatric solid tumor malignancies, affecting 1 in 10,000 children. It arises from an embryonal blastema and most frequently presents as a unilateral and sporadic tumor. Mutations of the *WT1* and *CTNNB1* genes are known to be involved in a subset of Wilms tumors, but in most cases the genetic etiology is still unclear.

The Wilms tumor gene 1 (*WT1*) is essential for normal genitourinary development (Kreidberg et al., 1993). Inactivating *WT1* mutations have been observed in only 10–15% of Wilms tumors (Gessler et al., 1994; Huff, 1998), however. Approximately the same percentage of Wilms tumors harbors mutations in *CTNNB1*, and both types of mutations often occur in combination (Koesters et al., 1999; Maiti et al., 2000).

β-Catenin is involved both in intercellular adhesion by forming a complex with cadherins and in WNT signal transduction to the nucleus. Activation of the WNT pathway inhibits β-catenin phosphorylation by GSK3. Nonphosphorylated β-catenin is protected from degradation and translocates to the

nucleus, where it forms a complex with transcription factors of the TCF/LEF family to regulate transcription of target genes (He et al., 1998; Tetsu and McCormick, 1999). Mutations, especially of exon 3 of the *CTNNB1* gene, render the protein refractory to phosphorylation and subsequent targeted degradation, resulting in accumulation in the nucleus and the inappropriate activation of downstream target genes (Morin et al., 1997; Rubinfeld et al., 1997). The list of putative target genes of WNT/β-catenin signaling through TCF binding sites comprises more than 40 genes including *MYC*, *CCND*, *PITX2*, and *ECAD* (see WNT Web site, <http://www.stanford.edu/~rnusse/Wntwindow.html>).

Supported by: DFG-Graduiertenkolleg 639; BMBF “Kompetenznetz für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie”, Sander Stiftung and parent donations.

*Correspondence to: Professor Manfred Gessler, Theodor-Boveri-Institute, Physiological Chemistry I, Biocenter, University of Wuerzburg, Am Hubland, 97074 Wuerzburg, Germany.
E-mail: gessler@biozentrum.uni-wuerzburg.de

Received 24 November 2005; Accepted 17 January 2006

DOI 10.1002/gcc.20319

Published online 21 February 2006 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

The aim of our study was to identify the putative targets of WNT/β-catenin signaling that are specifically deregulated in Wilms tumors with activating *CTNNB1* mutations. We used cDNA microarrays to compare expression profiles of Wilms tumors with and without *CTNNB1* mutations, and we identified several strongly deregulated genes involved in WNT/β-catenin signaling.

MATERIALS AND METHODS

CTNNB1 and *WT1* Mutation Analysis

The *CTNNB1* gene was assessed for deletions or mutations of exon 3 in 73 primary Wilms tumors from the German SIOP/GPOH 93-01 Wilms tumor study. The majority of these tumors had been treated by chemotherapy before surgery (all tumors with *CTNNB1* mutation and 54 of 64 tumors without *CTNNB1* mutation). The entire region from exons 2 to 4 was amplified using primers b-catenin-ex2 (TGAAAATCCAGCGTGGACAATG) and b-catenin-ex4r (GATTGCACGTGTGGCAAGTTCT) and was assayed for shortened fragments on agarose gels. Exon 3 was directly sequenced on a Beckman CEQ2000 system with primer b-catenin-in3r (TCTGACTTT-CAGTAAGGCAATGAA). *WT1* mutation analyses were conducted in 64 Wilms tumors using either single-strand conformational polymorphism (SSCP) or denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC), followed by sequencing of the exons, yielding variant SSCP or DHPLC profiles as described previously (Zirn et al., 2004). At least 8 of 10 exons could be evaluated in most of these tumors.

Microarray Expression Analysis

RNA isolation and amplification, cDNA synthesis and labeling, and hybridization of the cDNA microarrays were performed as described previously (Zirn et al., 2005a). All the raw data are available as MIAMExpress submission A-MEXP-221 (<http://www.ebi.ac.uk/miamexpress>). The standardization and quality control procedures are also detailed in Zirn et al. (2005a). Briefly, spatial, intensity-dependent standardization was carried out, and mean log ratios were calculated from replicates. The final data matrix consisted of 11,552 expression measurements (log₂ ratios) for 73 primary Wilms tumors. To compare the expression profiles of the two independent groups (tumors with and without *CTNNB1* mutations), the two-sample Welch *t* statistic was used. In addition, fold change analysis of the tumors according to *CTNNB1* mutation status was performed in order to rank the genes.

Real-Time RT-PCR

Real-time PCR reactions were performed on all original Wilms tumor samples with *CTNNB1* mutations and on 60 of 65 samples without *CTNNB1* mutations, applying protocols previously described (Zirn et al., 2005b).

Analysis of Overrepresented Genes and Gene Categories on Gene Lists by EASE

EASE (Expression Analysis Systematic Explorer) is a software application that automates the process of determining biological themes. EASE calculates overrepresentation of certain genes in a given list of deregulated genes relative to the total number of genes assayed. The statistical measure of overrepresentation is the EASE score, which has been shown to reliably identify most robust categories of differentially regulated groups of genes (EASE score < 0.05; Hosack et al., 2003).

Immunohistochemistry

β-Catenin staining was performed in 47 of 73 Wilms tumors that had been assessed by expression profiling as previously described (Koch et al., 1999). Briefly, sections from formalin-fixed, paraffin-embedded tumor tissue were deparaffinized, incubated in a blocking solution, and stained with a monoclonal anti-β-catenin antibody. Staining was separately evaluated for different histological cell types (blastemal, stromal, epithelial, and myomatous cells) as well as for different cell compartments (membranous, nuclear, and cytoplasmic staining). Tumor samples were classified according to percentage of stained cells into one of four categories: (1) no staining; (2) low-grade staining: < 20%; (3) medium-grade staining: 20–60%; (4) high-grade staining: > 60%.

RESULTS AND DISCUSSION

CTNNB1 mutations were detected in 8 of 73 primary Wilms tumors. All eight mutations occurred in codon 45 of the *CTNNB1* gene, which has been described as a highly specific target site (Kusafuka et al., 2002). Of the eight mutations, four were deletions of the serine codon, and four led to missense mutations by substitution of serine by phenylalanine or cysteine in position 45 of the *CTNNB1* gene (Table 1).

To search for new target genes of the WNT pathway specifically deregulated in Wilms tumors with *CTNNB1* mutations, we compared expression profiles of these tumors with expression in tumors without *CTNNB1* mutations. We established candi-

TABLE I. Mutations in *CTNNB1* and *WT1*

Tumor sample	<i>CTNNB1</i> mutation	Allele status	<i>WT1</i> mutation	Mutation type	Allele status	Histology
WS-195	S45F	Heterozygous	no			Triphasic
WS-230	S45del	Heterozygous	no			Stromal
WS-246	S45del	Heterozygous	no			Stromal
WS-275	S45F	Heterozygous	no			Triphasic
WS-300	S45C	Heterozygous	no			Stromal
WS-31	S45del	Homozygous	946_1G>T (exon 3)	Splice site mutation	Homozygous	Stromal
WS-208	S45del	Heterozygous	1373_1391dup19nt (exon 7)	Frameshift	Heterozygous	Stromal
WS-258	S45F	Heterozygous	548delG (exon 1)	Frameshift	Heterozygous	Stromal
WS-104	No		Q298Stop (exon 6)	Truncating mutation	Heterozygous	Regressive
WS-197	No		1677_1678delCG (exon 10)	Frameshift	Heterozygous	Stromal

All 73 Wilms tumors were assessed for mutations in *CTNNB1*. *WT1* was analyzed in 64 tumors (including all tumors with *CTNNB1* mutation).

date gene lists on the basis of combined selection criteria considering *t* statistics (> 1.96) and the magnitude of differences in expression (> 2 -fold). Altogether, 136 genes were selected by this exploratory approach (Table 2). Most of the identified target genes were up-regulated (90%), a fact that cannot be explained at the moment. When these results were replicated by real-time RT-PCR for five genes, all differences in expression were even greater than those calculated from the microarray data, which is likely a result of methodological differences and a higher dynamic range in the RT-PCR analysis (Fig. 1).

CTNNB1 mutations in Wilms tumors are frequently associated with mutations in the *WT1* gene (Maiti et al., 2000). To evaluate whether the expression pattern seen in *CTNNB1*-mutated Wilms tumors may be influenced by an accumulation of additional *WT1* mutations in this group, we analyzed the *WT1* gene in all the *CTNNB1*-mutated tumors and in most of the tumors without *CTNNB1* mutation (56 of 65). *WT1* gene mutations were found in five Wilms tumors (Table 1). These belonged to both the *CTNNB1*-mutated group (three *WT1* mutations) and the group of tumors without *CTNNB1* mutation (two *WT1* mutations). Udtha et al. (2003) analyzed differences in expression between Wilms tumors with and without *WT1* mutations. There was no overlap between the candidate genes in the *WT1*-mutated tumors identified by these authors and those on our candidate gene list in *CTNNB1*-mutated tumors. Specifically, there was no differential expression of the two proposed *WT1*-deregulated candidate genes, *MYC* and *EGR1*, in *CTNNB1*-mutated tumors (minimal down-regulation of 1.13 and 1.02, respectively). The differentially regulated genes detected in *CTNNB1*-

mutated Wilms tumors were therefore most probably not strongly influenced by concurrent *WT1* mutations.

Downstream Targets of Disrupted WNT Signaling in Wilms Tumorigenesis

Several of the identified genes specifically deregulated in Wilms tumors with *CTNNB1* mutations are either putative direct targets of WNT/β-catenin signaling or have a known interaction with the β-catenin/cadherin complex in cell adhesion. Strong differential regulation in *CTNNB1*-mutated Wilms tumors was detected for the transcription factor *PITX2* (5.4-fold up-regulation), which represents a direct target gene of the WNT/β-catenin pathway (Lin et al., 1999). *PITX2* was shown to be expressed in several tissues that are developmentally regulated by the WNT/β-catenin pathway, for example, kidney (Schubert et al., 2004), pituitary, and cardiac cells (Kioussi et al., 2002). It was suggested that *PITX2* induces cell-type-specific proliferation in WNT-dependent developmental processes (Kioussi et al., 2002), which may also apply to Wilms tumors with *CTNNB1* mutations.

APCDD1 is another direct target of the WNT/β-catenin signaling pathway that was strongly overexpressed in *CTNNB1*-mutated Wilms tumors (3.8-fold up-regulation). *APCDD1* was first identified in a screen for *APC*-inducible genes in colon cancer cells (Takahashi et al., 2002) and was shown to enhance proliferation of colon cancer cells in vitro. In addition, *APCDD1* is specifically up-regulated with progression of colon cancer in vivo (Takahashi et al., 2002). Its up-regulation in Wilms tumors with *CTNNB1* mutations may therefore also contribute to cell proliferation in these tumors.

