

LOH- und Expressionsanalysen zur Identifikation neuer prognostischer Marker in Wilms Tumoren

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

vorgelegt von
Stefanie Wittmann
aus
Hammelburg

Würzburg 2007

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

Gutachter :

Gutachter:

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

In der Wissenschaft gleichen wir alle nur den Kindern, die am Rande des Wissens hier und da einen Kiesel aufheben, während sich der weite Ozean des Unbekannten vor unseren Augen erstreckt.“

(Isaac Newton)

Inhaltsverzeichnis

Summary	1
Zusammenfassung	3
1. Einleitung	5
1.1 Krebserkrankungen im Kindesalter	5
1.2 Der Wilms Tumor	6
1.2.1 Diagnose	7
1.2.2 Assoziierte Syndrome	9
1.2.3 Histologie	9
1.2.3.1 Nephrogene Reste und Nephroblastomatose	9
1.2.3.2 Wilms Tumor	10
1.2.4 Therapie	12
1.2.5 Prognose	13
1.2.6 Rezidive	13
1.2.7 Molekulare Ursachen	14
1.2.7.1 WT1, β -Catenin und WTx	14
1.2.7.2 LOH und LOI	14
1.2.7.3 LOH-Analysen zur Identifikation involvierter Loci/Gene	15
1.2.7.4 Weitere mit Wilms Tumoren assoziierte Gene	16
1.3 Zielsetzung	17
2. Material	18
2.1 Primer	18
2.1.1 Primer für die LOH Analysen	18
2.1.1.1 Primer für 11p	18
2.1.1.2 Primer für 11q	18
2.1.1.3 Primer für 16q	19
2.1.2 Primer für die Realtime RT-PCR	19
2.1.3 Primer für Klonierungen	22
2.1.3.1 Primer für Überexpressionskonstrukte	22
2.1.3.2 Primer für shRNA-Konstrukte	22
2.1.3.3 Sequenzierprimer	22
2.1.4 Sequenzierprimer für Mutationsanalysen	22
2.2 Vektoren	23
2.3 Bakterienstämme	23
2.4 Eukaryotische Zelllinien	23
2.5 Wilms Tumor Primärkulturen	23
2.6 Puffer und Lösungen	24

2.7 Enzyme und Kits	24
2.8 Chemikalien	24
2.9 Antikörper	25
2.10 Geräte	25
2.11 Software	25
2.12 Sonstiges Material	25
3. Methoden	26
3.1 Isolierung von Nukleinsäuren	26
3.1.1 Isolierung von DNA und RNA aus gefrorenem Gewebe	26
3.1.2 Isolierung von DNA aus gefrorenem Gewebe	26
3.1.3 Isolierung von DNA aus Blut	26
3.1.4 DNA Präparation nach der Rapid-Boiling-Methode	27
3.2 Gelelektrophorese	28
3.2.1 DNA Gele	28
3.2.1.1 DNA Gele mit TAE Puffer	28
3.2.1.2 DNA Gele mit SB Puffer	28
3.2.2 RNA Gele	29
3.3 LOH-Analysen mit dem ALFexpress Sequenzierer	29
3.3.1 Microsatelliten PCR	29
3.3.2 Fragmentanalyse mit dem ALFexpress Sequenzierer	30
3.4 Realtime RT-PCR	31
3.4.1 cDNA Synthese	31
3.4.2 Realtime RT-PCR	31
3.5 PCR für Klonierungen	33
3.5.1 Überexpressionskonstrukte	33
3.5.2 shRNA-Konstrukte	33
3.6 Zellkultur	34
3.6.1 Wilms Tumor Primärkulturen	34
3.6.1.1 Anlegen von Primärkulturen aus Tumormaterial	34
3.6.1.2 Kultivierung und Lagerung von WT Primärkulturen	34
3.6.2 Isolierung von DNA und RNA aus Zellen	35
3.6.2.1 Isolierung von DNA aus Zellen	35
3.6.2.2 Isolierung von RNA aus Zellen mit peqGOLD TriFast	35
3.6.3 Produktion von Lentiviren in 293TD Zellen	36
3.6.4 Infektion von Zellen mit Hilfe von Lentiviren	37
3.6.5 Vorbereiten der Zellen für die FACS-Analyse	37
3.6.6 Seneszenzfärbungen	38

3.7 Proteinanalyse	38
3.7.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	38
3.7.2 Westernblot	39
3.8 Sequenzierungen	40
3.8.1 Sequenzierung von Plasmiden	41
3.8.2 Sequenzierung aus PCR	41
3.8.2.1 Sequenzierung von β -Catenin	41
3.8.2.2 Sequenzierung von WT1	42
3.8.2.2.1 Sequenzierung von WT1 aus genomischer DNA	42
3.8.2.2.2 Sequenzierung von WT1 aus cDNA	42
4. Ergebnisse	44
4.1 LOH-Analysen auf 11q und 16q in Wilms Tumoren	44
4.1.1 LOH und Mutationen in CTNNB1 und WT1	46
4.1.2 Korrelation von LOH mit klinischen Daten	47
4.1.2.1 LOH 11q und Histologie	48
4.1.2.2 LOH 16q und Histologie	50
4.1.3 Vergleich der Tumoren mit niedrigen LOH-Raten 11q und 16q	50
4.1.4 Korrelationen mit Rezidiv und Mortalität	50
4.2 Realtime RT-PCR Analysen in Wilms Tumoren	52
4.2.1 Statistische Analyse der Expressionsdaten	54
4.2.1.1 Analysen des Original-Tumorsatzes	54
4.2.1.1.1 Univariate Analyse	54
4.2.1.1.2 Univariate Analyse mit Abgleich nach Bonferroni-Holm	57
4.2.1.1.3 Einfluss der Therapieform auf die Ergebnisse	58
4.2.1.1.4 Multivariate Analyse	58
4.2.1.2 Validierung der Ergebnisse	60
4.2.1.2.1 Univariate Analyse inklusive Bonferroni-Holm Abgleich	60
4.2.1.2.2 Multivariate Analyse	61
4.3 Untersuchungen an Wilms Tumorzellen	62
4.3.1 cDNA-Überexpressionskonstrukte	62
4.3.1.1 Klonierung	62
4.3.1.2 Testen der Expression in 293TD- und HeLa-Zellen	62
4.3.2 Klonierung der shRNA-Konstrukte	63
4.3.3 Primärkulturen von Wilms Tumoren	63
4.3.4 Transduktion der Wilms Primärkulturen	65
4.3.5 Morphologische Veränderungen	65
4.3.6 Nachweis der korrekten Expression	66
4.3.6.1 cDNA-Überexpressionskonstrukte	66

4.3.6.2 shRNA-Konstrukte	68
4.3.7 Analyse der transduzierten Zellen	68
4.3.7.1 Wachstumskurven	68
4.3.7.2 FACS-Analysen	70
4.3.7.3 Apoptoseassay	72
4.3.7.4 Seneszenz-Färbungen	73
5. Diskussion	75
5.1 LOH-Analysen in Wilms Tumoren	75
5.1.1 LOH-Analysen auf 11q und 16q	76
5.1.2 LOH und Mutationen in CTNNB1 und WT1	77
5.1.3 LOH und Histologie	77
5.1.4 Korrelation von LOH mit Rezidiv und Mortalität	78
5.2 Realtime RT-PCR Analysen in Wilms Tumoren	79
5.2.1 Assoziationen mit CTNNB1 Mutationen	80
5.2.2 Assoziationen mit dem Ansprechen auf die Chemotherapie und primären Metastasen	81
5.2.3 Assoziationen mit der Histologie	82
5.2.4 Prognostische Marker für Rezidiv und Tod	82
5.2.5 Validierung der Ergebnisse	83
5.2.6 Zusammenfassung	85
5.3 Untersuchungen an Wilms Tumorzellen	85
5.3.1 Transduktion und Nachweis der Expression	85
5.3.2 Einfluss der Überexpression auf die Zellen	86
5.3.2.1 Folgen der Überexpression von EGR1	87
5.3.2.2 Folgen der Überexpression von MYCN	88
5.3.2.3 Folgen der Überexpression von TRIM22	89
5.4 Ausblick	90
6. Literaturverzeichnis	92
7. Abkürzungen	99

Summary

Wilms tumor (WT), also called Nephroblastoma, belongs to the most common malignant tumors occurring in childhood. Most of these Wilms tumors develop unilaterally (90 – 95 %) and sporadically (98 – 99 %). Unfortunately, only little is known about the molecular background underlying their development with only three genes known so far: WT1, CTNNB1 and WTx. Mutations in WT1 and CTNNB1 occur only in a minor fraction of Wilms tumors of about 10 - 15 % and are often associated with each other, while mutations in WTx can be found in about 30 % of tumors. The genetic alterations of the other tumors are completely unknown.

Hence, the aim of this thesis was to identify important regions and genes that are involved in Wilms tumor formation and/or progression and to further characterize their potential as markers for the prediction of certain clinical outcomes.

First, chromosome arms 11q and 16q were screened for LOH (= loss of heterozygosity), which means the (partial) loss of the genome in a cell, in a large cohort of Wilms tumors. In both regions LOH rates of about 20 % were detected, but since allele losses did not always start at the same marker in the different tumors it was not possible to delimit any relevant subregions. Since there were significantly higher rates of allele loss in anaplastic and mixed-type (only 11q) tumors and almost no allele loss in epithelial and stromal tumors, 11q and 16q must contain genes that either facilitate the epithelial and stromal differentiation of cells or hamper the appearance of blastemal and anaplastic phenotypes. Otherwise, the obvious possibility to discriminate these histological subtypes by allele loss on 11q and 16q might be explained by a development from different precursor cells. Higher rates of LOH could also be linked to higher risks for relapse and death (11q only), especially when the whole chromosome arms were involved. Therefore, investigation of LOH on 11q and 16q may help to adjust the therapeutic regimens by identifying high-risk patients for relapse and death.

A second approach was to reinvestigate the expression of a number of published marker genes in a larger set of Wilms tumors with a uniform method, the realtime RT-PCR. All of the genes were suggested to facilitate classification and/or prediction of certain clinical outcomes. Univariate analysis was performed to screen for relevant genes, followed by multivariate analysis to search for predictive gene combinations. Finally, validation of associations found in the first cohort was performed in a second and independent tumor set. Unfortunately, many of the previously published markers as well as associations of the first tumor set could not be verified in a new and independent tumor set. Nevertheless, it was possible to replicate the results of a number of genes and evidence their prognostic relevance. These included the repression of HEY2 and TRIM22 for high-risk tumors or

mortality. Weaker correlations were verified for the repression of TRIM22 and VEGF with the histological risk and for overexpression of TERT and repression of TRIM22 with later relapse. Since the weaker expression of HEY2 and VEGF as well as the overexpression of CA9 was significantly linked to relapse, high malignant tumors or metastasis the hypoxia / angiogenesis pathways should be investigated in Wilms tumors especially with regard to the progression and spreading of tumors. Finally, multivariate analysis substantiated a weak association of repression of TOP2A and TRIM22 with metastasis or death and of overexpression of TERT with subsequent relapse. Most interestingly, histology, the current gold standard used for prediction of risks for relapse and death, could not be verified as potent prognostic factor for neither of them. Hence, realtime RT-PCR analyses can aid in stratification of tumors and prediction of relapse and death risks to intensify therapy for high-risk patients on one hand and to reduce therapy and side-effects in low-risk patients on the other hand.

Based on the results of the realtime RT-PCR analyses the expression of several genes was ascertained in primary cell cultures cultivated from native Wilms tumor material. Overexpression of MYCN, TRIM22 and especially HEY2 and EGR1 by viral transduction resulted in high rates of cell death. Unfortunately, the underlying mechanism of death could be determined neither for HEY2 nor for EGR1, though for EGR1 the involvement of apoptosis and senescence could be excluded. In contrast, death in MYCN and especially in TRIM22 overexpressing cells could be attributed to high rates of apoptosis. Furthermore, a large fraction of MYCN cells seem to enter cell senescence and stop to proliferate. These results clearly corroborate the proposed relevance of the investigated genes in the development and/or progression of Wilms tumors. Nevertheless, further experiments in different primary cell cultures of Wilms tumors are necessary to clarify the real potential of these genes.