TABLE 2. Differentially Regulated Genes in *CTNNB1*-Mutated Wilms Tumors

Symbol	Description	Fold change	up/down	abs (T)	GNF SymAtlas*
MYL2	myosin, light chain 2, regulatory, cardiac, slow	21.18	up	3.23	++
MB	myoglobin	12.53	up	3.56	++
ZDHHC2	zinc finger, DHHC domain containing 2	12.17	up	3.64	0
SMPX	small muscle protein, X-linked	11.53	up	3.04	++
MYH1	myosin heavy chain 1, skeletal muscle, adult	8.84	up	3.06	++
DPT	dermatopontin	8.50	up	4.16	0
STS	steroid sulfatase, arylsulfatase C, isozyme S	8.40	up	3.76	0
MYL3	myosin, light chain 3, alkali; ventricular, skeletal, slow	8.07	up	3.63	++
TNNI1	troponin I, skeletal, slow	8.00	up	3.50	++
TPM1	tropomyosin 1 (alpha)	7.42	up	3.17	++
CASQ2	calsequestrin 2 (cardiac muscle)	6.59	up	2.99	++
CKMT2	creatine kinase, mitochondrial 2 (sarcomeric)	5.96	up	4.20	++
LOC92346	LOC92346	5.78	up	3.36	0
PITX2	paired-like homeodomain transcription factor 2	5.38	up	3.31	0
MGC2744	hypothetical protein MGC2744	5.07	up	3.19	0
FRCP2	fibronectin type III repeat containing protein 2	4.83	up	3.11	n.a.
SGCA	sarcoglycan, alpha	4.81	up	2.89	++
ZNF207	zinc finger protein 207	4.81	up	4.13	+
H11	protein kinase H11	4.74	up	2.96	+
AMPD1	adenosine monophosphate deaminase 1	4.50	up	2.55	++
TNNI2	troponin I, skeletal, fast	4.48	up	3.10	++
FABP7	fatty acid binding protein 7, brain	4.47	up	2.36	0
WIFI	WNT inhibitory factor 1	4.41	up	3.68	0
FLJ12921	hypothetical protein FLJ12921	4.36	up	2.86	++
NNAT	neuronatin	4.31	up	2.75	0
KLK6	kallikrein 6 (neurosin, zyme)	4.25	down	3.56	0
MLC1SA	myosin light chain 1 slow a	4.08	up	3.75	+
CYP2J2	cytochrome P450 family	4.05	up	3.74	+
HSA243396	voltage-gated sodium channel beta-3 subunit	3.92	up	2.55	0
MEG3	maternally expressed 3	3.89	up	2.52	0
MGC2628	hypothetical protein MGC2628	3.88	up	3.72	+
APCDD1	adenomatosis polyposis coli down-regulated 1	3.78	up	2.50	0
TBX15	T-box 15	3.67	up	2.04	+
EDN3	endothelin 3	3.60	up	3.93	0
ITGB1BP2	integrin beta 1-binding protein (melusin) 2	3.59	up	2.83	++
CCL18	chemokine (C—C motif) ligand 18	3.44	down	2.48	0
CACNB1	calcium channel, voltage-dependent, beta 1	3.43	up	3.10	++
HSA243396	voltage-gated sodium channel beta-3 subunit	3.27	up	2.42	0
ITM2A	integral membrane protein 2A	3.22	up	2.39	0
ACTG2	actin, gamma 2, smooth muscle, enteric	3.22	up	3.09	0
HSPB2	heat shock 27kDa protein 2	3.22	up	3.57	++
MBNL1	muscleblind-like (<i>Drosophila</i>)	3.21	up	3.16	n.a.
T40668	ya08c10.s1 Stratagene placenta	3.18	up	2.10	n.a.
N30117	EST	3.16	up	4.15	n.a.
CAPN6	calpain 6	3.13	up	3.43	0
N73916	za62g06.s1 Soares fetal liver spleen INFLS	3.10	up	2.81	n.a.
AA176491	zp33d12.s1 Stratagene muscle	3.08	up	3.22	n.a.
MGC29643	hypothetical protein MGC29643	2.98	down	3.06	0
AL137588	hypothetical protein DKFZp434K1210	2.98	up	3.27	0
R25665	EST	2.97	up	2.23	n.a.
LM07	LIM domain only 7	2.96	up	4.31	+
FHL1	four and a half LIM domains 1	2.96	up	2.55	++
COL15A1	collagen, type XV, alpha 1	2.91	up	2.86	0
SLC25A1	solute carrier family 25, member 1	2.85	up	2.27	0
NDUFB6	NADH dehydrogenase 1 beta subcomplex, 6	2.83	up	2.48	0
CRYM	crystallin, mu	2.80	up	3.39	+
NRAP	nebulin-related anchoring protein	2.80	up	2.44	+
SC4MOL	sterol-C4-methyl oxidase-like	2.79	up	3.35	0
NOPE	likely ortholog of mouse neighbor of Punc E1 I	2.73	up	2.04	0

(Continued)

TABLE 2. Differentially Regulated Genes in *CTNNB1*-Mutated Wilms Tumors (Continued)

Symbol	Description	Fold change	up/down	abs (T)	GNF SymAtlas*
STE	sulfotransferase, estrogen-preferring	2.71	up	4.34	++
BIN1	bridging integrator 1	2.70	up	3.06	+
EDNRA	endothelin receptor type A	2.67	up	2.61	0
EMP2	epithelial membrane protein 2	2.66	up	3.08	0
NEO1	neogenin homolog 1 (chicken)	2.66	up	3.42	0
H17038	<i>Homo sapiens</i> cDNA FLJ25076 fis	2.63	up	3.69	n.a.
EGFL6	EGF-like-domain, multiple 6	2.62	up	2.44	0
COL1A2	collagen, type I, alpha 2	2.60	up	1.98	+
PRDC	protein related to DAN and cerberus	2.55	up	3.29	+
ADRA2A	adrenergic, alpha-2A-, receptor	2.55	up	5.40	0
TM4SF2	transmembrane 4 superfamily member 2	2.49	up	3.69	0
ENPP2	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2 (autotaxin)	2.49	up	6.23	0
TREM2	triggering receptor expr. on myeloid cells 2	2.48	down	6.07	0
SPARCL1	SPARC-like 1 (mast9, hevin)	2.48	up	2.55	0
P29	GCIP-interacting protein p29	2.48	up	3.74	0
T57920	<i>Homo sapiens</i> mRNA from 5q31–33 region	2.46	up	2.63	n.a.
AA400047	EST	2.45	down	5.16	n.a.
LOC51760	B/K protein	2.45	up	3.32	0
N92646	yz80b09.s1 Soares_multiple_sclerosis_2NbHMSP	2.44	down	3.58	n.a.
AA404293	zv63g08.s1 Soares_total_fetus_Nb2HF8_9w	2.43	up	3.29	n.a.
H24359	EST	2.43	up	3.75	n.a.
FABP3	fatty acid-binding protein 3, muscle and heart	2.40	up	3.09	++
CPA3	carboxypeptidase A3 (mast cell)	2.39	up	2.97	0
ALI17562	DKFZP566C134 protein	2.38	up	2.67	0
LOC221143	hypothetical protein LOC221143	2.38	up	2.06	0
PAX8	paired box gene 8	2.38	down	2.27	0
IGFBP3	insulin-like growth factor binding protein 3	2.36	up	4.13	+
FBLN1	fibulin 1	2.33	up	3.95	0
LOC115286	hypothetical protein LOC115286	2.32	up	2.30	n.a.
W02677	EST	2.31	up	2.06	n.a.
N31901	EST	2.28	up	2.63	n.a.
F10	coagulation factor X	2.28	up	5.00	0
PRKCQ	protein kinase C, theta	2.27	up	3.59	0
SRPX	sushi-repeat-containing protein	2.23	up	2.55	++
ELN	elastin	2.23	up	2.14	0
CACNG1	calcium channel, voltage-dependent, gamma 1	2.20	up	2.11	++
NRNI	neuritin 1	2.19	up	3.34	0
BCMPI	brain cell membrane protein 1	2.19	up	2.86	0
TNNT2	troponin T2, cardiac	2.18	up	2.23	++
KIAA1913	KIAA1913 protein	2.18	up	3.64	n.a.
C6orf37	chromosome 6 open reading frame 37	2.18	up	6.73	0
Ells1	hypothetical protein Ells1	2.18	up	3.29	0
ALDH1AI	aldehyde dehydrogenase 1 family, member A1	2.18	up	2.53	0
P37NB	37 kDa leucine-rich repeat (LRR) protein	2.17	up	2.17	++
FBXO32	F-box only protein 32	2.16	up	2.43	+
GPM6B	glycoprotein M6B	2.14	up	4.53	0
COL9A3	collagen, type IX, alpha 3	2.14	up	2.71	0
CDC20	CDC20 cell division cycle 20 homolog	2.13	up	2.34	0
SEMA6C	semaphorin 6C	2.13	up	2.44	0
AA041482	EST	2.13	up	2.26	n.a.
ARPC2	actin-related protein 2/3 complex, subunit 2	2.12	down	2.90	0
AA056013	zf22e03.s1 Soares_fetal_heart_NbHH19W	2.12	up	2.07	n.a.
SNCA	synuclein, alpha	2.11	down	3.60	0
GSTTI	glutathione S-transferase theta 1	2.10	up	3.01	0
HIST1H1C	histone 1, H1c	2.09	up	2.36	0
IRX3	iroquois homeobox protein 3	2.09	up	3.19	0
H16733	ESTs	2.08	up	2.23	n.a.
ZD52F10	hypothetical gene ZD52F10	2.08	down	2.46	0
PGAM2	phosphoglycerate mutase 2 (muscle)	2.08	up	3.17	++

(Continued)

TABLE 2. Differentially Regulated Genes in *CTNNB1*-Mutated Wilms Tumors (Continued)

Symbol	Description	Fold change	up/down	abs (T)	GNF SymAtlas*
CCL4	chemokine (C—C motif) ligand 4	2.07	down	2.10	0
RISI	Ras-induced senescence I	2.06	up	2.17	0
RAB9B	RAB9B, member RAS oncogene family	2.06	up	2.43	n.a.
CRYAB	crystallin, alpha B	2.06	up	2.96	++
AA504891	<i>Homo sapiens</i> cDNA FLJ37412 fis	2.06	up	2.94	n.a.
PLA2G7	phospholipase A2, group VII	2.05	down	3.56	0
MATN2	matrilin 2	2.05	up	3.07	n.a.
AA013244	EST	2.04	up	2.28	n.a.
C6orf37	chromosome 6 open-reading frame 37	2.04	up	5.45	0
C1orf17	chromosome 1 open-reading frame 17	2.04	up	2.58	0
CDH2	cadherin 2, type I, N-cadherin (neuronal)	2.04	down	4.00	++
MGC23937	hypothetical protein MGC23937	2.03	up	2.48	0
H17336	<i>Homo sapiens</i> mRNA; cDNA DKFZp586C1723	2.02	up	2.99	n.a.
IGFBP5	insulin-like growth factor binding protein 5	2.02	up	3.67	0
HIST2H2BE	histone 2, H2be	2.02	up	2.75	0
AKR1C1	aldo-keto reductase family 1, member C1	2.01	up	3.48	0
CTSB	cathepsin B	2.01	down	4.16	0
FMO1	flavin-containing monooxygenase 1	2.00	up	3.53	0

Selected were 136 genes with a fold change > 2 and an absolute value of the t statistic [abs(T)] > 1.96. Genes previously described as targets of WNT/β-catenin signaling are highlighted in bold type.