Zusammenfassung

Der Wilms Tumor (WT), auch Nephroblastom genannt, zählt zu den im Kindesalter am häufigsten auftretenden malignen Tumoren und entsteht meist unilateral (90 – 95 %) und sporadisch (98 – 99 %). Leider sind bis heute die molekularen Ursachen, die zur Entwicklung dieser Tumoren führen nur unzureichend aufgeklärt. So werden bisher nur drei Gene mit dem Auftreten von WT in Verbindung gebracht: WT1, CTNNB1 und WTx. Während WT1 und CTNNB1 jeweils Mutationsraten von etwa 10 – 15 % aufweisen, die zudem häufig gemeinsam vorliegen, werden für WTx Mutationsraten von etwa 30 % beobachtet. Die genetischen Alterationen der anderen Tumoren sind noch immer komplett unbekannt.

Ziel dieser Arbeit war aus diesem Grund die Identifikation von relevanten Regionen und Genen, die an der Entstehung bzw. dem klinischen Fortschreiten von Wilms Tumoren beteiligt sind. Zusätzlich sollten weitere Untersuchungen zur Einschätzung ihres prognostischen Potenzials dienen.

In einem ersten Ansatz wurden die Chromosomenbereiche 11q und 16q in einer großen Anzahl von Wilms Tumoren auf LOH (=loss of heterozygosity), d.h. den (partiellen) Verlust von genetischem Material, untersucht. In beiden Fällen wurden erhöhte LOH-Raten von etwa 20 % beobachtet, jedoch war keine Eingrenzung der relevanten Regionen möglich, da Allelverluste nicht stets ab einem bestimmten Marker beobachtet wurden. Ein Vergleich mit der Histologie ergab signifikante Assoziationen der Allelverluste mit anaplastischen und Mischtyp-Tumoren (nur für LOH 11q), wohingegen kaum LOHs in epithelialen und stromareichen Tumoren festgestellt wurden. Somit scheinen auf 11q und 16q Gene vorzuliegen, die einerseits die Differenzierung in Epithel und Stroma begünstigen oder andererseits ein blastemreiches und anaplastisches Erscheinungsbild verhindern. Jedoch könnte auch die Assoziation von bestimmten Subtypen mit LOH 11q und 16q auf eine Entstehung aus unterschiedlichen Zellen hindeuten. Weiterhin war das Auftreten von LOH, v.a. wenn jeweils der komplette Chromosomenarm betroffen war, mit einem erhöhten Rezidiv- und Sterberisiko (nur LOH 11q) verbunden. Somit konnte gezeigt werden, dass LOH-Untersuchungen auf 11q und 16q zur Identifikation von Hochrisikopatienten für die Entwicklung von Rezidiven bzw. erhöhter Mortalität eingesetzt werden können, wodurch eine individuelle Anpassung der Therapiemaßnahmen ermöglicht wird.

In einem zweiten Ansatz wurden eine Reihe von bereits publizierten potenziellen Markergenen in einer großen Anzahl von Wilms Tumoren mit Hilfe der Realtime RT-PCR auf ihre Relevanz überprüft. Allen diesen Genen wurde zuvor eine Funktion bei der histologischen Klassifikation der Tumoren bzw. bei der Vorhersage bestimmter klinischer

Verläufe zugeschrieben. Die univariate Analyse diente der Beurteilung der Relevanz einzelner Gene, wohingegen die multivariate Analyse zur Bestimmung von prognostischen Genkombinationen eingesetzt wurde. Anschließend erfolgte die Validierung mittels eines zweiten und unabhängigen Tumorsatzes. Auch wenn viele der bereits publizierten Marker und in der ersten Analyse erhaltenen Assoziationen in einem weiteren und unabhängigen Tumorsatz nicht verifizierbar waren, konnten dennoch einige frühere Ergebnisse repliziert und die Relevanz der entsprechenden Gene nachgewiesen werden. Neben der Verbindung der Repression von HEY2 und TRIM22 mit Hochrisikotumoren bzw. einer höheren Sterbewahrscheinlichkeit fanden sich schwach signifikante Assoziationen auch für die verminderte Expression von TRIM22 und VEGF mit der Histologie. Ebenso waren erhöhte Level von TERT und die Repression von TRIM22 mit der Entwicklung eines Rezidivs verbunden. Vor allem aber die Korrelation der Repression von HEY2 und VEGF sowie einer Überexpression von CA9 mit Rezidiven, Tumoren hoher Malignität oder primären Metastasen verweisen auf die Notwendigkeit, besonders die Hypoxie- und Angiogenese-Signalkaskaden in Wilms Tumoren zu untersuchen, um deren Einfluss v.a. auf das Fortschreiten und die Ausbreitung der Tumoren zu evaluieren. Auch wenn die multivariate Analyse nicht zu relevanten Genkombinationen führte, konnte hier dennoch eine schwache Assoziation der verminderten Expression von TOP2A und TRIM22 mit primären Metastasen oder einer erhöhten Mortalität, sowie der Überexpression von TERT mit der Rezidivbildung bestätigt werden. Interessanterweise stellte sich die Histologie, die derzeit das Hauptkriterium für die Risikoklassifikation darstellt, weder als geeigneter prognostischer Marker für die Beurteilung des Rezidiv- noch des Sterberisikos heraus. Somit sollten Realtime RT-PCR Analysen in Zukunft als weiterer Faktor zur Beurteilung des Rezidiv- und Sterberisikos eingesetzt werden, um eine individuelle Anpassung der Therapie zu ermöglichen.

Basierend auf den Ergebnissen der Realtime RT-PCR Analyse wurde der Einfluss der Expression ausgewählter Gene auf Primärkulturen, die aus nativem Wilms Tumormaterial gewonnen wurden, untersucht. Nach der Überexpression von HEY2, EGR1, MYCN und TRIM22 wurden bei allen Zellen hohe Sterberaten beobachtet, v.a. bei HEY2 und EGR1. Leider konnte weder für HEY2 noch für EGR1 der Grund hierfür aufgeklärt werden, allerdings war bei EGR1 weder die Apoptose noch die Seneszenz beteiligt. Im Gegensatz hierzu wurde die Apoptose als entscheidender Mechanismus bei MYCN und v.a. TRIM22 ermittelt. Außerdem scheint bei MYCN ein großer Anteil an Zellen in die Seneszenz einzutreten. Auch wenn diese ersten Untersuchungen an Primärkulturen von Wilms Tumoren eindeutig die Relevanz dieser Gene für die Entwicklung bzw. das Fortschreiten der Tumoren bestätigten, so sind trotz alledem weitere Experimente v.a. in einer größeren Anzahl genetisch unterschiedlicher Primärkulturen nötig, um das endgültige Potenzial dieser Gene aufzuklären.

1. Einleitung

Jeder Mensch besteht aus 10^{13} - 10^{14} Zellen, die zu jedem Zeitpunkt einer strengen Kontrolle unterliegen, welche ein Gleichgewicht zwischen Zellteilung, Zelldifferenzierung, natürlicher Zellalterung und Zelltod herstellt. Dies führt schließlich dazu, dass z.B. Organe eine bestimmte Größe erreichen, diese jedoch nicht überschreiten. Hierbei hören normale Zellen generell ab einem bestimmten Zeitpunkt oder einer gewissen Dichte auf zu proliferieren und beginnen stattdessen zu differenzieren. Gelingt es einzelnen Zellen jedoch dieser Kontrolle zu entkommen, wird das Verhältnis zwischen diesen Prozessen gestört, was schließlich zu einer malignen Entartung (=Krebs) führen kann.

Krebszellen besitzen eine Reihe von charakteristischen Merkmalen, z.B. unkontrollierte Proliferation auf Kosten von Differenzierung, was sich schließlich in einer Nettozunahme der Zellmasse auswirkt. Des Weiteren reagieren sie nicht mehr auf Signale, die zum programmierten Zelltod führen, sind (weitgehend) unabhängig von Wachstumsfaktoren und Anheftungsmöglichkeiten und besitzen eine veränderte Zell-Zell-Kommunikation. Letztlich ermöglicht ihnen eine erhöhte Mobilität, sich vom Zellverband am Ursprungsort zu lösen, Gefäßwände zu durchdringen und sich in fernen Körperregionen festzusetzen, um dort erneut zu proliferieren (Metastasenbildung).

1.1 Krebserkrankungen im Kindesalter

Krebs ist, nach Herz- und Gefäßerkrankungen, die zweithäufigste Todesursache in westlichen Ländern. Auch wenn die meisten Krebserkrankungen Erwachsene betreffen, so treten diese zu einem kleinen Prozentsatz (unter 1 %) auch schon im Kindesalter auf. Die Inzidenz liegt hierbei in Deutschland bei 13,7 Neuerkrankungen pro Jahr pro 100.000 Kindern unter 15 Jahren, d.h. insgesamt sind etwa 0,2 % aller Kinder unter 15 Jahren betroffen (Kaatsch et al., ed. 2002). Im Gegensatz zu Erwachsenen, die oft epi- und endodermale Neoplasien entwickeln, sieht man im Kindesalter häufig Malignome mesodermalen Ursprungs. Leukämien und maligne Lymphome machen mit 47 % den Hauptteil der Kindertumoren aus, jedoch werden auch häufig Tumoren des Zentralnervensystems und Sarkome des Bindegewebes und Knochens diagnostiziert. Ebenso sind embryonale Tumoren, wie Neuroblastom, Nephroblastom, Medulloblastom, Retinoblastom, embryonales Rhabdomyosarkom, Keimzelltumoren und Hepatoblastom, stark vertreten (vgl. Abb. 1). Es wird angenommen, dass diese bereits pränatal angelegt sind, da sie zumeist Kinder unter 5 Jahren betreffen.

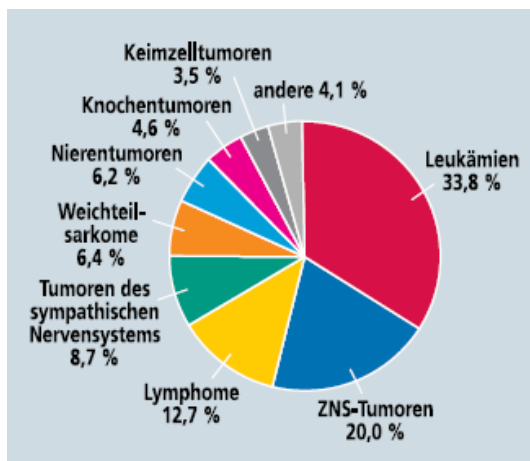


Abb. 1: Relative Häufigkeit der Tumoren im Kindesalter (Creutzig et al., 2003).

1.2 Der Wilms Tumor

Der Wilms Tumor (WT) wurde benannt nach dem Pathologen Max Wilms (1867-1918), der 1899 in seiner Abhandlung über „Die Mischgeschwülste der Niere“ zum ersten Mal verschiedene Formen kindlicher Nierentumoren beschrieb und diese trotz ihrer Verschiedenheit als Einheit betrachtete. Der Wilms Tumor gehört zu der Gruppe der embryonalen Tumoren und ist der häufigste maligne Nierentumor bei Kindern. Die Inzidenz des Wilms Tumors, auch Nephroblastom genannt, liegt bei 1:10.000 Lebendgeburten und wird zumeist vor dem 5. Lebensjahr diagnostiziert, häufig im Alter von 2 bis 3 Jahren (Lee and Haber, 2001). Zudem sind etwa 15 % der Patienten Säuglinge. Üblicherweise entwickelt sich der WT unilateral (90 - 95 %) und sporadisch (98 – 99 %) (Huff, 1998), jedoch tritt er in 5 – 10 % der Fälle auch bilateral auf. Da bei dieser Form die Kinder meist noch erheblich jünger sind wird angenommen, dass es sich hierbei um eine genetisch vererbte Variante (familiärer WT) handelt und eine bereits vorliegende Mutation in der Keimbahn den Ausbruch der Krankheit beschleunigt.

1.2.1 Diagnose

Die Diagnose des Wilms Tumors erfolgt meist zufällig, da er oft keine Beschwerden verursacht, sondern eher durch eine asymptomatische Schwellung des Bauchraumes auffällt. Eltern des Kindes berichten vielfach von einem „harten oder dicken Bauch“ ohne zusätzliche Beschwerden.



Abb. 2: Kind mit Wilms Tumor.
Auffällig ist die starke, linksseitige Schwellung des Bauchraumes.

Ca. 10 % der Tumoren werden während regulärer Vorsorgeuntersuchungen (vorwiegend U3 und U4) vom Kinderarzt entdeckt. Das häufigste klinische Symptom nimmt mit ca. 15 % die Hämaturie ein, andere Symptome treten eher selten auf. Tab. 1 fasst die Symptome und deren Häufigkeit bei Vorliegen eines Wilms Tumors zusammen.

Symptom	Häufigkeit [%]
Asymptomatische Oberbauchschwellung	61,6
Hämaturie	15,1
Vorsorgeuntersuchung	9,2
Obstipation	4,3
Gewichtsverlust	3,8
Harnwegsinfekt	3,2
Diarrhö	3,2
Trauma als Aufnahmediagnose	2,7
Nausea, Erbrechen, Schmerzen, Hemie, Pleuraerguss, Hyperkalzämie und hoher Blutdruck	<2

Tab. 1: Klinische Symptome bei Diagnose eines Nephroblastoms (Furtwängler et al., 2005).

Wilms Tumoren wachsen in der Regel sehr schnell und sind bei der Diagnose oft sehr groß. Das mediane Tumolvolumen liegt bei 353 ml (Graf et al., 2004), im Gegensatz zum durchschnittlichen Nierenvolumen eines 6-jährigen Kindes von etwa 50 bis 55 ml. Der Grund für die enorme Größe vieler WT mag aber auch in der späten Entdeckung des Tumors auf Grund fehlender klinischer Symptome liegen, da wie bereits oben erwähnt, der Tumor meist erst durch die abnorme Schwellung des Bauchraumes selbst auffällt.

Zur Diagnosestellung werden derzeit verschiedene Verfahren eingesetzt. Bedeutend hierbei sind v.a. bildgebende Untersuchungen, wie die abdominelle Sonographie und weitere bildgebende Schnittverfahren wie CT oder MRT, wobei letzteres bevorzugt eingesetzt wird. Diese Verfahren dienen unter anderem zur Bestimmung des Tumolvolumens und zur Untersuchung der kontralateralen Niere, um das Vorliegen eines bilateralen Wilms Tumors auszuschließen. Fehldiagnosen sind mit unter 1 % sehr gering.

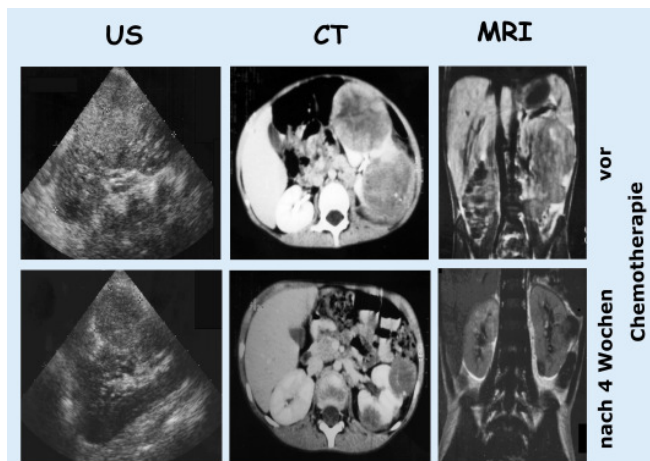


Abb. 3: Sonographie (US), CT und MRT eines Wilms Tumors, vor und nach 4-wöchiger präoperativer Chemotherapie (Furtwängler et al., 2005).

Im Anschluss wird bei den meisten Kindern mit Wilms Tumor mit einer Chemotherapie begonnen. Eine Biopsie erfolgt nur bei uneindeutiger Diagnose bei Kindern unter 6 Monaten bzw. über 16 Jahren, da bei diesen die Entwicklung eines andersartigen Nierentumors wahrscheinlicher ist. Leider gibt es bisher keinen spezifischen Tumormarker, der sich im Blut oder Urin nachweisen lässt und eindeutig auf einen Wilms Tumor hinweist. Dennoch können Blut und Urin für die Differenzialdiagnose eingesetzt werden. Der Nachweis von Katecholaminen in Urin und Serum z.B. weist auf das Vorliegen eines Neuroblastoms hin, der wichtigsten Differenzialdiagnose zum Wilms Tumor.

Des Weiteren können gonadale Dysgenesien, urogenitale Fehlbildungen, Aniridie, Hemihypertrophie und andere Dysmorphiezeichen auf das Vorliegen eines Wilms Tumor-assoziierten Syndroms hinweisen (s. 1.2.2).

1.2.2 Assoziierte Syndrome

Wilms Tumoren treten häufig in Kombination mit weiteren, teilweise sehr unterschiedlichen, Fehlbildungen auf. Hierbei sind v.a. Hemihypertrophie, Aniridie und urogenitale Fehlbildungen, wie Kryptorchismus, Hypospadie, Pseudohermaphroditismus und Gonadendysgenese zu erwähnen. Patienten mit Hemihypertrophie und Aniridie sollten regelmäßig auf die Entstehung eines Nephroblastoms untersucht werden, da diese Anomalien normalerweise höchst selten sind und durch das hohe, assoziative Auftreten auf einen Wilms Tumor hinweisen können.

Eine detaillierte Aufstellung der Wilms Tumor-assoziierten Syndrome und deren Symptome gibt Tab. 2.

Syndrom	Symptome
Denys-Drash	Pseudohermaphroditismus, Glomerulopathie, Wilms-Tumor
WAGR	Wilms-Tumor, Aniridie, Urogenitaltrakt Fehlbildungen, Retardierung
Wiedemann-Beckwith (EMG)	Omphalozele, Makroglossie, Gigantismus, Hemihypertrophie, Kerbenohr
Perlman	Nephroblastom/Nephroblastomatose, fetale Makrosomie, Mikrognathie, Kryptorchismus Langerhans-Zell-Hyperplasie (Hyperinsulinismus), Hypoglykämie, typische Fazies (tiefsitzende Augen Hypertelorismus, betonte Stirn, Epikanthus, Retrognathie)
Sotos	Konnatale Makrosomie, Hochwuchs, psychomotorische Entwicklungsstörung, typische Fazies (Stirnplatte, Akrozephalos, nach außen abfallende Lidachse, Hypertelorismus)
Bloom	Zierlicher Körperbau, Minderwuchs, teleangiektatisches Ekzem, schlankes und langes Gesicht mit betonter Nase
Simpson-Golabi-Behmel	Makrosomie, Hypertelorismus, präaurikuläre Anhängsel, Herzfehler, Polysplenie, Skelettfehlbildung

Tab. 2: Mit Wilms Tumoren assoziierte Syndrome, modifiziert nach (Furtwängler et al., 2005).

1.2.3 Histologie

1.2.3.1 Nephrogene Reste und Nephroblastomatose

Als Vorstufe des Wilms Tumors werden persistente, nephrogene Reste (NR) angesehen bzw. die Nephroblastomatose, das diffuse oder multifokale Vorkommen nephrogener Reste. NR sind mikroskopische Missbildungen der sich entwickelnden Niere, die sich aus embryonalen Zellen oder deren Nachfolgerzellen zusammensetzen und ungewöhnlicherweise bis nach der Geburt erhalten bleiben. Da diese in mehr als 1/3 der Nieren, die wegen eines Wilms Tumors entfernt wurden und in allen Patienten mit bilateralem Wilms Tumor, dagegen nur in 0,9 % aller Kinder ohne Wilms Tumor diagnostiziert werden, wird angenommen, dass die maligne Entartung dieser Reste zur Entstehung eines Wilms Tumors führt. Jedoch deutet das bloße Vorkommen nicht zwangsläufig auf die Entwicklung eines WT hin, da mikroskopische Herde solcher Zellen in Säuglingen ca. 20 – 30 x häufiger vorliegen als sich tatsächlich Tumoren entwickeln.

Je nach Vorkommen in der Niere und ihrer zellulären Bestandteile werden nephrogene Reste in zwei Typen unterteilt, die perilobären (PLNR) und die intralobären (ILNR) NR. Perilobäre NR entstehen ausschließlich in der Peripherie des Nierenlappens, sind klar von der Niere abgegrenzt und bestehen aus Blastem- oder embryonalen Epithelzellen. Tumoren mit diesen Resten entstehen erst relativ spät. Intralobäre NR kommen überall im Nierenlappen, im Sinus renalis oder den Wänden des Sammelrohrsystems vor. Diese setzen sich meist aus verschiedenen Zelltypen, eingeschlossen unreifem oder entwickeltem Stroma, zusammen und liegen zwischen normalentwickelten Nephronen, wobei die Grenze zwischen diesen beiden Strukturen häufig nicht mehr klar definierbar ist (Beckwith, 1998). Tumoren, die ILNR aufweisen entwickeln sich meist sehr früh.

1.2.3.2 Wilms Tumor

Der klassische Wilms Tumor setzt sich aus drei verschiedenen histologischen Komponenten zusammen und wird deshalb als „triphasisch“ bezeichnet. Hierbei sind sowohl epitheliale und stromale Komponenten, sowie Blastem- bzw. undifferenzierte mesenchymale Zellen im Tumor zu finden (s. Abb. 4).

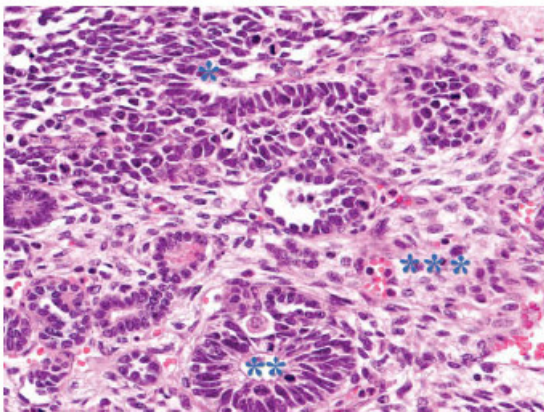


Abb. 4: Histologie eines klassischen, „triphasischen“ Wilms Tumors mit Blastem (*), Epithel (**) und Stroma (***) (Han et al., 2007).

Jedoch gibt es auch Tumoren, in denen einer dieser Zelltypen dominiert. Diese werden dann als stroma-, epithel- oder blastemreiche Tumoren bezeichnet. Zusätzlich spielen noch weitere Kriterien für die histologische Klassifikation eine Rolle, die für die Prognose entscheidend sind, wie z.B. der Anteil an nekrotischen Arealen im Tumor. So können nach der präoperativen Chemotherapie auch regressive bzw. komplett nekrotische Tumoren vorliegen. Ein weiteres, wichtiges Kriterium ist die Anaplasie, die oft mit einer höheren Resistenz gegenüber der Chemotherapie verbunden ist. Sie wird in ca. 5 % aller WT diagnostiziert, häufiger bei älteren Kindern. Tumoren mit Anaplasie werden weiterhin in zwei Gruppen unterteilt. Die fokale Anaplasie ist auf einen oder mehrere klar definierte

Bereiche des Primärtumors beschränkt und weitet sich nicht auf extrarenale oder metastatische Bereiche aus. Im Gegensatz dazu steht die diffuse Anaplasie.

Die genaue histologische Klassifikation dient der Einteilung der Tumoren in verschiedene Hauptgruppen und ist von prognostischer Bedeutung. So werden Wilms Tumoren insgesamt in 3 Gruppen unterteilt: Tumoren mit

- 1) niedriger Malignität
- 2) intermediärer Malignität
- 3) hoher Malignität

Nicht zuletzt wird zwischen primär operierten Tumoren und Tumoren nach präoperativer Chemotherapie unterschieden. Dies betrifft v.a. den blastemreichen Tumor, der nach Primäroperation als intermediär maligner, nach präoperativer Chemotherapie jedoch als hochgradig maligner Tumor eingestuft wird.