*All genes were analyzed for muscle-specific overexpression using the SymAtlas v1.0.1 (<http://symatlas.gnf.org/SymAtlas/>) expression database (++ very high; + relatively high; 0, no muscle-specific expression; n.a., not available in SymAtlas database).

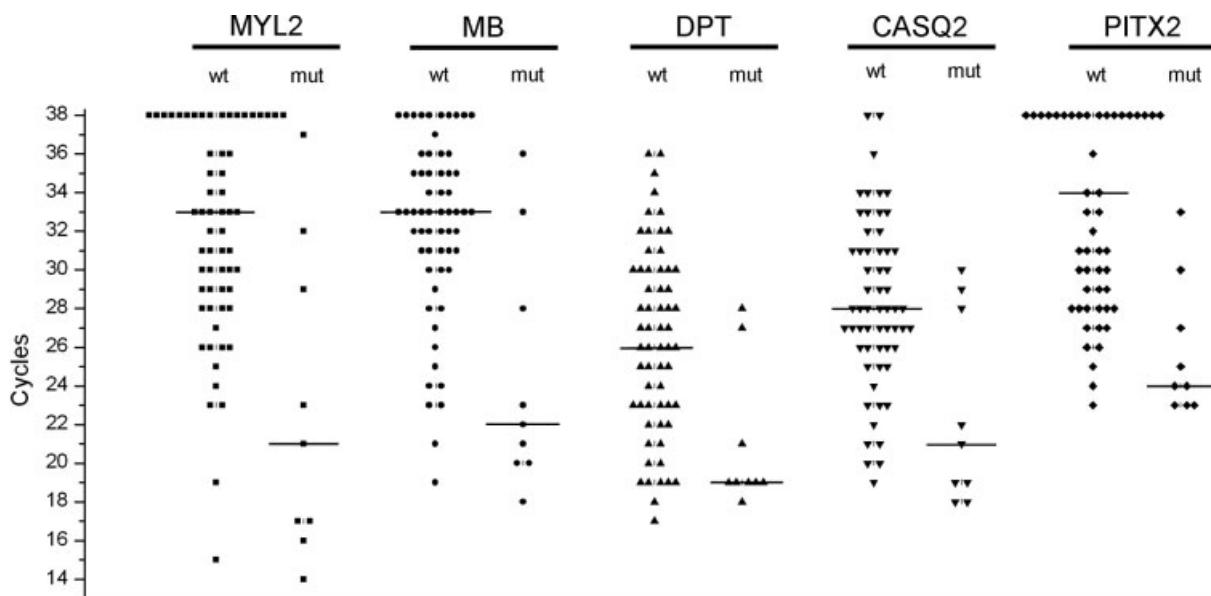


Figure 1. Comparison of changes in the magnitude of gene expression between Wilms tumors with and without *CTNNB1* mutations as measured by real-time RT-PCR analysis. The genes selected were differentially expressed by microarray analysis and were then assessed by quantitative PCR in the same tumors. Genes are shown in order of decreasing magnitude of change as listed in Table 2. RNA for real-time

PCR analysis was available for all eight tumors with *CTNNB1* mutations and for 60 of 65 tumors without *CTNNB1* mutation. Every tumor is represented by a single dot, and expression is graphed in PCR cycles (ct values) when reactions reached threshold levels. All expression levels were normalized on the basis of values obtained for the housekeeping gene *HPRT*. Median expression in each group is indicated by a horizontal line.

Furthermore, *EDN3* (endothelin 3) and its receptor, *EDNRA*, were up-regulated in *CTNNB1*-mutated Wilms tumors. *EDN3* promotes cell proliferation and invasion in melanoma and Kaposi's sarcoma. In ovarian carcinoma, *EDN3* has been identified in a screen for WNT/β-catenin-induced genes. In addition, *EDNRA* plays a major role in cancer progres-

sion and has therefore been proposed as a novel target for anticancer therapy (Carducci et al., 2003).

In addition to its role in the WNT signaling pathway, β-catenin also interacts with members of the cadherin family and thereby stabilizes intercellular adhesion. We found N-cadherin (*CDH2*) to be down-regulated in *CTNNB1*-mutated Wilms tumors

compared to in tumors without mutations, suggesting that *CTNNB1* mutations may also alter cellular adhesion properties.

Taken together, we identified several known WNT target genes specifically up-regulated in Wilms tumors with *CTNNB1* mutations. These genes may synergistically contribute to cell proliferation in tumorigenesis in Wilms tumors with activated WNT/β-catenin signaling.

Secreted Upstream Antagonists of the WNT Signaling Pathway

WNT antagonists can be divided into two functional classes: the SFRP class and the Dickkopf class. Members of the SFRP class, which include the SFRP (secreted Frizzled-related protein) family, *WIF1* (WNT inhibitory factor 1), and *CER* (Cerberus), directly bind to WNT proteins and thereby prevent their activating the WNT pathway. Members of the Dickkopf class antagonize WNT signaling by direct interaction with the WNT receptor complex (Kawano and Kypta, 2003).

DKK1 (Dickkopf-1) was previously shown to be expressed in Wilms tumors of unknown *CTNNB1* mutation status (Wirths et al., 2003), but our study did not indicate a specific differential expression in Wilms tumors with *CTNNB1* mutation. In contrast, two members of the SFRP class were found to be differentially regulated in our *CTNNB1*-mutated Wilms tumors: *WIF1* and *PRDC*.

Both genes have previously been directly implicated in tumorigenesis: *WIF1* was found to be down-regulated in several cancer types, for example, prostate, breast and lung cancer (Wissmann et al., 2003), whereas overexpression of *PRDC* was shown to inhibit tumorigenesis (Chen et al., 2002). Interestingly, both genes were up-regulated in Wilms tumors with *CTNNB1* mutations and thereby may counteract WNT signaling.

WIF1 was also found to be overexpressed in a series of Wilms tumors with *WT1* mutations, more than half of which carried concomitant *CTNNB1* mutations (Li et al., 2004). In addition, several other genes were concordantly identified in both our study and a study by Li et al. (2004): overexpression in *CTNNB1*-mutated tumors was found for *COL9A3*, whereas *KLK6* and *PAX8* were underexpressed in both studies. The differential regulation of these genes occurred independently of the difference in treatment of tumors—preoperative chemotherapy in our study and primary surgery in the Li et al. (2004) study. However, the difference in treatment protocols between Europe and North America may also

account for other deregulated genes being found in only one of the studies.

In summary, two groups of genes are overexpressed in *CTNNB1*-mutated Wilms tumors: first, downstream target genes of β-catenin, for example, *PITX2*, *APCDD1*, *EDN3* and *EDNRA*, and, second, upstream components of the WNT pathway, for example, *WIF1* and *PRDC*. The first group of activated target genes conveys enhanced WNT signaling, whereas the second group of secreted antagonists inhibits the WNT pathway. Overexpression of the latter may be a consequence of uncontrolled WNT signaling and represent a negative (but ineffective) feedback mechanism in Wilms tumors with activating *CTNNB1* mutations (Fig. 2).

Interestingly, several prominent components of the WNT/β-catenin cascade were not differentially expressed. We specifically analyzed differences in expression in *APC*, *CCND1-3*, *DVL2* and *3*, *FZD1,4* and *8*, *GSK3B*, *JUN*, *V-MYC*, *PSEN1*, *ROCK1*, *SMAD2* and *3*, and *WNT2,4* and *5B* but found none (there was less than a 1.2-fold change in the up- or down-regulation of all genes). EASE analysis showed that the genes of the WNT/β-catenin pathway were not significantly overrepresented on our candidate list (EASE score > 0.05). However, 11 genes on our list of 136 deregulated genes had been previously described as targets of the WNT/β-catenin pathway (Table 2). Assuming there are about 50 known WNT/β-catenin targets, not all of which were on our 11.5-k microarray, the 11 WNT/β-catenin candidates detected would be a rather high proportion of all deregulated genes.

Crosstalk with Other Signaling Pathways

There is increasing evidence that the WNT/β-catenin signaling pathway also interacts with other signaling systems. A mode of cross regulation was revealed by the discovery that retinoids inhibit β-catenin-dependent gene transcription (Easwaran et al., 1999). Tice et al. (2002) searched for genes selectively up-regulated by a combination of both the WNT/β-catenin and the retinoic acid pathways. *ATX/ENPP2*, which had been identified with this approach, was also 5.6-fold up-regulated in the *CTNNB1*-mutated Wilms tumors. *ATX/ENPP2* is a secreted tumor motility-promoting factor with lysophospholipase D activity whose overexpression is closely linked to the invasiveness of cancer cells (Moolenaar et al., 2004). In our previous microarray screening for genes associated with Wilms tumor progression, *ATX/ENPP2* was up-regulated in those tumors that later relapsed. In addition, several other genes induced by retinoic acid signaling overlapped

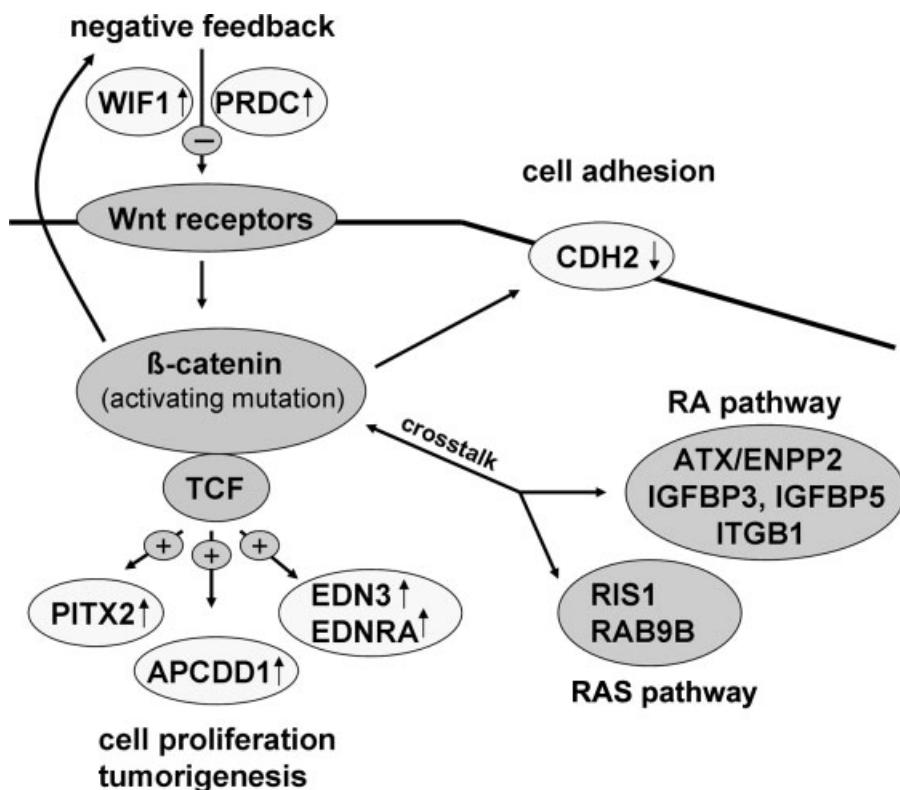


Figure 2. Putative deregulated WNT target genes in *CTNNB1*-mutated Wilms tumors. Mutated β -catenin is refractory to degradation and inappropriately activates downstream target genes such as *PITX2*, *APCDD1*, and members of the endothelin axis. The putative upstream regulatory genes *WIF1* and *PRDC* may be induced by uncontrolled WNT signaling and represent a negative feedback mechanism in Wilms tumors with activating *CTNNB1* mutations. Several differentially regulated genes, for example, *CDH2* and *FRCP2*, are involved in intercellular adhesion. There is additional evidence for crosstalk between the WNT/ β -catenin pathway and other signaling cascades, for example, the retinoic acid and the RAS pathways.

with differentially regulated genes in the *CTNNB1*-mutated Wilms tumors, for example, *IGFBP3* and *IGFBP5* (Zirn et al., 2005b).