Eine Übersicht über die genaue Einteilung gibt Tab. 3.

Malignitätsgrad	Tumoren nach Primäroperation	Tumoren nach präoperativer Chemotherapie
Niedrige Malignität	<ul style="list-style-type: none"> • Mesoblastisches Nephrom* • Zystisch partiell differenziertes Nephroblastom (CPDN) 	<ul style="list-style-type: none"> • Mesoblastisches Nephrom* • Zystisch partiell differenziertes Nephroblastom (CPDN) • Komplettnekrotisches N.
Intermediäre Malignität	<ul style="list-style-type: none"> • Epithelreiches N. • Stromareiches N. • Mischtyp • N. mit fokaler Anaplasie • Blastemreiches N. 	<ul style="list-style-type: none"> • Epithelreiches N. • Stromareiches N. • Mischtyp[§] • Regressives N.[§] • N. mit fokaler Anaplasie[§]
Hohe Malignität	<ul style="list-style-type: none"> • N. mit diffuser Anaplasie • Klarzellensarkom der Niere* • Rhabdoidtumor der Niere* 	<ul style="list-style-type: none"> • Blastemreiches N. • N. mit diffuser Anaplasie • Klarzellensarkom der Niere* • Rhabdoidtumor der Niere*

Tab. 3: Überarbeitete Klassifikation der Nierentumoren entsprechend der SIOP2001/GPOH-Studie (Vujanic et al., 2002).

* heute nicht mehr den Wilms Tumoren zugeordnet

[§]Tumoren mit präoperativen Volumina >500 ml werden entsprechend Hochrisikoprotokoll behandelt

Zusätzlich zur histologischen Klassifikation erfolgt die Einteilung der Tumoren in 5 Stadien, neben der Histologie der bedeutendste prognostische Faktor. Beim sog. „Staging“ werden die Ausdehnung und Operabilität des Tumors, Lymphknotenbefall, eine mögliche Metastasierung und das Vorliegen eines bilateralen Wilms Tumors berücksichtigt (s. Tab. 4).

Stadium	Ausdehnung
Stadium I	Der Tumor ist auf die Niere beschränkt, die Tumorkapsel wird nicht überschritten. Der Tumor kann vollständig entfernt werden
Stadium II	Der Tumor überschreitet die Tumorkapsel. Der Tumor kann vollständig entfernt werden. Lymphknoten sind nicht befallen
Stadium III	Unvollständige Tumorentfernung bei Fehlen hämatogener Metastasen. Befall regionaler Lymphknoten
Stadium IV	Fernmetastasen, insbesondere in Lunge, Leber, Knochen und Gehirn
Stadium V	Bilaterales Nephroblastom

Tab. 4: Stadieneinteilung des Nephroblastoms nach der SIOP2001/GPOH-Studie (Graf and Reinhard, 2003).
Für Stadien IV und V erfolgt ferner die Bestimmung des lokalen Stadiums (I-III).

1.2.4 Therapie

Während die „National Wilms Tumor Study“ (NWTs) in den USA die Primäroperation für alle Wilms Tumoren vorsieht, wird in Europa, entsprechend dem SIOP/GPOH-Protokoll (International Society of Pediatric Oncology; Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie), die Behandlung der meisten Patienten nach sicherer bildgebender Diagnose mit einer präoperativen Chemotherapie begonnen. Nur bei Kindern unter 6 Monaten bzw. über 16 Jahren wird primär operiert. Der Vorteil einer chemotherapeutischen Behandlung vor der Operation besteht in der deutlichen Volumenreduktion des Tumors, im Schnitt um mehr als die Hälfte des Ausgangsvolumens, was das Risiko einer Tumorruptur erheblich vermindert. Zudem erhöht sich der Prozentsatz der Patienten im Stadium I auf 60 %. Nach erfolgter Chemotherapie lässt sich des Weiteren eine Veränderung in der Verteilung der Subtypen mit Standardhistologie beobachten. Während epithel- und v.a. blastemreiche Tumoren stark zurückgehen, nimmt die Häufigkeit von stromareichen Tumoren deutlich zu. Es scheint, als ob Blastemzellen gegenüber der Chemotherapie sehr sensitiv, Stromazellen hingegen eher resistent sind. Eine alternative Erklärung wäre, dass die Chemotherapie lediglich zu einer Differenzierung der Zellen in Stromazellen führt.

Generell kommen als Chemotherapeutika Vincristin und Actinomycin D zum Einsatz, Anthrazykline werden nur bei primär metastasierten Wilms Tumoren verabreicht. Die Behandlung erstreckt sich über 4 Wochen bzw. 6 Wochen bei primären Metastasen. Im Anschluss daran erfolgt die Nephrektomie. Patienten mit bilateralem WT werden ebenfalls

mit den oben genannten Chemotherapeutika behandelt, jedoch richtet sich die Therapiedauer hier danach, möglichst nierenerhaltend operieren zu können (partielle Nephrektomie).

Die Entscheidung, ob eine postoperative Therapie notwendig ist erfolgt derzeit auf Grundlage der histologischen Klassifikation und des Stadiums.

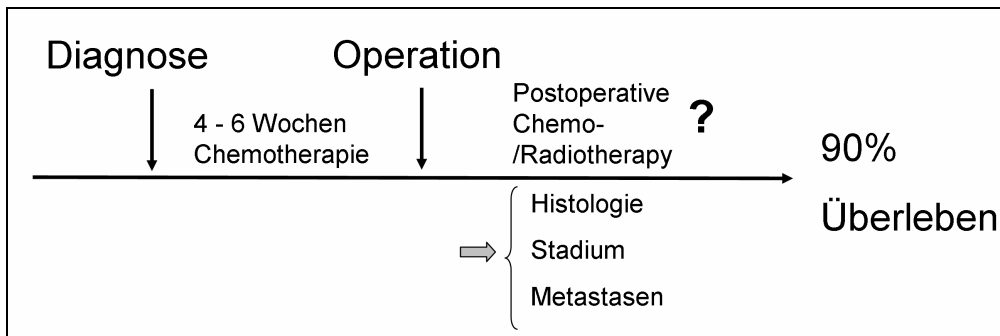


Abb. 5: Übersicht über die derzeit entsprechend dem SIOP/GPOH-Protokoll angewandte Therapiestrategie.

1.2.5 Prognose

Insgesamt gesehen ist die Prognose für Patienten mit Wilms Tumor gut. Mit der heute angewandten Therapie können 90 % aller Kinder mit Nephroblastom geheilt werden. Jedoch hängt die Heilungsrate stark von der vorliegenden Histologie und dem Stadium des Tumors ab. Während Patienten mit niedriger bzw. intermediärer Malignität mit einer ereignisfreien Überlebensrate von 100 % bzw. 93 % sehr gute Heilungschancen besitzen, liegt die 2-jährige rezidivfreie Überlebensrate bei Vorliegen von hochmalignen Tumoren, die etwa 10 % aller Wilms Tumoren ausmachen, bei unter 50 %. Auch Patienten mit bilateralem Wilms Tumor und Metastasen haben eine eher schlechte Prognose.

1.2.6 Rezidive

Etwa 10 - 15 % aller Patienten bekommen ein Rezidiv, in der Regel innerhalb der nächsten zwei Jahre nach der Primärdiagnose, wobei das Risiko hierfür mit höherer Malignität und Stadium zunimmt. Zur frühzeitigen Erkennung eines Rezidivs werden regelmäßig Nachsorgeuntersuchungen durchgeführt, welche sowohl klinische als auch bildgebende Verfahren, wie Ultraschall und Röntgen, beinhalten. Die Therapie setzt sich aus chirurgischen, chemo- und strahlentherapeutischen Maßnahmen zusammen, wobei die Therapeutika nach der Initialtherapie ausgewählt werden und nur primär noch nicht eingesetzte Mittel zur Anwendung kommen.

1.2.7 Molekulare Ursachen

Die genetischen Ursachen, die zur Entstehung von Wilms Tumoren führen sind immer noch weitgehend unbekannt. Lange Zeit ging man davon aus, dass das „Two-Hit-Modell“ von Knudson und Strong vom Retinoblastom auch auf den Wilms Tumor übertragbar sei und somit zwei aufeinander folgende Mutationen in einem bestimmten Gen zur Entwicklung dieses Tumors führen (Knudson and Strong, 1972).

1.2.7.1 WT1, β -Catenin (CTNNB1) und WTx

1990 gelang es zwei Gruppen gleichzeitig ein Gen auf 11p13 zu identifizieren, das mit der Entwicklung von Wilms Tumoren in Verbindung gebracht werden konnte: WT1, das Wilms Tumorsuppressorgen 1 (Call et al., 1990; Gessler et al., 1990). Allerdings ist dieses Gen nur in ca. 10 - 15 % aller Wilms Tumoren mutiert (Gessler et al., 1994), kann also nicht allein für die Entstehung dieser Tumoren verantwortlich sein. β -Catenin (CTNNB1), welches im Wnt-Signalweg eine Rolle spielt, weist etwa die gleiche Mutationsrate wie WT1 auf (Koesters et al., 1999). Interessanterweise treten Mutationen in WT1 und CTNNB1 oft gemeinsam auf (Maiti et al., 2000). Erst kürzlich konnte ein neues Gen identifiziert werden, das in ca. 30 % aller Wilms Tumoren Mutationen trägt und auf dem X-Chromosom lokalisiert ist: WTx (Rivera et al., 2007). WTx scheint die Ubiquitinierung und den Abbau von CTNNB1 zu fördern, was der Signalübertragung über den Wnt/CTNNB1 Signalweg entgegenwirkt (Han et al., 2007).

1.2.7.2 LOH und LOI

Die Ursachen der meisten Tumoren scheinen jedoch weitaus komplexer und nicht auf ein einzelnes Gen zurückführbar zu sein. So spielen neben Genmutationen der Verlust von Heterozygotie (loss of heterozygosity = LOH) und Imprinting (loss of imprinting = LOI) eine Rolle, wodurch die Entstehung dieser Tumoren ebenso komplex ist wie die maligner Tumoren Erwachsener. LOH bedeutet den (partiellen) Verlust von genetischem Material, der durch Deletion, Genkonversion, mitotische Rekombination oder den Verlust eines kompletten Chromosoms entstehen kann. Dieser wird meist durch die Duplikation des verbliebenen Schwesterchromosoms bzw. Teilen davon ausgeglichen. Beim Imprinting ist ein Allel eines Gens methyliert und somit inaktiviert, wodurch das Gen nur von dem nicht-methylierten Allel exprimiert werden kann. Dies geschieht u.a. zur Dosiskompensation zwischen Männern und Frauen bei Genen auf dem X-Chromosom. Ein Verlust dieses Imprintings (LOI) bedeutet den Verlust der Methylierung, was zur biallelischen Expression des Gens führt. Auf Grund der Beteiligung dieser Vorgänge scheint die Entstehung der Tumoren ebenso komplex wie die maligner Tumoren Erwachsener. Allerdings besitzen WT zumeist einen euploiden Chromosomensatz und zeigen oft nur sehr geringe LOH-Raten ($\leq 5\%$) (Huff, 1998), was sie von Tumoren Erwachsener deutlich abgrenzt.

Basierend auf dieser relativ hohen genomischen Stabilität dienen WT hervorragend zur Erforschung der Ursachen der Tumorentstehung, da entdeckte genetische Alterationen in einem Tumor als unmittelbare Ursache für dessen Entwicklung angenommen werden können. Deshalb wurden in den letzten Jahrzehnten zahlreiche Studien durchgeführt, die zur Identifikation weiterer Tumorsuppressorgene in Wilms Tumoren führen sollten.

1.2.7.3 LOH-Analysen zur Identifikation involvierter Loci/Gene

LOH-Analysen sollten ebenso zur Identifikation neuer prognostischer Marker für Wilms Tumoren bzw. weiterer Wilms Tumorsuppressorgene führen. Frühere Studien zeigten, dass an mehreren Stellen im Genom von Wilms Tumoren gehäuft Allelverluste auftreten. Hierbei fielen v.a. zwei Regionen besonders auf, 11p15 und 16q, mit LOH-Raten von 33 bzw. 20 %, weswegen vermutet wurde, dass hier ein potenzielles zweites (WT2) und drittes (WT3) Wilms-Tumorsuppressorgen lokalisiert sei (Reeve et al., 1989; Maw et al., 1992). Jedoch konnten bis heute keine Kandidatengene in diesen Regionen identifiziert werden, die als solche in Frage kämen, auch wenn z.B. die Region auf Chromosom 16q bis auf 6,7 Megabasen eingeschränkt werden konnte (Safford et al., 2003). Mittlerweile geht man davon aus, dass besonders in der Region 11p15.5 eher die genomische Prägung eine Rolle spielt, da hier gehäuft Gene vorliegen, die Imprinting aufweisen (Smith et al., 2007). Der Verlust dieser Prägung, anstelle einer Mutation, könnte somit für die Tumorentstehung bzw. das Fortschreiten des Tumors verantwortlich sein. So konnte z.B. LOI (loss of imprinting) von IGF2, einem Gen, das in eben dieser Region lokalisiert ist, mit bestimmten Subtypen von WT in Verbindung gebracht werden (Ravenel et al., 2001). Jedoch scheint auch eine erhöhte Expression von IGF2 in Kombination mit LOH 11q und Trisomie 12 entscheidend zu sein (Watanabe et al., 2006).

Des Weiteren konnte mittels vergleichender genomischer Hybridisierung gezeigt werden, dass Zugewinne von 1q bei Patienten mit Tumoren niedriger/intermediärer Malignität ein erhöhtes Rezidivrisiko bedingen (Hing et al., 2001).

Weitere LOH-Studien, die mit einer geringeren Anzahl von Wilms Tumoren durchgeführt wurden, stellten erhöhte Raten von Allelverlust in den Regionen 7p und 11q fest (Radice et al., 1995; Miozzo et al., 1996). Mittels einer späteren, größer angelegten Studie in 82 Wilms Tumoren konnte dies für die Region 11q bestätigt werden, zudem zeigten sich ebenfalls höhere LOH-Raten auf 22q. Des Weiteren ergaben Vergleiche mit den klinischen Daten der Patienten, dass Allelverluste in beiden Regionen mit dem Auftreten von Anaplasie, Rezidivbildung und einer schlechten Prognose assoziiert waren, weshalb die Untersuchung dieser Regionen bei Wilms Tumor Patienten von prognostischer Bedeutung zu sein schien (Klamt et al., 1998). Eine genomweite LOH-Analyse aus dem Jahr 2005 bestätigte chromosomale Veränderungen in bereits immer wieder publizierten Regionen, wie 1p, 11p, 11q und 16q, konnte zudem aber auch eine neue Region identifizieren, die

bisher unentdeckt geblieben war: 9q22.2-q31.1 (Ruteshouser et al., 2005). Eine zweite Untersuchung des kompletten Genoms von WT auf LOH mit Hilfe von SNP chips zeigte den höchsten Prozentsatz von Allelverlusten auf 11p15, zusätzlich wiesen auch diverse andere Regionen erhöhte LOH-Raten auf, wie 1p, 4q, 7p, 11q, 14q, 16q und 17p. Somit konnten wieder mehrere bereits bekannte Bereiche bestätigt, zugleich aber auch neue Regionen identifiziert werden. Des Weiteren gelang es, die neu entdeckte Region auf 4q auf 2,4 Megabasen (4q24-q25), jedoch nicht auf ein bestimmtes Gen, einzuschränken. Interessanterweise wurden LOHs von 1p, 14q, 16q und 17p vermehrt in fortgeschrittenen Tumoren gefunden (Yuan et al., 2005).

Ebenfalls 2005 publizierte die Amerikanische NWTs, die nur primär operierte Tumoren untersucht, eine Studie, die ein weiteres Mal erhöhte LOH-Raten auf 1p und 16q bekräftigte. Zusätzlich waren Verluste der Chromosomenregionen 1p und/oder 16q mit einem erhöhten Rezidivrisiko und einer schlechten Prognose assoziiert. Jedoch galt dies nur für Patienten mit Tumoren niedriger/intermediärer Malignität des Stadiums I und II, wohingegen bei Patienten des Stadiums III und IV nur ein gleichzeitiger Verlust beider Regionen in diesen Assoziationen resultierte (Grundy et al., 2005). Erst kürzlich konnte auch die Region von LOH auf 1p auf einen Bereich von 2,32 Megabasen (1p36.22-1p36.33) eingeschränkt werden, allerdings war auch hier die Identifikation eines potenziell relevanten Gens bislang nicht möglich (Tamimi et al., 2007).

1.2.7.4 Weitere mit Wilms Tumoren assoziierte Gene

Neben LOH-Studien wurden diverse, weitere Methoden angewandt, um mehr über die Entstehung von Wilms Tumoren zu erfahren. Hierunter befanden sich unter anderem Studien auf dem RNA oder Proteinlevel, die helfen sollten, Zusammenhänge zwischen der Expression von Genen mit klinischen Parametern herzustellen, wie z.B. einem erhöhten Rezidivrisiko oder einem Fortschreiten des Tumors bis hin zu einer höheren Mortalität. Unter all diesen Genen, die mit Wilms Tumoren in Verbindung gebracht werden konnten befanden sich zahlreiche Gene, die bei der Apoptose eine Rolle spielen, wie BAX, BCL2, BCL-X_L und CD44_v5. Des Weiteren waren auch Gene, die der Signalübertragung in Zellen dienen involviert. Die Expression von TGF α war immunhistochemisch v.a. im Blastem von Tumoren zu finden, die ein fortgeschrittenes Krankheitsbild aufwiesen. War EGR1 im Blastem exprimiert, war dies mit einer schlechten Prognose assoziiert (Review s. (Ghanem et al., 2005)), ebenso wie eine generell erhöhte Expression des Tumorsuppressorgens DBC1 (Takahashi et al., 2002). Weiterhin waren zahlreiche Gene, die für die Zellproliferation wichtig sind mit verschiedenen klinischen Parametern von WT verknüpft: erhöhte Expressionslevel von TERT lagen in rezidivierenden Tumoren von niedriger/intermediärer Malignität vor (Dome et al., 2005), während sich eine übermäßige Expression von IGF2, STMN1 und TOP2A in Tumoren mit hohem Stadium fand

(Takahashi et al., 2002). Interessanterweise wirkte sich die Expression verschiedener Spleißvarianten von NTRK2 unterschiedlich auf die Tumorentwicklung aus. Während eine hohe Expression der Volle-Länge Variante NTRK2_full mit einem erhöhten Sterberisiko zusammenhing, bewirkte die verkürzte Isoform NTRK2_trunc genau das Gegenteil (Eggert et al., 2001). Zahlreiche weitere Gene konnten mit klinischen Daten der Tumoren verknüpft werden. Eine ausführliche Übersicht darüber gibt Tab. 9 (s. Ergebnisse).

1.3 Zielsetzung

In einem ersten Ansatz sollten LOH-Analysen der stets mit LOH assoziierten Chromosomenbereiche 11q und 16q durchgeführt werden, da diese bisher nur in wenigen Wilms Tumoren oder in eingeschränkten Bereichen untersucht worden waren. Ziel war es, die kritischen Regionen der Allelverluste weiter auf minimale Bereiche einzuschränken, um letztlich ein oder mehrere potenziell relevante(s) Gen(e) für die Tumorgenese bzw. das klinische Fortschreiten zu identifizieren. Die anschließende statistische Auswertung der LOH-Daten im Bezug auf die klinischen Daten der Tumoren sollte Einsicht in die mögliche prognostische und somit klinische Relevanz dieser Untersuchungen gewähren.

Weiterhin sollten Analysen bereits mit Wilms Tumoren assoziierter Gene, die mit diversen Methoden in zumeist nur wenigen Tumoren untersucht wurden, zeigen, ob diese auch in einer großen Anzahl von Tumoren und mit Hilfe der Realtime RT-PCR verifizierbar waren. Die statistische Auswertung der Expressionsdaten mit den klinischen Daten und die anschließende Validierung der Ergebnisse in einem zweiten und unabhängigen Tumorsatz sollten prognostisch relevante Gene herausfiltern.

Nachdem mit Hilfe der statistischen Analyse der Realtime RT-PCR Daten mehrere, viel versprechende Gene erhalten wurden, sollten von diesen sowohl cDNA-Überexpressions-, sowie shRNA-knockdown-Konstrukte kloniert werden, die mit Hilfe lentiviraler Transduktion in Primärkulturen von Wilms Tumoren transduziert werden sollten. Es sollte untersucht werden, wie sich die Überexpression bzw. Repression der entsprechenden Gene auf bestimmte Parameter der Zellen, wie z.B. das Zellwachstum, die Morphologie bzw. deren Apoptoserate, auswirkt.

2. Material

2.1 Primer

Primer wurden von den Firmen MWG Biotech GmbH (Ebersberg) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen) synthetisiert.

2.1.1 Primer für die LOH Analysen

Die Sequenzen der meisten verwendeten Primer wurden original der „Genome Data Base“ (<http://www.gdb.org/>) entnommen. Die mit einem * versehenen Primer wurden selbst mit Hilfe von Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) in die entsprechende Mikrosatelliten Region gelegt, da die Original-Primer nicht das gewünschte Amplifikat lieferten.

2.1.1.1 Primer für 11p

TH01	TH01_A	GTGGGCTGAAAAGCTCCCGATTAT
	TH01_B	ATCAAAGGGTATCTGGGCTCTGG
D11S1392	D11S1392_1	TTGCATCCATACGGAAAGTC
	D11S1392_2	ACATCTGAGACTTGTAGTAGAAGGC

2.1.1.2 Primer für 11q

D11S4076*	D11S4076_1	GTCCCCATGAATGCTCTTGT
	D11S4076_2	GGAGTCAGGGAAAGGTGTTG
D11S4139*	D11S4139_1	TATAGACTTCAGCCCTGCTGC
	D11S4139_2	CCTCTGTAGGATGCAGTTGG
D11S533	D11S533_1	CTCTGCCTAGTCCCTGGGTG
	D11S533_2	TGGGGGTCTGGGAACATG
D11S2002	D11S2002_1	GACATGGCCCTTCTTTTCATAG
	D11S2002_2	CCACCACACCAGCCAGTTAT
D11S1332	D11S1332_1	TATTAGGCAGGGTTTCCAGA
	D11S1332_2	CTTACAGATGGCCTCTCATAGA
D11S2000	D11S2000_1	AGTCCTCCTAGGTTTACATCTATCTCA
	D11S2000_2	TCTGTGAAATGTGCCAGTTAGC
D11S1987	D11S1987_1	ACTTAGTGGGGCTGGAGAGT
	D11S1987_2	ACATTGCAGTGAGTGGGATT
D11S2077	D11S2077_1	CAGGACAGAGCAGAGAAGGA
	D11S2077_2	CATCACCCCTTATCTCCACT
D11S925	D11S925_1	AGAACCAAGGTCGTAAGTCCTG

	D11S925_2	TTAGACCATTATGGGGGCAA
D11S934	D11S934_1	GCTGTCCCTGACAACACTACATGC
	D11S934_2	TTCCATCAGAACTGGGAATGAG
D11S4463	D11S4463_1	TGGATTGATCTGTCTGTCCGTC
	D11S4463_2	ACTTTATCCTATGGAAGCCATCA