Furthermore, interaction between the WNT/ β -catenin and the RAS pathways was recently described (Zhang et al., 2001). Involvement of RAS signaling may also occur in Wilms tumors with activating *CTNNB1* mutations because two members of the Ras superfamily, *RAB9B* and *RIS1*, were found to be up-regulated. *RIS1* (*Ras*-induced senescence 1) was recently isolated in a screen for genes specifically up-regulated in *Ras*-senescent human fibroblasts (Barradas et al., 2002). It has been proposed that this is a tumor-suppressor gene. The function of *RAB9B* has not been specifically analyzed to date.

Differential Regulation of Muscle-Related Genes in *CTNNB1*-Mutated Wilms Tumors

Muscle-related genes, for example, myoglobin or myosin light and heavy chains, were predominant among the candidate genes with the highest differential regulation in the *CTNNB1*-mutated Wilms tumors (compare Table 2). This was even more pronounced when differential expression was verified by real-time RT-PCR (Fig. 1). Although there was no strict separation of mutated tumors,

nevertheless, in some cases, median expression differed by orders of magnitude. Li et al. (2004) also found a number of muscle-related genes up-regulated in *CTNNB1/WT1*-mutated Wilms tumors. Interestingly, the genes identified in their study, *MEOX2*, *LBX1*, and *HOX7*, encode myogenic transcription factors with rather early functions in muscle differentiation. In contrast, the genes identified as deregulated in our study, troponins and myosins, are involved in the later stages of muscle differentiation and function. These differences in the predominant stage of muscle differentiation may be related to the difference in the treatment protocols used in North America (primary surgery) and Europe (chemotherapy before surgery). We hypothesize that preoperative chemotherapy may promote terminal differentiation processes of muscle tissue, thus leading to a high proportion of differentially regulated genes involved in later stages of muscle development and function.

We performed β -catenin staining in 47 of 73 Wilms tumors to explore whether this expression pattern corresponds to histological and immunohistochemical parameters. These 47 tumors included 41 of 65 tumors without *CTNNB1* mutation and 6 of 8 *CTNNB1*-mutated Wilms tumors. Examples are shown in Supplementary Figure 1 (Supplementary material

for this article can be found at <http://www.interscience.wiley.com/jpages/1045-2257/suppmat>). Interestingly, tumors with predominantly stromal histology displayed a high proportion of areas with myomatous differentiation and medium- or high-grade staining for nuclear β-catenin. This pattern was seen not only in *CTNNB1*-mutated Wilms tumors but also in all three stromal tumors without *CTNNB1* mutation. Therefore, the presence of myomatous areas may be related to stromal histology independent of *CTNNB1* mutation status. However, up-regulation of muscle-related genes was stronger in stromal tumors with *CTNNB1* mutation than in tumors without *CTNNB1* mutation.

Predominance of areas with skeletal muscle differentiation also was described in a variant of Wilms tumors classified as fetal rhabdomyomatous nephroblastoma (FRN; Maes et al., 1999). This tumor entity has an overall good prognosis, although FRNs are frequently resistant to chemotherapy. Similar features were also observed in the Wilms tumors included in our study. Among tumors with *CTNNB1* mutation and myomatous differentiation, 63% (5 of 8) responded poorly to chemotherapy, with just a minor reduction in tumor volume (maximum decrease of 17%) or even an increase, whereas only 28% of tumors without *CTNNB1* mutation were poor responders (defined as reduction in tumor volume of < 50% after chemotherapy). Of the three stromal tumors without *CTNNB1* mutation, two responded well (> 50%), and one had a reduction of tumor volume of 39%. Moreover, all children with *CTNNB1*-mutated tumors survived and did not have tumor recurrence (compared to overall relapse and death rates of 18% and 11%, respectively). An association between stromal histology and myomatous differentiation has also been described in Wilms tumors with *WT1* mutations (Miyagawa et al., 1998; Schumacher et al., 2003). It will be interesting in the future to analyze larger cohorts to determine which of the interrelated features, *CTNNB1/WT1* mutations, stromal histology, or corresponding expression signatures are best suited to predict favorable outcome.

In summary, our study was a first attempt to detect genes specifically deregulated in *CTNNB1*-mutated Wilms tumors. In addition to putative downstream target genes that mainly aid cell proliferation, we also identified overexpressed upstream inhibitors of WNT signaling, indicative of a putative negative feedback mechanism in Wilms tumors with enhanced WNT/β-catenin signaling. There was additional evidence for crosstalk of the WNT/β-catenin cascade with other signaling systems such as

the retinoic acid and the RAS pathways. The strong dysregulation of muscle-specific genes corresponded to a high proportion of areas with myomatous differentiation and medium- or high-grade staining for β-catenin.

ACKNOWLEDGMENTS

This work is part of the PhD thesis of Birgit Zirn. We thank all participants of the GPOH/SIOP nephroblastoma study for providing tumor material.

REFERENCES

- Barradas M, Gonos ES, Zebedee Z, Koletas E, Petropoulou C, Delgado MD, Leon J, Hara E, Serrano M. 2002. Identification of a candidate tumor-suppressor gene specifically activated during Ras-induced senescence. *Exp Cell Res* 273:127–137.
- Carducci MA, Padley RJ, Breul J, Vogelzang NJ, Zonnenberg BA, Daliani DD, Schulman CC, Nabulsi AA, Humerickhouse RA, Weinberg MA, Schmitt JL, Nelson JB. 2003. Effect of endothelin-A receptor blockade with atrasentan on tumor progression in men with hormone-refractory prostate cancer: a randomized, phase II, placebo-controlled trial. *J Clin Oncol* 21:679–689.
- Chen B, Athanasiou M, Gu Q, Blair DG. 2002. Drm/Gremlin transcriptionally activates p21(Cip1) via a novel mechanism and inhibits neoplastic transformation. *Biochem Biophys Res Commun* 295:1135–1141.
- Easwaran V, Pishvaian M, Salimuddin , Byers S. 1999. Cross-regulation of beta-catenin-LEF/TCF and retinoid signaling pathways. *Curr Biol* 9:1415–1418.
- Gessler M, Konig A, Arden K, Grundy P, Orkin S, Sallan S, Peters C, Rytle S, Mandell J, Li F, et al. 1994. Infrequent mutation of the *WT1* gene in 77 Wilms' tumors. *Hum Mutat* 3:212–222.
- He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW. 1998. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* 281:1509–1512.
- Hosack DA, Dennis G Jr, Sherman BT, Lane HC, Lempicki RA. 2003. Identifying biological themes within lists of genes with EASE. *Genome Biol* 4:R70.
- Huff V. 1998. Wilms tumor genetics. *Am J Med Genet* 79:260–267.
- Kawano Y, Kypta R. 2003. Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. *J Cell Sci* 116:2627–2634.
- Kioussi C, Briata P, Baek SH, Rose DW, Hamblet NS, Herman T, Ohgi KA, Lin C, Gleiberman A, Wang J, Brault V, Ruiz-Lozano P, Nguyen HD, Kemler R, Glass CK, Wynshaw-Boris A, Rosenfeld MG. 2002. Identification of a Wnt/Dvl/beta-Catenin → Pitx2 pathway mediating cell-type-specific proliferation during development. *Cell* 111:673–685.
- Koch A, Denkhaus D, Albrecht S, Leuschner I, von Schweinitz D, Pietsch T. 1999. Childhood hepatoblastomas frequently carry a mutated degradation targeting box of the beta-catenin gene. *Cancer Res* 59:269–273.
- Koesters R, Ridder R, Kopp-Schneider A, Betts D, Adams V, Niggli F, Briner J, von Knebel Doeberitz M. 1999. Mutational activation of the beta-catenin proto-oncogene is a common event in the development of Wilms' tumors. *Cancer Res* 59:3880–3882.
- Kreidberg JA, Sariola H, Loring JM, Maeda M, Pelletier J, Housman D, Jaenisch R. 1993. WT1 is required for early kidney development. *Cell* 74:679–691.
- Kusafuka T, Miao J, Kuroda S, Udatu Y, Yoneda A. 2002. Codon 45 of the beta-catenin gene, a specific mutational target site of Wilms' tumor. *Int J Mol Med* 10:395–399.
- Li CM, Kim CE, Margolin AA, Guo M, Zhu J, Mason JM, Hensle TW, Murry VV, Grundy PE, Fearon ER, D'Agati V, Licht JD, Tycko B. 2004. *CTNNB1* mutations and overexpression of Wnt/beta-catenin target genes in *WT1*-mutant Wilms' tumors. *Am J Pathol* 165:1943–1953.
- Lin CR, Kioussi C, O'Connell S, Briata P, Szeto D, Liu F, Izpisua-Belmonte JC, Rosenfeld MG. 1999. Pitx2 regulates lung asymmetry, cardiac positioning and pituitary and tooth morphogenesis. *Nature* 401:279–282.
- Maes P, Delemarre J, de Kraker J, Ninane J. 1999. Fetal rhabdomyomatous nephroblastoma: a tumour of good prognosis but resistant to chemotherapy. *Eur J Cancer* 35:1356–1360.