2.1.1.3 Primer für 16q

D16S540	D16S540_1	CCTCCATAATCATGTGAGCC
	D16S540_2	GTGTCTTAATCTCCCCAACTCAAGACC
D16S3253*	D16S3253_1	GTT CAA GCA TGG GTG GAT AG
	D16S3253_2	TGGTACATAAAGCCATGGAAA
D16S3112	D16S3112_1	TACTTTGGAGCCCGAGG
	D16S3112_2	AGCCCCCAGTGGTGTTTAT
D16S2624*	D16S2624_1	CAATTTGTTACAGAGCCAACAGA
	D16S2624_2	GGTACCAAAAACAAAACGTAGGTAG
D16S515*	D16S515_1	CATTCTGAAATTAGACAGCGATAGG
	D16S515_2	ATCCCCCAGGAGTAATTTGTT
D16S539	D16S539_1	GATCCCAAGCTCTTCCTCTT
	D16S539_2	ACGTTTGTGTGTGCATCTGT

2.1.2 Primer für die Realtime RT-PCR

hHPRT	hu-HPRT1	TGACACTGGCAAAAACAATGCA
	hu-HPRT2	GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT
hABCC1	MRP1_23-24_5'real	CCCCTTGGCCTCATCTACTT
	MRP1_23-24_3'real	TCTGGTTCTCGTCCACCTTC
hBAX	h-BAX-for-real	GGGCCCTTTTGCTTCAGG
	h-BAX-rev-real	GCCACTCGGAAAAAGACCTC
hBCL2	h-BCL2alpha-real1	GAGTACCTGAACCGGCACCT
	h-BCL2alpha-real2	GGCCGTACAGTTCCACAAAG
hBCL-XL	Bcl-X_L_5'real	TGGAAAGCGTAGACAAGGAGA
	Bcl-X_L_3'real	TGCTGCATTGTTCCCATAGA
hCA9	CA9_5'real	CTTGAAGAAATCGCTGAGG
	CA9_3'real	GAAGTCAGAGGGCAGGAGTG
hCD44_v5	CD44_v5neu_5'real	CCCCACATTCTACAAGCACA
	CD44_v6_3'real	GTTGCCAAACCACTGTTTCT
hCDK4	CDK4_5'real	GCAAAATCTTTGACCTGATTGG
	CDK4-3'real	AGGCAGAGATTCGCTTGTGT
hCDKN2A	INK4p16neu_5'real	CCGGGGTCGGGTAGAGGA

	INK4_3'real	ACGGGTCGGGTGAGAGTG
hCDKN2A_ARF	INK4p19neu_5'real	CCCTCGTGCTGATGCTACTGAG
	INK4_3'real	ACGGGTCGGGTGAGAGTG
hCRABP2	CRABP2_5'real	CCAACCTTCTCTGGCAACTGG
	CRABP2_3'real	TCCTCAGCATCACATTCACC
hDBC1	DBCCR1_5'real	GTACGCTGTCGCCACAATC
	DBCCR1_3'real	GAGGAGTGACTGGACCCTTG
hDKK1	hDkk1_5'real	GGGAATTACTGCAAAAATGGAA
	hDkk1_3'real	ACCCATCCAAGGTGCTATGA
hDNAJB1	HSPF1_5'real	CTACGGGGAGGAAGGCCTAA
	HSPF1_3'real	TTCTGCCACCGAAGAACTCA
hEGFR	EGFR_5'real	GCCTTGACTGAGGACAGCAT
	EGFR_3'real	GGGTTTCAGAGGCTGATTGTG
hEGR1	EGR1_5'real	CACCTGACCGCAGAGTCTTT
	EGR1_3'real	AGCGGCCAGTATAGGTGATG
hFASN	FAS_5'real	CTACAACCTCTCCCAGGTATGC
	FAS_3'real	CAGGGAGCTGTGGATGATG
hFLT1	Flt1_5'real_IV	AACCAGAAGGGCTCTGTGGAAAGT
	Flt1_3'real_IV	GCCACACAGGTGCATGTTAGAGTG
hHEY1	huclik-3	TGAGCTGAGAAGGCTGGTAC
	clikseq5	ACCCCAAACCTCCGATAGTCC
hHEY2	h-blik-ex4	TTGCAAATGACAGTGGATCA
	h-blik-ex5	TCATGAAGTCCATGGCAAGA
hHEYL	flik-ex5a	CCCTGGACAGCTATGGAAGA
	flik-ex4b	AATGCTCCATGCCACTGGTG
hId1	Id1_5'real	GCCCACCCTGCCCCAGAACC
	Id1_3'real	AACGCATGCCGCCTCGGC
hId2	Id2_5'real	GTGGCTGAATAAGCGGTGTT
	Id2_3'real	CCATTCAACTTGTCCTCCTTG
hId3	Id3_5'real	CACCTTCCCATCCAGACAG
	Id3_3'real	GCCGAGTCAGTGGCAAAA
hId4	Id4_5'real	CTCACTGCGCTCAACACC
	Id4_3'real	CCTCCCTCTCTAGTGCTCCTG
hIGF2	IGF2_5'real	GGTGGACACCCTCCAGTTC
	IGF2_3'real	CGGAAACAGCACTCCTCAA
hIGFR	IGFR_5'real	CCGACTGCCAGTACCTCTTC
	IGFR_3'real	CGTTCTGACAGCCCCTTG
hITGA8	ITGA8_5'real	TATGCTCTTGCATCCCTGGT

	ITGA8_3'real	TTCGGAGTTGCCCAAATAAC
hLIN9	LIN9_for	CCCCACCACGGTTACATTAT
	LIN9_rev	CGGCGACTGTCCTAATAAAGG
hMMP16	MMP16_5'real	TCTCCTCAGGGAGCATTGT
	MMP16_3'real	TCCTTGAGGATGGATCTTGG
hMYC	c-Myc_5'real	AGCGACTCTGAGGAGGAACA
	c-Myc_3'real	ACTCTGACCTTTTGCCAGGA
hMYCN	hMYCN-real1	CACAAGGCCCTCAGTACCTC
	hMYCN-real2	TTCTCCACAGTGACCACGTC
hNTRK2_full	trkB-5'-ex15	CACTCCAAGTTTGGCATGAA
	trkB-3'-full-e20	ATGTCGCTTGATGTGCTGAA
hNTRK2_trunc	trkB-5'-ex15	CACTCCAAGTTTGGCATGAA
	trkB-3'-trunc-e16	CGCCCACATCTACCAGAAAA
hNTRK2_shc	trkB-5'-ex15	CACTCCAAGTTTGGCATGAA
	trkB-3'-shc-e19	AGGCATGGATTTAGCCTCCT
hSTMN1	STMN1_5'real	AAGGATCTTCCCTGGAGGA
	STMN1_3'real	AGCTGCTTCAAGACCTCAGC
hTERT	hTERTreal1	CGGTGTGCACCAACATCTAC
	hTERTreal2	GGGTTCTTCCAAACTTGCTG
hTGFA	TGF-alphareal1	CAGAAGAAGCAGGCCATCAC
	TGF-alphareal2	TCACAGTGTTTTCGGACCTG
hTOP2A	TOP2Areal1	CAGAAAAGTGTCGTGTCAGACC
	TOP2Areal2	ATGTGTAGCAGGAGGGCTTG
hTRIM22	hTRIM22-real1	GGTTGAGGGGATCGTCAGTA
	hTRIM22-real2	TTGGAAACAGATTTTGGCTTC
hVEGF	hVEGF-real1	TACCTCCACCATGCCAAGTG
	hVEGF-real2	GCTGCGCTGATAGACATCCA
hWT1	wt1-fras1	CCAGCTCAAAGACACCAAAG
	wt10a	GTTACACACTGTGCTGCCT

2.1.3 Primer für Klonierungen

FLAG-5'-Bam	GATCGCCACCATGGATTACAAGGATGACGACGATAAGG
FLAG-3'-Bam	GATCCCTTATCGTCGTCATCCTTGTAATCCATGGTGCC
IRES-5r	CACACCGGCCTTATTCCAAG

2.1.3.1 Primer für Überexpressionskonstrukte

hEGR1_5'-BclI	CGCTGATCAATGGCCGCGGCCAAGGCCGA
hEGR1_3'-BclI_2	GCGTGATCATTAGCAAATTTCAATTGTCCTG
hMYCN_5'-BglII	CGCAGATCTATGCCGAGCTGCTCCACGTC
hMYCN_3'-BglII_2	GCGAGATCTCTAGCAAGTCCGAGCGTGTTCAATT
hTRIM22_5'-ClaI	CCCATCGATATGGATTTCTCAGTAAAGGTAG
hTRIM22_3'-StuI	AAAAGGCCTTCAGGAGCTCGGTGGGCACACAGTCA

2.1.3.2 Primer für shRNA-Konstrukte

pSM2C-Forward	GATGGCTGCTCGAGAAGGTATATTGCTGTTGACAGT GAGCG
pSM2C-Reverse	GTCTAGAGGAATTCCGAGGCAGTAGGCA
hCD44_v5_shRNA-miR	TGCTGTTGACAGTGAGCGAACCATGAGCATCATGAG GAAGTAGTGAAGCCACA _t ATGTA _{CTT} CC _{TC} CATGATGC TCATGGTGTGCCTACTGCCTCGGA
hMYCN_shRNA-miR	TGCTGTTGACAGTGAGCGAACGGAGATGCTGCTTGA GAACTAGTGAAGCCACA _t ATGTAG _{TT} TCTCAAGCAGCA TCTCCGTGTGCCTACTGCCTCGGA
hTRIM22_shRNA-miR	TGCTGTTGACAGTGAGCGAGCTGAGAAGCTGGAAGA TGACTAGTGAAGCCACA _t ATGTAG _{TC} ATCTTCCAGCTT CTCAGCCTGCCTACTGCCTCGGA

2.1.3.3 Sequenzierprimer

CMV-prom	GCTCGTTTAGTGAACCGTCAG
pPRIME-for	CTTGTTAAGTGCTCGCTTCG
pPRIME-rev	ATACCGTCGACCCTCGACTT

2.1.4 Sequenzierprimer für Mutationsanalysen

b-catenin-ex2	TGAAAATCCAGCGTGGACAATG
b-catenin-ex4r	GATTGCACGTGTGGCAAGTTCT
b-catenin-in3r	TCTGACTTTCAGTAAGGCAATGAA
WT1-Ex7s	TGAATGTTACATGTGGCTTA
WT1-Ex7a	ATGTTTGCCCAAGACTGGAC

WT1-Ex8s_neu	AATGAGATCCCCTTTTCCAG
WT1-Ex9as_neu	GAGAAGGAATAGTGCGTGGC
WT1-Ex9s	CTCACTGTGCCACATTGTTA
WT1-Ex10s	TGTGCCTGTCTCTTTGTTGC
WT1-seqEx10rev	CAACTTCCAAGACAAGATACCGG
WT1-Ex10kurzrev	CAGTGTGTGAACTGCTTTCAAG
WT1Seq_Ex1for	AGGCCAGCGCTGAACGTC
WT1Seq_Ex5for	AGTTGCTGCTGGGAGCTCC
WT1Seq_Ex5rev	CTCTGCCCTTCTGTCCATTT
WT1Seq_Ex10rev	CCGGTATCTTGTCTTGGAAGTTG

2.2 Vektoren

pBluescript II KS (+)	Stratagene, La Jolla, USA
p199	pPRIME Vektor mit Doxycyclin-induzierbarem Promoter und GFP-Sequenz (Stegmeier et al., 2005)
p201	pPRIME Vektor mit CMV Promoter und GFP-Sequenz (Stegmeier et al., 2005)

2.3 Bakterienstämme

E. coli DH5 α	Klonierungsstamm (Sambrock et al., 1989)
----------------------	--

2.4 Eukaryotische Zelllinien

HEK 293TD	Adenovirus 5-immortalisierte Linie humaner embryonaler Nierenzellen (ATCC# CRL-1573), exprimieren das SV-40 T-Antigen (T), Lot aus Dortmund (D), lassen sich deutlich besser transfizieren als HEK293T
HeLa	Zelllinie aus menschlichen Epithelzellen eines Zervixkarzinoms

2.5 Wilms Tumor Primärkulturen

WS539A1-2	aus nativem Wilms Tumormaterial gewonnene Primärkultur
WS576B	aus nativem Wilms Tumormaterial gewonnene Primärkultur
WS591	aus nativem Wilms Tumormaterial gewonnene Primärkultur
MZ128	Primärkultur aus Mainz (Lobbart et al., 1998)

2.6 Puffer und Lösungen

Alle nicht detailliert beschriebenen Puffer und Lösungen wurden nach Sambrock et al. (Sambrock et al., 1989) oder Ausubel et al. (Ausubel et al., 1988) hergestellt.