- Maiti S, Alam R, Amos CI, Huff V. 2000. Frequent association of beta-catenin and WT1 mutations in Wilms tumors. *Cancer Res* 60:6288–6292.
- Miyagawa K, Kent J, Moore A, Charlieu JP, Little MH, Williamson KA, Kelsey A, Brown KW, Hassam S, Briner J, et al. 1998. Loss of WT1 function leads to ectopic myogenesis in Wilms' tumour. *Nat Genet* 18:15–17.
- Moolenaar WH, van Meeteren LA, Giepmans BN. 2004. The ins and outs of lysophosphatidic acid signaling. *Bioessays* 26:870–881.
- Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, Vogelstein B, Kinzler KW. 1997. Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science* 275:1787–1790.
- Rubinfeld B, Robbins P, El-Gamil M, Albert I, Porfiri E, Polakis P. 1997. Stabilization of beta-catenin by genetic defects in melanoma cell lines. *Science* 275:1790–1792.
- Schubert SW, Kardash E, Khan MA, Cheusova T, Kilian K, Wegner M, Hashemolhosseini S. 2004. Interaction, cooperative promoter modulation and renal colocalisation of GCMA and Pitx2. *J Biol Chem* (in press).
- Schumacher V, Schuhens S, Sonner S, Weirich A, Leuschner I, Harms D, Licht J, Roberts S, Royer-Pokora B. 2003. Two molecular subgroups of Wilms' tumors with or without WT1 mutations. *Clin Cancer Res* 9:2005–2014.
- Takahashi M, Fujita M, Furukawa Y, Hamamoto R, Shimokawa T, Miwa N, Ogawa M, Nakamura Y. 2002. Isolation of a novel human gene, APCDD1, as a direct target of the beta-catenin/T-cell factor 4 complex with probable involvement in colorectal carcinogenesis. *Cancer Res* 62:5651–5656.
- Tetsu O, McCormick F. 1999. Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* 398:422–426.
- Tice DA, Szeto W, Soloviev I, Rubinfeld B, Fong SE, Dugger DL, Winer J, Williams PM, Wieand D, Smith V, Schwall RH, Pennica D, Polakis P. 2002. Synergistic induction of tumor antigens by Wnt-1 signaling and retinoic acid revealed by gene expression profiling. *J Biol Chem* 277:14329–14335.
- Wirths O, Waha A, Weggen S, Schirmacher P, Kuhne T, Goodyer CG, Albrecht S, Von Schweinitz D, Pietsch T. 2003. Overexpression of human Dickkopf-1, an antagonist of wingless/WNT signaling, in human hepatoblastomas and Wilms' tumors. *Lab Invest* 83:429–434.
- Wissmann C, Wild PJ, Kaiser S, Roepcke S, Stoehr R, Woenckhaus M, Kristiansen G, Hsieh JC, Hofstaedter F, Hartmann A, Knuechel R, Rosenthal A, Pilarsky C. 2003. WIF1, a component of the Wnt pathway, is down-regulated in prostate, breast, lung, and bladder cancer. *J Pathol* 201:204–212.
- Zhang X, Gaspard JP, Chung DC. 2001. Regulation of vascular endothelial growth factor by the Wnt and K-ras pathways in colonic neoplasia. *Cancer Res* 61:6050–6054.
- Zirn B, Hartmann O, Samans B, Krause M, Wittmann S, Mertens F, Graf N, Eilers M, Gessler M. 2005a. Expression profiling of Wilms tumors reveals new candidate genes for different clinical parameters. *Int J Cancer* (in press).
- Zirn B, Samans B, Spangenberg C, Graf N, Eilers M, Gessler M. 2005b. All-trans retinoic acid treatment of Wilms tumor cells reverses expression of genes associated with high risk and relapse in vivo. *Oncogene* 24:5246–5251.
- Zirn B, Wittmann S, Graf N, Gessler M. 2004. Chibby, a novel antagonist of the Wnt pathway, is not involved in Wilms tumor development. *Cancer Lett* 220:115–120.

Publikation 4

Chibby, a novel antagonist of the Wnt pathway, is not involved in Wilms tumor development

Zirn B¹, Wittmann S¹, Graf N², Gessler M¹.

¹Physiological Chemistry I, Biozentrum, University of Würzburg, Germany

²Children's Hospital, Department of Paediatric Oncology and Haematology, University of the Saarland, Germany

Cancer Lett, 220(1):115-20 (2005).



Available online at www.sciencedirect.com



CANCER
Letters

www.elsevier.com/locate/canlet

Cancer Letters 220 (2005) 115–120

Chibby, a novel antagonist of the *Wnt* pathway, is not involved in Wilms tumor development

Birgit Zirn^a, Stefanie Wittmann^a, Norbert Graf^b, Manfred Gessler^{a,*}

^aTheodor-Boveri-Institut fuer Biowissenschaften, Physiologische Chemie I, Am Hubland, D-97074 Wuerzburg, Germany

^bChildren's Hospital, Department of Paediatric Oncology and Haematology, University of the Saarland, D-66421 Homburg/Saar, Germany

Received 6 July 2004; received in revised form 2 August 2004; accepted 2 August 2004

Abstract

Deregulation of the *Wnt* signalling pathway is a key event in the development of a broad spectrum of human malignancies and mutations in β -catenin (*CTNNB1*), a central component of the *Wnt* pathway, have been detected in 10–15% of Wilms tumors (nephroblastoma). Furthermore, nuclear immunoreactivity for β -catenin has been described even in the absence of detectable β -catenin mutations. This suggests that other components of the *Wnt* pathway may be involved in the pathogenesis of a subgroup of Wilms tumors. *Chibby* (*C22ORF2*) is a recently identified antagonistic component of the *Wnt* pathway that inhibits the transcriptional activity of β -catenin. Our study addresses the question whether mutation or down-regulation of *Chibby* is involved in Wilms tumorigenesis. We analysed the expression of *Chibby* by real time RT-PCR in 142 Wilms tumors, but there was no significant expression difference in any group of tumors stratified according to clinical, histological and mutational criteria. Mutation analysis of a smaller cohort did not reveal any mutations of the coding sequence. We only detected a constitutive splice variant leading to the absence of exon 4 in all Wilms tumors as well as in normal tissues. In addition, we detected a frequent silent polymorphism in the *Chibby* exon 4 sequence (435T/C). These data strongly suggest that despite its attractive function as a modulator of β -catenin activity, *Chibby* is not involved in Wilms tumorigenesis.

© 2004 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: Wilms tumor; Nephroblastoma; β -catenin; *Wnt* pathway; *Chibby*; Expression analysis

1. Introduction

Wilms tumor or nephroblastoma is one of the most common solid tumors in childhood (1:10,000 live births). It arises from embryonic kidney cells

and most frequently presents as a unilateral (95%) and sporadic (98%) tumor. The overall 5-year-survival rate after preoperative chemotherapy and tumor nephrectomy is approximately 90%. In most Wilms tumors the molecular pathogenesis is still unclear. Two gene mutations are known to be involved in Wilms tumorigenesis: these are mutations in *WT1* and in β -catenin. Both mutations are frequently associated with each other, but account for only 10–15% of Wilms tumors, respectively [1–3].

* Corresponding author. Tel.: +49 931 888 4159; fax: +49 931 888 7038.

E-mail address: [\(M. Gessler\).](mailto:gessler@biozentrum.uni-wuerzburg.de)

WT1 has been identified as a tumor suppressor gene on chromosome band 11p13 [4,5]. It encodes a zinc finger transcription factor that plays an essential role in genitourinary development [6].

β -catenin is involved in both *Wnt* signalling and intercellular adhesion. Activation of the *Wnt* pathway inhibits β -catenin phosphorylation by GSK3. Non-phosphorylated β -catenin is protected from degradation and translocates to the nucleus, where it forms a complex with transcription factors of the *Tcf/Lef* family to regulate transcription of target genes, e.g. *MYC* and *Cyclin D1* [7,8]. Mutations especially of exon 3 of the β -catenin gene render the protein refractory to phosphorylation and subsequent targeted degradation, resulting in its nuclear accumulation and inappropriate activation of downstream target genes [9,10].

β -catenin is found to be mutated in a variety of human cancers (for review, see Ref. [11]) and the identification of β -catenin mutations in about 15% of Wilms tumors [12] implies that alteration of the *Wnt* pathway also plays an important role in the development of at least a subgroup of Wilms tumors. Mutations in β -catenin lead to an intranuclear accumulation of the β -catenin protein in a fraction of tumor cells [13]. Interestingly, a subset of Wilms tumors without detectable β -catenin mutations shows similar intranuclear accumulation of the β -catenin protein. Therefore, other genes of the *Wnt* pathway may be affected in these tumors.

Recently, a new antagonistic component of the *Wnt* signalling pathway has been identified. A screening for proteins that directly interact with the transcription activation domain of β -catenin revealed the protein *Chibby* as a novel antagonist of the *Wnt* pathway [14]. *Chibby* (*C22ORF2*) is located in chromosome band 22q13 and encodes a small nuclear coiled coil protein that inhibits the transcriptional activity of β -catenin by competing with the transcription factor *Lef-1* for binding to β -catenin. Up- and down-regulation of *Chibby* was shown to directly influence the expression of targets such as *Cyclin D1*. Downregulation of *Chibby* was shown in uterine and thyroid cancers [15].

The aim of our study was to assess whether *Chibby* is also involved in Wilms tumorigenesis. We analysed the expression of *Chibby* in 142 Wilms tumors and screened selected tumors for mutations of the coding sequence.

2. Materials and methods

2.1. Wilms tumor samples

Primary tumor tissue was obtained from 142 Wilms tumors of the German SIOP/GPOH 93-01 Wilms tumor study. Detailed clinical data were available for all samples. Informed consent for biological studies had been obtained before surgery.

2.2. RNA isolation and cDNA synthesis

Total RNA was isolated from frozen tumor tissue using the RNA/DNA Midi Kit (Qiagen, Hilden, Germany) or Trizol reagent (Life Technologies) for simultaneous RNA/DNA extraction. RNA concentration was measured by absorbance at 260 nm and the samples were stored in water at –80 °C. 2.5 µg of total RNA were used for cDNA synthesis with the RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (MBI Fermentas, St.Leon-Rot, Germany). After initial RNA denaturation at 70 °C for 10 min, the cDNA was synthesized at 42 °C for 60 min, followed by termination of the reaction at 70 °C for 10 min. RNA was degraded by incubating with 1.25 U of RNase H at 37 °C for 30 min. Finally, water was added to a final volume of 200 µl.

2.3. Real time PCR

Real time PCR was conducted in the iCycler (Bio-Rad, Munich, Germany). Standard PCR reactions (22 µl) contained 2 µl cDNA, 7.5 pmol primers (*Chibby*_forward: GTCAGGAGAACGGAGCACTG and *Chibby*_reverse: GGGTTGATCGATCCAAAGAA), 0.13 pmol FITC (Bio-Rad, Munich, Germany) and 0.75 µl Sybr Green (1:20,000 diluted, Eurogentec, Seraing, Belgium) for detection. PCR conditions were: 40 cycles of denaturation at 95 °C for 15 s, followed by annealing and elongation at 60 °C for 1 min. Finally, melt curves were established (50–93 °C) in order to check the accuracy of amplification products. RT-PCRs were performed in two microtiter plates with additional control cDNAs for standardization. RT-PCR reactions with the housekeeping gene *HPRT* (*hHPRT1*: TGACACTGG-CAAAACAATGCA; *hHPRT2*: GGTCCTTTCAC-CAGCAAGCT) were performed with the aim of

equalizing concentration differences between the tumor samples.

2.4. *WT1*/ β -catenin mutation analysis and allele loss studies

WT1 mutation analyses were conducted in 92 Wilms tumors using either single strand confirmation polymorphism (SSCP) or denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC), followed by sequencing of exons yielding variant SSCP or DHPLC profiles.

For SSCP analysis, *WT1* exons were amplified from genomic DNA and labelled by 32 P-dCTP incorporation. PCR products were separated as single-stranded molecules by electrophoresis in non-denaturing polyacrylamide gel as described in Gessler et al. [1].

For DHPLC mutation screening, *WT1* exons were similarly amplified. To also detect homozygous mutations, equal volumes of PCR products from tumor samples were mixed with control products generated from sequenced normal cosmid clones, denatured at 95 °C for 5 min and then incubated at 65 °C for 15 min in order to obtain heteroduplices. Mutation analysis was then performed on both the original and mixed PCR products using the Transgenomic WAVE™ DNA Fragment Analysis System. DHPLC conditions were optimized using positive controls with known mutation status. Samples showing an abnormal peak pattern were then sequenced on a Beckman CEQ2000 system.

The β -catenin gene was assessed for deletions or mutations of exon 3. The entire region from exons 2 to 4 was amplified using primers *b*-catenin-ex2 (TGAAAATCCAGCGTGGACAATG) and *b*-catenin-ex4r (GATTGCACGTGTGGCAAGTTCT) and assayed for shortened fragments on agarose gels. Exon 3 was directly sequenced with primer *b*-catenin-in3r (TCTGACTTTCAGTAAGGCAATGAA).

Allele loss studies with microsatellite markers were carried out as described in Klamt et al. [16].

2.5. *Chibby* mutation analysis

For *Chibby* mutation analysis tumor cDNAs were amplified with the primers *Chibby*_forward

(GTCAGGAGAAGGGAGCACTG) and *Chibby*_reverse (GGGTTGATCGATCCAAGAA). The PCR product encompassing the entire coding region was purified (Nucleospin, BD Biosciences, Heidelberg, Germany) and sequenced using the forward primer on a Beckman CEQ2000.

3. Results and discussion

Our study addresses the question whether *Chibby* (*C22ORF2*), a novel antagonist of the *Wnt* pathway in *Drosophila* [14] that directly interacts with the transcription activation domain of β -catenin, is also involved in Wilms tumorigenesis. We selected two experimental approaches. First, we performed a broad expression screening of *Chibby* in 142 Wilms tumors from the German SIOP/GPOH 93-01 study and secondly, we examined a subset of 21 tumors for cDNA mutations in the coding sequence.

Expression of *Chibby* mRNA in Wilms tumors was quantified by real time RT-PCR using *HPRT* transcripts levels as a baseline for standardization. Different clinical, histological and mutational criteria were then applied for stratification of the expression results (Fig. 1). Clinical criteria were metastasis (yes/no), relapse (yes/no), preoperative therapy (none versus chemotherapy) and response to chemotherapy (greater or less than 50% reduction in volume). Histological diagnosis classified 62 Wilms tumors as standard risk (32 triphasic, 15 regressive, 7 stromal and 8 epithelial tumors), high risk was diagnosed in 15 tumors (11 blastemal and 4 anaplastic tumors). There was no discernible expression difference between the respective subgroups of tumors.

Mutational data for *WT1* and β -catenin were available for 92 and 60 of these tumors, respectively. As there is a known association of stromal histology with *WT1* mutations and of *WT1* and β -catenin mutations, we also selected tumors positive for any of these features. Significant expression differences could not be detected in any stratified tumor group. Finally, we grouped tumors with allele loss on chromosome 22, the genomic location of the *Chibby* gene (22q13). This chromosome shows allele loss in up to 10% of Wilms tumors, but again there was no

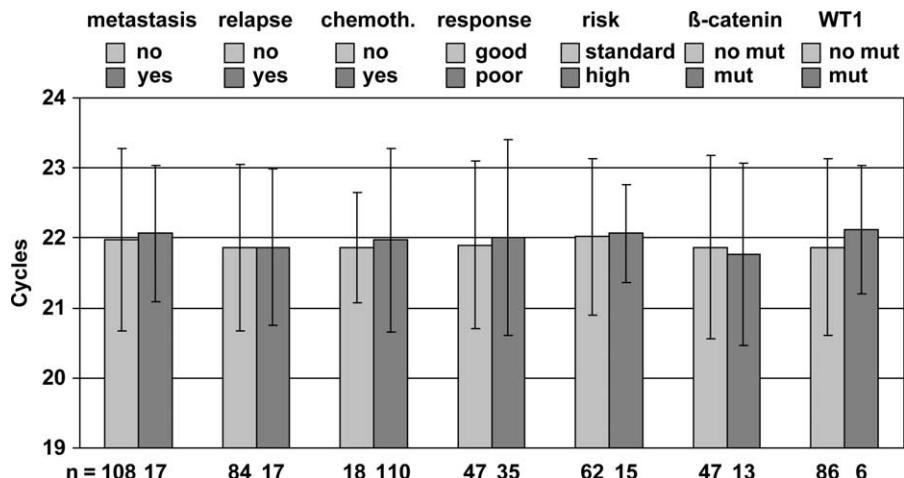


Fig. 1. Expression of *Chibby* in 142 Wilms tumors stratified for different clinical, histological and mutational criteria. Median cycle differences measured by real time RT-PCR (y-axis) and standard deviations are indicated for these stratifications. The number of tumors in every group is shown below each column. As nearly all relapses occur within three years after therapy, this timeframe was used for definition of relapse-free tumors. Tumor reduction of greater than 50% after chemotherapy was defined as good response, tumor reduction of less than 50% or increase of tumor volume was defined as poor response. The definition of risk refers to the histological diagnosis. The standard risk group comprises 32 triphasic, 15 regressive, 7 stromal and 8 epithelial tumors, the high risk group consists of 11 blastemal and 4 anaplastic tumors.

alteration in *Chibby* expression levels in this subgroup. Thus, the expression of *Chibby* is stable and independent of the clinical, mutational or histological background in Wilms tumors. Expression data of *Chibby* cannot be used for prediction of outcome in Wilms tumors.

Mutation analysis of *Chibby* was performed on a subgroup of all Wilms tumors analysed by real time RT-PCR with the highest probability of having alterations in *Wnt* signal transduction. Again, stromal histology, mutation in *WT1*, loss of heterozygosity at chromosome band 11p13 and mutations of β -catenin were used as inclusion criteria. Corresponding mutational and histological data are summarized in Table 1. Complete sequencing of the entire *Chibby* coding region did not reveal a mutation in any of the tumor cDNAs.

The only relevant alteration detected was a splice variant present at low levels in all of the tumors analysed, which had not been described before. Exon 4 of *Chibby* is skipped, leading to a frameshift in exon 5, which is terminated by a stop codon after nine amino acids. The truncated protein comprises 71 amino acids, the first 61 of which are identical to

the full-length protein consisting of 126 amino acids. In order to clarify whether this splice variant is ubiquitously found, we analysed fetal tissue samples of kidney, liver, spleen, brain and lung as well as normal kidney tissue. The splice variant was present in all of these tissues at similarly low levels, arguing against a pathological significance. Several studies suggest that up to 40% of all genes have alternative splice forms [17]. However, the biological function of alternative splicing remains to be clarified in most genes.

In ten of the analysed Wilms tumors a silent polymorphism (435T/C) in the *Chibby* exon sequence was detected in heterozygous ($n=7$) or homozygous form ($n=3$). This silent polymorphism has already been described as a regular polymorphism (snp 3747174; http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/geneview?db=&gene=ENSG00000100211). The frequency of this polymorphism in our cohort is in good accordance with the overall frequency of heterozygosity of 46%.

In summary, we were the first to study the role of *Chibby*, a novel antagonist of the *Wnt* pathway, in human Wilms tumorigenesis. Although *Chibby* was reported to be downregulated in uterine and thyroid

Table 1

Mutation analysis of *Chibby* in 21 Wilms tumors in comparison with β -catenin and *WT1* status, histology and 11p13 LOH data

Sample	Chibby	β -catenin			<i>WT1</i> #	Histology	LOH 11p13 ^a
	435T/C polymorphism	Exon 3 mutation status	Mutation type	Exon	Mutation type (nucleotide change)		
19	wt	het	Δ Ser45			Stromal	Yes
23	wt	nd		2 (het)	M182V (924A>G)	Triphasic	No
29	het	nd			nd	Blastemal	Yes
31	het	hom	Δ Ser45	3 (het)	Splice site mutation (946-1G>T)	Stromal	Yes
37	hom	wt				Anaplastic	Yes
60	wt	nd				Triphasic	Yes
61	wt	wt				Triphasic	Yes
62	hom	wt		nd		Triphasic	Yes
64	wt	wt		2 (hom)	H162S>179Stop (863_864insT)	Triphasic	Yes
69	wt	hom	Δ Ser45			Triphasic	No
104	wt	nd		6 (het)	Q298Stop	Regressive	No
121	wt	het	S45F			Clear cell sarcoma	nd
122	het	wt				Blastemal	Yes
195	het	het	S45F			Triphasic	No
197	het	wt		10 (het)	Frameshift (1677_1678delCG)	Stromal	No
208	wt	het	Δ Ser45	7 (het)	Frameshift (1373_1391dup19nt)	Stromal	No
230	wt	het	Δ Ser45			Stromal	No
246	het	het	Δ Ser45			Stromal	Yes
248	wt	wt				Epithelial	Yes
252	het	wt				unknown	No
258	hom	het	Δ Ser45			Stromal	Yes

nt, not done; wt, wild-type; het, heterozygous; hom, homozygous.

^a Markers used: D11S1392, D11S239, D11S935, WT1-(CA)n.

cancer, we neither detected mutations nor expression differences of *Chibby* in tumors stratified for different clinical, histological or mutational criteria. It can therefore be concluded that despite its attractive function as a modulator of β -catenin activity, *Chibby* is most likely not involved in Wilms tumorigenesis.

Acknowledgements

This project was funded by the Graduiertenkolleg 639, the BMBF “Kompetenznetz für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie” and parent donations. This work is part of the PhD thesis of Birgit Zirn and Stefanie Wittmann.

References

- [1] M. Gessler, A. Konig, K. Arden, P. Grundy, S. Orkin, S. Sallan, et al., Infrequent mutation of the *WT1* gene in 77 Wilms' tumors, *Hum. Mutat.* 3 (1994) 212–222.
- [2] S. Maiti, R. Alam, C.I. Amos, V. Huff, Frequent association of beta-catenin and *WT1* mutations in Wilms tumors, *Cancer Res.* 60 (2000) 6288–6292.
- [3] R. Varanasi, N. Bardeesy, M. Ghahremani, M.J. Petruzzelli, N. Nowak, M.A. Adam, et al., Fine structure analysis of the *WT1* gene in sporadic Wilms tumors, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 91 (1994) 3554–3558.
- [4] M. Gessler, A. Poustka, W. Cavenee, R.L. Neve, S.H. Orkin, G.A. Bruns, Homozygous deletion in Wilms tumours of a zinc-finger gene identified by chromosome jumping, *Nature* 343 (1990) 774–778.
- [5] K.M. Call, T. Glaser, C.Y. Ito, A.J. Buckler, J. Pelletier, D.A. Haber, et al., Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus, *Cell* 60 (1990) 509–520.