2.7 Enzyme und Kits

Alle nicht gesondert aufgeführten Enzyme und Kits wurden von den Firmen Macherey-Nagel (Düren), MBI Fermentas (St. Leon-Rot), NEB GmbH (Frankfurt/Main), Qiagen (Hilden) und PeqLab Biotechnologie GmbH (Erlangen) erworben.

Dye Terminator Cycle

Sequencing Quick Start Kit Beckmann Coulter, Fullerton, USA

Caspase-Glo 3/7 Assay Kit Promega, Mannheim

Senescence detection kit Biovision, Mountain View, USA

2.8 Chemikalien

Chemikalien zum Ansetzen von Puffern, Lösungen und Medien wurden in der Regel in p.a. Qualität von den Firmen Roth GmbH (Karlsruhe), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen), Applichem (Darmstadt) und Merck (Darmstadt) bezogen.

ALF ReproGele	GE Healthcare, Freiburg
APS	GE Healthcare, Freiburg
Betain	Fluka, Taufkirchen
Blue Dextran 2000	GE Healthcare, Freiburg
Borsäure	GE Healthcare, Freiburg
DMEM mit GlutaMAX-I	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
FITC	BioRad, München
FCS	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
peqGOLD TriFast	peqLab, Erlangen
Proteinase K	Roche, Mannheim
RNaseA	Roche, Mannheim
Sybr Green	Cambrex, Apen
TEMED	GE Healthcare, Freiburg
Trypsin/EDTA (0,25 % Trypsin, 1 mM EDTA-Na ₄ in HBSS)	PAN Biotech GmbH, Aidenbach

2.9 Antikörper

Anti-Flag	Sigma, Taufkirchen
Anti-HA	Sigma, Taufkirchen
Anti-Maus-POD	BioRad, München

2.10 Geräte

ALFexpress Sequenzierer	GE Healthcare, Freiburg
CEQ Sequenzierer	Beckmann Coulter, Fullerton, USA
i-Cycler	Bio-Rad, München

2.11 Software

Statistik	SPSS V11.5
Fragmentanalyse	ALX2ALF V1.0.0.1 Fragment Manager V1.1, GE Healthcare, Freiburg
Sequenzanalyse	CEQ Software Version 9.0, Beckmann Coulter, Fullerton, USA

2.12 Sonstiges Material

Nitrozellulose-Membran	Schleicher & Schüll, Dassel
Röntgenfilme	Fotochemische Werke GmbH, Berlin

3. Methoden

3.1 Isolierung von Nukleinsäuren

3.1.1 Isolierung von DNA und RNA aus gefrorenem Gewebe

Zur Isolierung von RNA und DNA aus Tumorgewebe wird ein ca. 50 – 100 mg schweres Gewebestück in einem mit flüssigem Stickstoff gefüllten Mörser pulverisiert und anschließend in ein 15 ml Röhrchen überführt. Dieses kann bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert werden. Anschließend erfolgt die Extraktion von RNA und DNA mit Hilfe des QIAGEN RNA/DNA Midi Kits laut Herstellerangaben.

DNA und RNA von Tumorproben, die zur Validierung der Realtime RT-PCR Daten benutzt wurden, wurden mit Hilfe des Nucleospin RNA II Kits und zusätzlichem RNA/DNA Puffer Set (Macherey-Nagel, Düren) laut Protokoll isoliert. Hierfür werden, wie bereits zuvor beschrieben, ca. 30 – 50 mg Gewebe pulverisiert und in ein 2 ml Reaktionsgefäß transferiert. Zur besseren Lyse wird nach Zugabe des Puffers RA1 und β -Mercaptoethanol das Lysat >5-mal durch eine 0,9 mm Kanüle gezogen. Anschließend wird laut Protokoll verfahren.

3.1.2 Isolierung von DNA aus gefrorenem Gewebe

Für die Gewinnung von DNA aus Nierengewebe wird ein ca. 30 – 50 mg großes Gewebestück in flüssigem Stickstoff gemörsert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß transferiert. Anschließend wird die DNA mit dem DNeasy Tissue Kit von QIAGEN laut Protokoll isoliert.

Die Lyse erfolgt bei 55°C über Nacht.

3.1.3 Isolierung von DNA aus Blut

Nonidet P40 / 0,9 % NaCl: 0,1 % Nonidet P40
 0,9 % NaCl
 nicht autoklavieren

Lysis-Puffer: 75 mM NaCl
 10 mM Tris-HCl pH 8,0
 20 mM EDTA
 autoklavieren

1 x TE: 10mM Tris-HCl pH 8.0
 1mM EDTA

Für die Gewinnung von DNA aus den Zellkernen von weißen Blutkörperchen werden 5 - 10 ml EDTA-Blut zuerst mit dem gleichen Volumen 0,1 % Nonidet-P40 / 0,9 % NaCl vermischt und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Nach der Zentrifugation für 10 Minuten bei 4000 rpm wird das Pellet mit 30 ml 0,1 % Nonidet-P40 / 0,9 % NaCl gewaschen und erneut zentrifugiert, worauf es eine weißliche bis rosa Färbung aufweisen sollte. Falls dies nicht der Fall ist, erfolgt ein zusätzlicher Waschschrift wie oben beschrieben. Anschließend wird das Pellet in

5 ml Lysis-Puffer
50 µl Proteinase K (10 mg/ml)

resuspendiert. Nach Zugabe von 250 µl SDS (20 %) erfolgt der Verdau im Wasserbad bei 50°C über Nacht.

Zum Verdau wird ein halbes Volumen Tris-gesättigtes Phenol (pH 8,0) gegeben, kräftig geschüttelt und für 10 Minuten bei 5000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird mit einem halben Volumen Chloroform vermischt und zentrifugiert. Anschließend wird zum Überstand das gleiche Volumen Isopropanol gegeben und durch Schwenken wird die DNA als Faden sichtbar. Dieser wird mit Hilfe eines abgeschmolzenen Glashakens herausgewickelt, in 70 % Ethanol gewaschen, kurz getrocknet und in 100 µl 1 x TE gelöst. Zum vollständigen Lösen wird das Gefäß bei 4°C über Nacht rotiert.

3.1.4 DNA Präparation nach der Rapid-Boiling-Methode

Die Rapid-Boiling-Methode kann angewendet werden, um schnell Plasmid-DNA für Restriktionsverdaus zu isolieren.

STET-Puffer: 8 % Sucrose
 5 % Triton X-100
 50 mM EDTA
 50 mM Tris-HCl pH 8,0

1,5 ml einer Bakterien-Übernachtskultur werden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und die Bakterien bei 14000 rpm für 30 Sekunden abzentrifugiert. Das Pellet wird in 300 µl STET-Puffer und 0,25 mg Lysozym resuspendiert und für 2 Minuten aufgekocht. Nach dem Abkühlen werden die Zelltrümmer bei 14000 rpm für 10 Minuten abzentrifugiert und das Pellet mit einem Zahnstocher entfernt. Der Überstand wird mit 300 µl Isopropanol vermischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Plasmid-DNA wird durch

Zentrifugation bei 14000 rpm für 10 Minuten pelletiert, mit 70 %igem Ethanol gewaschen, 5 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend in 20 µl H₂O plus 25 µg RNaseA bei 68°C im Wasserbad für 10 Minuten gelöst. Die so gewonnene Plasmid-DNA kann bei -20°C gelagert oder direkt für einen Restriktionsverdau eingesetzt werden.

3.2 Gelelektrophorese

3.2.1 DNA Gele

Gel-Lade-Puffer: 43,5 % Glycerin
 1,95 % Ficoll (Typ 400)
 0,03 % Bromphenolblau
 0,8 mM EDTA pH 8,0

3.2.1.1 DNA Gele mit TAE Puffer

50 x TAE-Puffer : 2 M Tris-Essigsäure pH 7,5 – 8,0
 50 mM EDTA

Zur Auftrennung von Fragmenten größer als 500 bp werden 1 – 1,5 %ige Agarosegele in 1 x TAE benutzt. Zum Anfärben der DNA wird dem Gel 1 µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt. Die Proben werden vor dem Laden mit je ca. 1 µl Gelladepuffer vermischt und anschließend bei 5 – 10 V/cm für 1 bis 2 Stunden aufgetrennt. Die Analyse der DNA-Fragmente erfolgt unter UV-Licht (254 nm). Als Marker dient mit HindIII bzw. EcoRI/HindIII verdaute Lambda DNA.

Sollen DNA Fragmente anschließend zum Klonieren eingesetzt werden, so können diese mit Hilfe des Nucleobond Kits von Macherey-Nagel aus dem Agarosegel extrahiert werden.

3.2.1.2 DNA Gele mit SB Puffer

20 x SB-Puffer: 200 mM Natriumhydroxid
 mit Borsäure auf pH 8,0 einstellen

DNA-Fragmente kleiner als 500 bp können in SB-Gelen besonders gut separiert werden. Hierfür werden 1 %ige Agarosegele in 1 x SB-Puffer gegossen und 1 µg/ml Ethidiumbromid zugegeben. Jede Probe wird mit 1 µl Gelladepuffer vermischt und anschließend bei 10 – 20 V/cm für 15 bis 30 Minuten elektrophoretisch aufgetrennt. Im UV-Licht (254 nm) können die DNA-Fragmente analysiert werden. Als Marker dient mit HaeIII verdauter pBluescript II KS (+).

3.2.2 RNA Gele

20 x MOPS:	400 mM MOPS 100 mM NaAc 10 mM EDTA
Denaturierungspuffer:	50 µl 20 x MOPS 180 µl Formaldehyd (37 %) 500 µl Formamid 4 µl EtBr (10 mg/ml) 96 µl DEPC-H ₂ O

Der Zustand der RNA wird mit Hilfe eines 1,3 %igen Agarosegels mit 1,1 % Formaldehyd in 1,1 x MOPS-Puffer überprüft. Hierzu wird die Agarose zuerst in der entsprechenden Menge DEPC-H₂O aufgekocht. Nach dem Abkühlen auf ca. 60°C werden MOPS und Formaldehyd zugegeben und das Gel in die Form gegossen. Jeweils 2 µg RNA werden mit DEPC-H₂O auf ein Gesamtvolumen von 12 µl aufgefüllt und diese mit 8 µl Denaturierungspuffer vermischt. Nach dem Aufkochen bei 68°C für 10 Minuten und dem Abkühlen auf Eis werden die Proben bei 5 – 10 V/cm für 1 bis 2 Stunden separiert. Unter UV-Licht bei 254 nm werden die 28S- und 18S-rRNA sichtbar, die der Qualitätskontrolle dienen.

3.3 LOH-Analysen mit dem ALFexpress Sequenzierer

3.3.1 Microsatelliten PCR

10 x PCR-Puffer:	100 mM Tris-HCl pH 8,85 0,5 M KCl 15 mM MgCl ₂ 1 % Triton X-100 2 mg/ml BSA
------------------	--

Zur Analyse des Allelstatus von Patienten werden jeweils aus DNA vom Tumor und entsprechendem Referenzmaterial (Blut oder Nierengewebe) Regionen, in denen Mikrosatelliten lokalisiert sind, mittels PCR amplifiziert. Hierfür wurden zum Großteil Standard-Primer benutzt, deren Sequenzen der „Genome Data Base“ (<http://www.gdb.org/>) entnommen wurden.