- [6] N.D. Hastie, Life, sex, and WT1 isoforms—three amino acids can make all the difference, *Cell* 106 (2001) 391–394.
- [7] T.C. He, A.B. Sparks, C. Rago, H. Hermeking, L. Zawel, L.T. da Costa, et al., Identification of c-MYC as a target of the APC pathway, *Science* 281 (1998) 1509–1512.
- [8] O. Tetsu, F. McCormick, Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells, *Nature* 398 (1999) 422–426.
- [9] P.J. Morin, A.B. Sparks, V. Korinek, N. Barker, H. Clevers, B. Vogelstein, K.W. Kinzler, Activation of beta-catenin-Tcf signalling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC, *Science* 275 (1997) 1787–1790.
- [10] B. Rubinfeld, P. Robbins, M. El-Gamil, I. Albert, E. Porfiri, P. Polakis, Stabilization of beta-catenin by genetic defects in melanoma cell lines, *Science* 275 (1997) 1790–1792.
- [11] P. Polakis, Wnt signaling and cancer, *Genes Dev.* 14 (2000) 1837–1851.
- [12] V. Huff, Wilms tumor genetics, *Am. J. Med. Genet.* 79 (1998) 260–267.
- [13] R. Koesters, F. Niggli, M. von Knebel Doeberitz, T. Stallmach, Nuclear accumulation of beta-catenin protein in Wilms' tumours, *J. Pathol.* 199 (2003) 68–76.
- [14] K. Takemaru, S. Yamaguchi, Y.S. Lee, Y. Zhang, R.W. Carthew, R.T. Moon, Chibby, a nuclear beta-catenin-associated antagonist of the Wnt/Wingless pathway, *Nature* 422 (2003) 905–909.
- [15] S. Greaves, Small changes in Wnt signalling, *Nat. Cell Biol.* 5 (2003) 387.
- [16] B. Klamt, M. Schulze, C. Thate, J. Mares, P. Goetz, R. Kodet, et al., Allele loss in Wilms tumors of chromosome arms 11q, 16q, and 22q correlate with clinicopathological parameters, *Genes Chromosomes Cancer* 22 (1998) 287–294.
- [17] B. Modrek, C. Lee, A genomic view of alternative splicing, *Nat. Genet.* 30 (2002) 13–19.

Publikation 5

Novel familial WT1 read-through mutation associated with Wilms tumor and slow progressive nephropathy

Zirn B, Wittmann S, Gessler M.

Physiological Chemistry I, Biozentrum, University of Wuerzburg, Germany

Am J Kidney Dis, 45(6):1100-4 (2005).

Novel Familial *WT1* Read-Through Mutation Associated With Wilms Tumor and Slow Progressive Nephropathy

Birgit Zirn, MD, Stefanie Wittmann, MSc, and Manfred Gessler, MD

- Wilms tumor gene 1 (*WT1*) is essential for normal urogenital development. Mutations in *WT1* are involved in Wilms tumorigenesis and several associated syndromes, such as Denys-Drash, Frasier, or Wilms tumor, aniridia, genitourinary anomalies, and mental retardation syndrome. We report a novel familial *WT1* point mutation in the stop codon of exon 10 (1730A/G; X450W) in 3 members of 1 family. The index patient is a 22-year-old woman in whom Wilms tumor and ureter duplex were diagnosed at the age of 9 years and who subsequently developed slow progressive nephropathy. Her mother also had late-onset nephropathy that led to end-stage renal failure, whereas renal function in 1 brother of the index patient was not impaired. We hypothesize that this type of mutation (read-through), which leads to an elongated, but otherwise unchanged, *WT1* protein, may be associated with incomplete penetrance and a relatively late onset of both Wilms tumor and nephropathy in this family. *Am J Kidney Dis* 45:1100-1104.

© 2005 by the National Kidney Foundation, Inc.

INDEX WORDS: Wilms tumor; Wilms tumor gene 1 (*WT1*) mutation; nephropathy.

WILMS TUMOR GENE 1 (*WT1*) has a key role in kidney and gonad development and subsequent normal renal function. It consists of 10 exons that encode a 449-amino acid protein that contains 4 zinc fingers and a transactivation domain. Alternative splicing occurs at exon 5 (± 17 amino acids) and exon 9 (± 3 amino acids; KTS, ie, Lys-Thr-Ser). The correct ratio of the resulting isoforms is required for normal gene function.

WT1 originally was isolated as a tumor suppressor gene in patients with Wilms tumors.^{1,2} Wilms tumor, or nephroblastoma, is a malignant kidney tumor that affects approximately 1 in 10,000 children. It arises from embryonic renal precursor cells and most frequently presents as a unilateral and sporadic tumor. In approximately 4% of patients with Wilms tumor, Denys-Drash Syndrome (DDS) or Wilms tumor, aniridia, geni-

tourinary anomalies, and mental retardation (WAGR) syndrome is additionally diagnosed.^{3,4} The frequency of *WT1* mutations in patients with sporadic Wilms tumors is 10% to 15%.⁵ Conversely, children with syndrome-associated Wilms tumors frequently show germline *WT1* mutations.

In patients with DDS, the most frequent constitutional *WT1* mutations are missense mutations in exon 9 affecting the zinc-finger region of *WT1*, which is responsible for DNA binding.⁶ *WT1* mutations in patients with DDS show dominant-negative activity, and it is assumed that self-association between wild-type and mutant *WT1* protein prevents normal *WT1* gene function. DDS typically involves nephropathy (diffuse mesangial sclerosis with early childhood renal failure), gonadal dysgenesis (male pseudohermaphroditism), and a strong predisposition toward Wilms tumors.

Frasier syndrome is caused by specific mutations of the donor splice site in intron 9 of the *WT1* gene, leading to reduced expression of the usually more abundant +KTS isoform.^{7,8} In contrast to DDS, nephropathy presents as focal and segmental glomerular sclerosis and appears later during adolescence, with slower progression. Wilms tumors are almost never seen, probably because only isoform ratios are perturbed. Even with a loss of the wild-type allele, the *WT1*-KTS isoform would still be present. Affected males show complete 46,XY gonadal dysgenesis, with gonadoblastoma frequently arising in streak gonads.

From Physiological Chemistry I, Biocentrum, University of Wuerzburg, Germany.

Received January 5, 2005; accepted in revised form March 8, 2005.

Originally published online as doi:10.1053/j.ajkd.2005.03.013 on April 29, 2005.

Supported in part by Bundesministerium fuer Bildung und Forschung Kompetenznetzwerk Embryonale Tumoren and Deutsche Forschungsgemeinschaft-Graduiertenkolleg 639 Tumorinstabilitaet.

Address reprint requests to Manfred Gessler, MD, Theodor-Boveri-Institute, Physiological Chemistry I, Biocenter of the University of Wuerzburg, 97074 Wuerzburg, Germany. E-mail: gessler@biocentrum.uni-wuerzburg.de

© 2005 by the National Kidney Foundation, Inc.
0272-6386/05/4506-0017\$30.00/0
doi:10.1053/j.ajkd.2005.03.013

Clinical symptoms in patients with WAGR syndrome are caused by large deletions and haploinsufficiency of the chromosomal region 11p13, which includes *WT1* and the paired box gene *PAX6*. Genitourinary anomalies mostly present as hypospadias and cryptorchidism. In Wilms tumors in patients with WAGR syndrome, the remaining allele typically acquires an additional somatic *WT1* mutation.⁴

Taken together, germline *WT1* mutations may act through several genetic mechanisms and lead to different clinical manifestations, as seen in DDS, Frasier, and WAGR syndromes. Here, we describe a family with a novel *WT1* mutation type (read-through) associated with Wilms tumor and slow progressive nephropathy that may further broaden the spectrum of *WT1*-induced disease states.

CASE REPORT

A unilateral Wilms tumor in the right kidney was diagnosed in the patient (II.2 in Fig 1) at the age of 9 years. Tumor nephrectomy was performed after preoperative chemotherapy and showed a mixed-type (triphasic) stage III Wilms tumor according to the International Society of Pediatric Oncology classification. The affected kidney showed malformation of the ureter and renal pelvis, which were both duplicated. The patient subsequently underwent postoperative chemotherapy and radiotherapy. She developed polyneuropathy of the feet, probably as a side effect of chemotherapy with vincristine.

Nephropathy and hypertrophy of the remaining left kidney were diagnosed at the same age. Proteinuria worsened until the age of 15 years, when a brief improvement in renal function was noticed. Subsequently, the patient's renal function deteriorated further, accompanied by hypertension. Several therapeutic approaches with antihypertensive medication remained unsuccessful. The patient currently is 22 years old and is followed up in a dialysis clinic because she is approaching end-stage renal failure.

The mother (I.2) of the index patient developed proteinuria and nephrotic syndrome during her second pregnancy at the age of 24 years. Subsequent biopsy of the left kidney showed minimal change nephropathy. Renal function deteriorated slowly, followed by hypertension, secondary hyperparathyroidism, and hyperlipidemia. A second renal biopsy at the age of 43 years showed advanced glomerulonephritis with severe tubular atrophy and interstitial fibrosis. After unsuccessful immunosuppressive therapy with corticosteroids, she recently began dialysis therapy at the age of 46 years.

The younger brother of patient II.2 (II.3), currently 17 years old, has marked overweight (body mass index > 40 kg/m²) and hypertension, but normal renal function, tested by means of 24-hour urine analysis (no proteinuria, hematuria, or leukocytes and normal pH) and blood analysis (normal serum creatinine and electrolyte levels, normal serum

electrophoresis results, no antinuclear antibodies, and normal blood cell count). Moreover, he has no genitourinary malformation. The elder sister (II.1) and father (I.1) are healthy.

DNA Sequence Analysis of *WT1*

DNA was extracted from blood samples of all family members, and *WT1* exons 7 to 10 were amplified by means of polymerase chain reaction using primers as previously described.⁵ Polymerase chain reaction products were sequenced on a Beckman CEQ2000 system (Beckman Coulter, Krefeld, Germany), with forward and reverse primers.

In patient II.2, who presented with nephropathy and Wilms tumor, exons 1 to 6 also were sequenced. We intended to analyze *WT1* status in the original Wilms tumor sample. However, DNA could not be extracted reliably from the tumor, which had been embedded in paraffin for more than 10 years.

DISCUSSION

Here, we describe a family with proteinuria, nephropathy, and Wilms tumor. The index patient, a 22-year-old woman, presented with slow progressive nephropathy and a history of Wilms tumor at the age of 9 years. Proteinuria and nephropathy had been diagnosed in the patient's mother during her second pregnancy at the age of 24 years. The mother's renal function slowly deteriorated until she reached end-stage renal failure at the age of 46 years. This combination of symptoms in 2 generations was suggestive of a *WT1* germline mutation. Sequence analysis of *WT1* was performed in all members of the family (Fig 1). We did not find any of the common mutations in DDS,⁹ but detected a novel germline *WT1* mutation in exon 10. This heterozygous point mutation (1730A/G) is localized in the stop codon of exon 10 (X450W) and represents a read-through mutation leading to protein elongation of 22 amino acids. The mutation was identified first in the index patient (II.2; Fig 1) and then also detected in her mother (I.2) and unaffected brother (II.3). Exons 7 to 9 were unchanged in all family members. Additionally, no mutation was found in exons 1 to 6 of the index patient.

WT1 mutations occur in only 10% to 15% of patients with sporadic Wilms tumors,⁵ whereas more than 90% of patients with Wilms tumor and such associated syndromes as DDS and WAGR show *WT1* mutations.¹⁰ DDS and Frasier syndrome are caused by dominant intragenic mutations in *WT1*, whereas patients with WAGR syndrome show haploinsufficiency caused by cytogenetically detectable deletions in chromo-

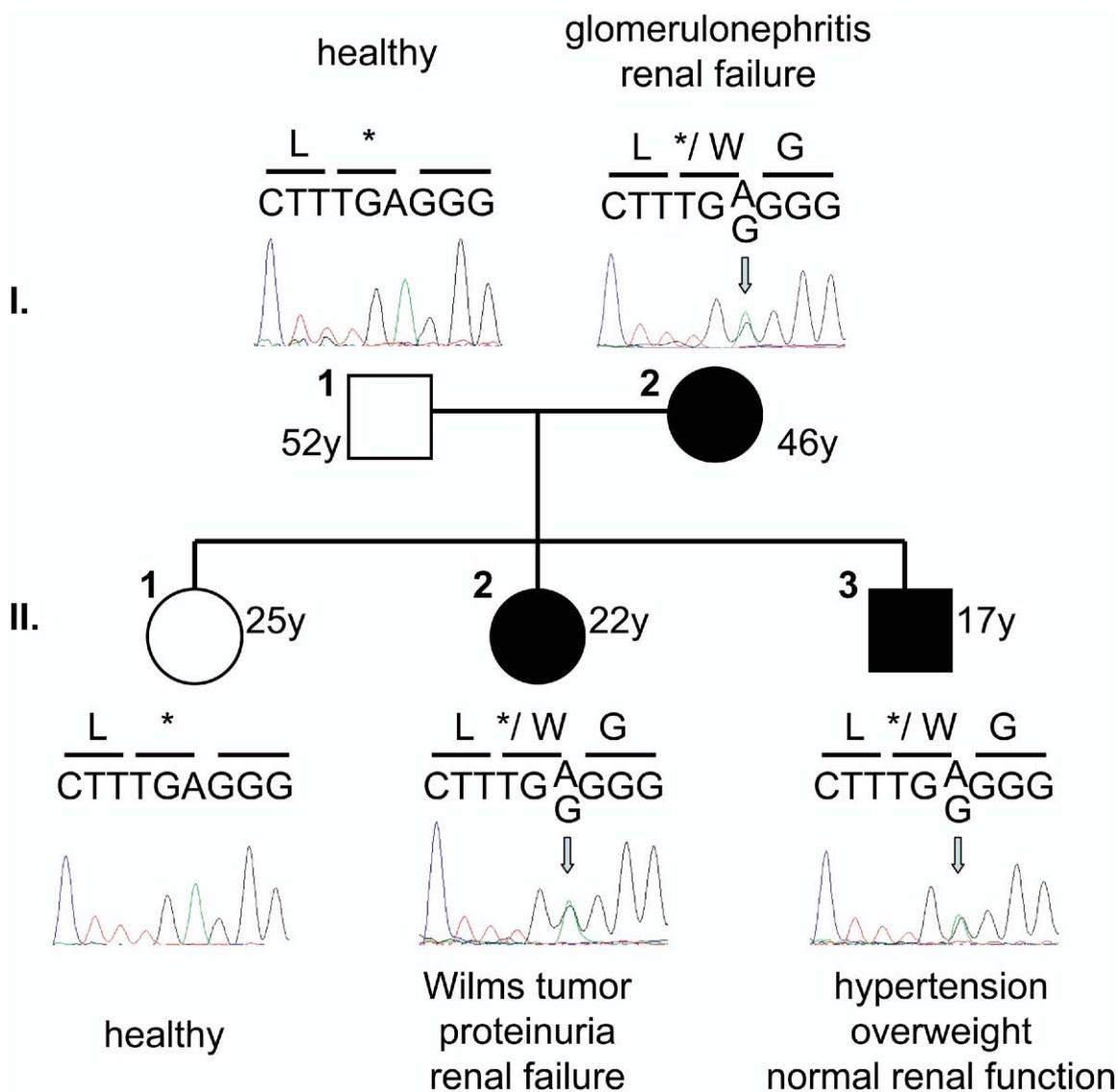


Fig 1. Pedigree of the family. *WT1* sequences of the stop codon of exon 10, the neighboring triplets, and clinical status are indicated for all family members. The germline *WT1* mutation in the stop codon of exon 10 (1730A/G; X450W), which leads to a read-through and protein elongation, was found in 3 members of this family (I.2, II.2, and II.3). Clinical manifestations were Wilms tumor and nephropathy in 1 daughter (II.2) and late-onset nephropathy in her mother (I.2). II.3 has normal renal function.

somal band 11p13. Hot-spot mutations in patients with DDS are *WT1* missense mutations in exon 9 (R394W/Q/L). Exons 1 to 8 are mutated less frequently, whereas mutations in exon 10 have not been described to date.⁹ In patients with Frasier syndrome, only mutations of the alternative splice site in intron 9 are found, which lead to altered ratios of otherwise normal *WT1* isoforms.^{7,8}

We identified a new familial *WT1* mutation in the stop codon of exon 10 that results in elongated *WT1* protein. This type of mutation (read-through) and its localization in exon 10 have not been described in patients with Wilms tumor before. However, read-through mutations are known to cause other diseases. For example, hemoglobin constant spring, which appears in a severe form of human α -thalassemia, is caused

by a mutation in the stop codon of the α_2 -globin gene.¹¹ Another example is the gridlock mutation in zebrafish, which also leads to an elongated, but otherwise unaltered, protein. The gridlock phenotype consists of aortic malformation and severely impaired blood circulation.¹² However, it is unclear whether the gridlock mutation leads to reduced stability or partial functional impairment of the messenger RNA or protein.

The read-through mutation in *WT1* that we describe here was associated with relatively late onset of Wilms tumor in the daughter, as well as a slow progressive type of nephropathy in both mother and daughter (age of onset of Wilms tumor was 9 years compared with a median of 12.5 months in children with *WT1* germline mutations⁹). These late clinical manifestations may be related to the mutation type, which results in an elongated, but otherwise unchanged, protein. Such protein functions as DNA binding therefore may be altered less severely than with other types of *WT1* mutations, such as truncations or missense mutations, which can lead to nonfunctional and dominant-negative acting proteins.

The mutation type also may be the reason that clinical manifestations in this family are difficult to classify as one of the common *WT1*-associated syndromes (DDS, Frasier, or WAGR syndrome). Compared with the mother, the earlier onset of proteinuria in the daughter may be caused by the preoperative and postoperative chemotherapy she underwent for her Wilms tumor. The cumulative risk for renal failure at 20 years from Wilms tumor has been calculated as 62% and 38% in patients with DDS and WAGR syndromes, respectively, whereas the risk was less than 1% in patients with unilateral Wilms tumor without genitourinary anomalies.¹³ Patients with DDS mostly develop renal failure before the age of 9 years, whereas affected patients with WAGR syndrome have a median age of onset of 14.6 years. The patient described here developed renal failure later than patients with DDS. In the mother, the course of disease was even more delayed, and histological findings did not exactly match those of classic DDS, suggesting that type of mutation strongly influenced clinical presentation.

Genital tract anomalies mainly affect male patients with WAGR, DDS, or Frasier syndrome.

In patients with DDS, the underlying molecular mechanism was suggested to be incomplete transactivation of *SRY*, the sex-determining gene on the Y chromosome, by mutated *WT1*.¹⁴ The woman (II.2) described here showed malformation of the ureter and renal pelvis, which were both duplicated. This malformation may represent an example of minor genitourinary anomalies, which infrequently occur in female patients with *WT1* mutations. The 17-year-old brother (II.3), who also carries the *WT1* mutation, has normal renal function to date, and his hypertension may be caused by severe obesity. Moreover, he has no genitourinary malformation, although his carrier sister does. This is in contrast to what is usually observed in germline *WT1* mutation carriers, in whom genitourinary malformations are found more frequently in males. Because his mother also showed no symptoms at his age, regular screening of his renal function is performed.

In summary, we describe a novel germline *WT1* mutation in a family with Wilms tumor and slow progressive renal failure. The type of mutation (read-through) may account for the relatively late onset of tumorigenesis and nephropathy in the affected individuals and possibly incomplete penetrance.

ACKNOWLEDGMENT

The authors thank Drs Meier and Francke for providing clinical information and A. Winkler for technical assistance. This work is part of the PhD thesis of Birgit Zirn.

REFERENCES

- Call KM, Glaser T, Ito CY, et al: Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus. *Cell* 60:509-520, 1990
- 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* 343:774-778, 1990
- Ruteshouser EC, Huff V: Familial Wilms tumor. *Am J Med Genet* 129C:29-34, 2004
- Huff V: Wilms tumor genetics. *Am J Med Genet* 79:260-267, 1998
- Gessler M, Konig A, Arden K, et al: Infrequent mutation of the *WT1* gene in 77 Wilms' tumors. *Hum Mutat* 3:212-222, 1994
- Pelletier J, Bruening W, Kashtan CE, et al: Germline mutations in the Wilms' tumor suppressor gene are associated with abnormal urogenital development in Denys-Drash syndrome. *Cell* 67:437-447, 1991

7. Barbaux S, Niaudet P, Gubler MC, et al: Donor splice-site mutations in WT1 are responsible for Frasier syndrome. *Nat Genet* 17:467-470, 1997
8. Klamt B, Koziell A, Poulat F, et al: Frasier syndrome is caused by defective alternative splicing of WT1 leading to an altered ratio of WT1 ± KTS splice isoforms. *Hum Mol Genet* 7:709-714, 1998
9. Royer-Pokora B, Beier M, Henzler M, et al: Twenty-four new cases of WT1 germline mutations and review of the literature: Genotype/phenotype correlations for Wilms tumor development. *Am J Med Genet* 127A:249-57, 2004
10. Little M, Wells C: A clinical overview of WT1 gene mutations. *Hum Mutat* 9:209-225, 1997
11. Clegg JB, Weatherall DJ, Milner PF: Haemoglobin constant spring—A chain termination mutant? *Nature* 234:337-340, 1971
12. Zhong TP, Rosenberg M, Mohideen MA, Weinstein B, Fishman MC: Gridlock, an HLH gene required for assembly of the aorta in zebra fish. *Science* 287:1820-1824, 2000
13. Breslow NE, Takashima JR, Ritchey ML, Strong LC, Green DM: Renal failure in the Denys-Drash and Wilms' tumor-aniridia syndromes. *Cancer Res* 60:4030-4032, 2000
14. Hossain A, Saunders GF: The human sex-determining gene SRY is a direct target of WT1. *J Biol Chem* 276:16817-16823, 2001

Marburg, Juni 2006

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Außerdem erkläre ich, dass die Dissertation nicht in gleicher oder ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich erkläre ferner, an der Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster zum Dr. med. promoviert zu haben (04.02.2002).