PCR-Ansatz:	1 µl	DNA (50 ng/µl)
	2 µl	10 x PCR-Puffer
	0,13 mM	dNTPs
	0,5 mM	Primer 1
	0,5 mM	Primer 2
	3 U	Taq
	ad 20 µl	H ₂ O

Modifikationen für bestimmte Marker:

D11S533: plus 2,5 mM Spermidin

TH01/D11S1392: plus 5 % DMSO

Standard-PCR-Programm:

94°C	5'	1x
94°C	30''	30x
60°C	30''	
72°C	30''	
72°C	7'	1x

Modifikationen für bestimmte Marker:

D11S540: 40x

D11S4139: Annealing bei 62°C, 40x

D11S3112: Annealing 60°C für 15'', Elongation 72°C für 20'', 30x

D11S533: Denaturierung 94°C für 45'', Annealing 64°C für 1',
Elongation 72°C für 3', 38x

3.3.2 Fragmentanalyse mit dem ALFexpress Sequenzierer

ALF Probenpuffer: 5 mg/ml Dextran Blau 2000
in deionisiertem Formamid

10 x TBE: 1 M Tris
0,83 M Borsäure
10 mM EDTA

Zur Fragmentanalyse wird jeweils 1 µl PCR-Reaktion mit 2,5 µl ALF Probenpuffer vermischt, bei 80°C für 5 Minuten denaturiert und anschließend auf Eis gekühlt. Proben werden mit Hilfe des ALFexpress Sequenziergeräts auf einem ReproGel Long Read in 0,6 x TBE analysiert und anschließend mit der „Fragment Manager“ Software (Amersham Biosciences, Freiburg) ausgewertet.

3.4 Realtime RT-PCR

Die Realtime RT-PCR dient zur Bestimmung relativer Expressionslevel bestimmter Gene zwischen verschiedenen Proben. Hierbei wird die Zunahme der Fluoreszenz von SybrGreen bestimmt, einem Fluoreszenzfarbstoff, dessen Fluoreszenz um ein Vielfaches zunimmt, wenn er in doppelsträngige DNA interkaliert.

3.4.1 cDNA Synthese

Die reverse Transkription von jeweils 2,5 µg RNA in cDNA erfolgt mit Hilfe des RevertAid First Strand cDNA Synthese Kits (MBI Fermentas, St. Leon-Rot). Falls die RNA Konzentration zu gering ist, muss die RNA vor der Weiterverwendung gefällt werden. Hierfür wird zur RNA das gleiche Volumen 5 M Lithiumchlorid gegeben, 30 Minuten auf Eis gefällt, 20 Minuten bei 14000 rpm und 4°C zentrifugiert und das Pellet anschließend im entsprechenden Volumen DEPC-H₂O bei 68°C 10 Minuten gelöst.

Die Standard cDNA-Synthese Reaktion wird laut Protokoll in einem 20 µl Ansatz durchgeführt, der 0,5 µg Oligo dT-Primer enthält. Es folgt der Verdau der RNA mit 1,25 U RNaseH für 30 Minuten bei 37°C. Zuletzt werden 180 µl destilliertes Wasser hinzugefügt, wodurch sich ein Endvolumen von 200 µl ergibt.

3.4.2 Realtime RT-PCR

PCR-Ansatz:	2 µl	cDNA
	2,2 µl	10 x PCR-Puffer
	0,25 mM	dNTPs
	5 nM	FITC
	0,3 mM	Primer 1
	0,3 mM	Primer 2
	0,65 µl	Sybr Green (1:20000 verdünnt)
	3,15 U	Taq
	ad 22 µl	H ₂ O

PCR-Programm:

94°C	3'	1x
94°C 60°C	15'' 1'	40x
94°C	1'	1x
50°C (+ 1°C / Cycle)	10''	50x

Modifikationen des PCR-Programms für folgende Primer:

Gen	PCR	Annealing/ Elongations Temperatur °C	Annealing/ Elongations Zeit
hBCL-X _L	3step	60-72	30"-30"
hCDK4	3step	60-72	30"-30"
hCDKN2A	2step	67,2	1'
hCDKN2A_ARF	2step	71,2	1'
hDNAJB1	2step	63,5	45"
hFASN	2step	60,4	45"
hFLT1	3step	66,5-72	30"-30"
hID1	2step	72	1'
hID3	2step	61,6	1'
hID4	2step	61,6	1'
hMYC	2step	63,5	45"
hVEGF	2step	61	45"

Die für die Realtime RT-PCR verwendeten Primer werden optimalerweise in zwei Exons gelegt, die durch ein Intron von mindestens 1500 bp getrennt sind. Dies soll sicherstellen, dass eine potentielle Verunreinigung der cDNA-Proben durch genomische DNA das Messergebnis nicht beeinflusst. Die Amplifikate sollten etwa eine Größe zwischen 80-250 bp besitzen, um zum einen die Unterscheidung von unerwünschten Primerdimeren, zugleich aber auch eine möglichst effiziente PCR zu ermöglichen.

Zusätzlich zur Messung der Kandidatengene erfolgt die Bestimmung des Expressionslevels eines oder mehrerer Haushaltsgene in allen Proben, wie z.B. HPRT. Hiermit können anschließend Konzentrationsunterschiede zwischen den cDNA-Proben normiert werden, was den Vergleich der Proben untereinander ermöglicht.

Da SybrGreen in jede Art doppelsträngige DNA und somit auch in sich eventuell gebildete, unspezifische Nebenprodukte interkaliert, können diese zu einer Verfälschung

des Messergebnisses der Kandidatengene führen. Aus diesem Grund wird im Anschluss an die PCR eine Schmelzkurve erstellt und die PCR-Produkte zusätzlich auf einem Agarosegel analysiert, um diese auf ihre Richtigkeit und Reinheit zu überprüfen.

3.5 PCR für Klonierungen

3.5.1 Überexpressionskonstrukte

Die Amplifikation der cDNAs für die Überexpressionskonstrukte erfolgt mit Hilfe der AccuPrime Pfx (Invitrogen, Karlsruhe) bzw. Phusion (Finnzymes, Espoo, Finnland) laut Protokoll des Herstellers.

3.5.2 shRNA-Konstrukte

Für die Klonierung der shRNA-Konstrukte wird jeweils ein 97mer Hairpin Oligonukleotid gegen das gewünschte Gen entworfen (<http://katahdin.cshl.org:9331/homepage/siRNA/RNAi.cgi?type=shRNA>), der Hairpin mit den pSM2C Primern amplifiziert und anschließend mit Hilfe des NucleoSpin Extract Kits (Macherey-Nagel, Düren) aufgereinigt. Die Elution des PCR-Produkts erfolgt in 50 µl Elutionspuffer. PCR-Produkt und Vektor p201PmeIGiP werden mit XhoI und EcoRI verdaut, der PCR-Verdau über eine Säule, der Vektor über ein Agarosegel aufgereinigt und der Hairpin schließlich in einem 10 µl Ligationsansatz mit dem Vektor ligiert, optimalerweise in einem 3:1 Verhältnis. Die Hälfte des Ligationsansatzes wird in kompetente Bakterien (DH5α) transformiert und auf LB/Amp-Platten ausplattiert.

Zur Überprüfung der Klone wird zunächst eine Test-PCR mit den Primern pPRIME-for und pPRIME-rev durchgeführt. Anschließend werden die per PCR positiv getesteten Klone sequenziert. Da die Sequenzierung eines Hairpins auf Grund seiner Sekundärstruktur mitunter sehr schwierig ist wird zunächst ein NdeI-Verdau der für die Sequenzierung benötigten Menge an Plasmid durchgeführt. Die NdeI Schnittstelle befindet sich etwa in der Mitte der Hairpin-Sequenz, wodurch diese zerschnitten und die Ausbildung des Hairpins verhindert wird. Die verdaute DNA wird mittels Ethanol-fällung präzipitiert und in 10 µl H₂O gelöst. Je 5 µl werden für die Sequenzierreaktion mit dem pPRIME_for und dem pPRIME_rev Primer eingesetzt, wodurch die beiden Hälften des Hairpins jeweils bis zur Schnittstelle sequenziert werden können.

3.6 Zellkultur

3.6.1 Wilms Tumor Primärkulturen

3.6.1.1 Anlegen von Primärkulturen aus Tumormaterial

Frisches Tumormaterial in RPMI oder physiologischer Kochsalzlösung wird zunächst mit DM10-Medium (DMEM mit GlutaMAX-I, 10 % FCS, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin) gespült und anschließend in einer 10 cm Schale in 1 – 2 ml DM10 Medium mit einem Skalpell zerkleinert. Es werden 10 – 15 ml Trypsin/EDTA (0,25 % Trypsin, 1 mM EDTA-Na₄ in HBSS) zugegeben und die Schale für 15 Minuten bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Der verdaute Tumor wird mit ca. 30 ml DM10 aufgenommen und bei 1000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig abgesaugt, die Tumorreste mit 1 - 2 ml DM10 Medium auf eine 10 cm Schale transferiert und dort für 2 – 5 Stunden im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend werden vorsichtig weitere 8 ml DM10 Medium zugegeben, damit bereits locker angewachsene Tumorstücke nicht wieder abgespült werden, und die Schale weiterhin im Brutschrank inkubiert.

3.6.1.2 Kultivierung und Lagerung von WT Primärkulturen

Die weitere Kultivierung der WT Primärkulturen erfolgt in DM10-Medium im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂. Ein Tag nach dem Anlegen der Primärkultur werden nicht festgewachsene Tumorreste von der Platte abgesaugt und auf eine frische 10 cm-Schale transferiert. Auf die Originalplatte werden vorsichtig 10 ml frisches DM10 Medium gegeben. In der Regel wird alle 2 – 3 Tage ein Mediumwechsel durchgeführt, bis die Platte konfluent bewachsen ist. Da die meisten WT Kulturen stark adhärent sind, werden die Zellen zum Ablösen für 10 Minuten mit 2 ml Trypsin/EDTA bei 37°C inkubiert, mit weiteren 8 ml DM10 abgespült und bei 1000 rpm für 5 Minuten abzentrifugiert. Bei der 1. Passage werden die Zellen 1:2 gesplittet und auf zwei 10 cm-Schalen verteilt. Bei den folgenden Passagen wird ebenso verfahren, jedoch werden die Zellen 1:3 gesplittet. Bei der 2. Passage werden die Zellen von zwei konfluenten Platten in jeweils 1 ml Einfriermedium (60 % DMEM, 30 % FCS, 10 % DMSO) resuspendiert, in Cryoröhrchen langsam auf -80°C abgekühlt und anschließend in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Von der 3. Passage werden die Zellen von einer Platte ebenso eingefroren, die der anderen zwei Platten für die DNA- und RNA-Extraktion pelletiert und bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C bzw. -80°C aufbewahrt.

3.6.2 Isolierung von DNA und RNA aus Zellen

3.6.2.1 Isolierung von DNA aus Zellen

Lysis-Puffer: 50 mM Tris-HCl pH 8,0
 100 mM EDTA
 100 mM NaCl
 1 % SDS

Zur Isolierung von DNA werden Zellen einer konfluenten 10 cm-Schale 5 Minuten bei 1000 rpm abzentrifugiert, zum Pellet 700 µl Lysis-Puffer + 35 µl Proteinase K (10 mg / ml) gegeben und über Nacht bei 55°C in einem Rotor inkubiert. Das Lysat wird 5 Minuten gevortext, 250 µl gesättigtes NaCl (ca. 6 M) zugegeben, weitere 5 Minuten gevortext und anschließend für 7 Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert. 750 µl Überstand werden in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 500 µl Isopropanol vermischt, wodurch die DNA als Faden sichtbar wird. Dieser wird mit einer abgeschmolzenen Glaspasteurpipette herausgewickelt, kurz in 70 %igem Ethanol gewaschen, kurz getrocknet und in 100 µl 1 x TE gelöst. Zum vollständigen Lösen der DNA wird diese bei 4°C über Nacht rotiert.

3.6.2.2 Isolierung von RNA aus Zellen mit peqGOLD TriFast

Die Isolierung von RNA aus Zellen erfolgt mit Hilfe von peqGOLD TriFast (peqLab, Erlangen). Hierfür werden Zellen einer konfluenten 10 cm-Schale 5 Minuten bei 1000 rpm abzentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet bei -80°C bis zur Isolierung gelagert. Zum Pellet wird 1 ml peqGOLD TriFast gegeben, die Zellen durch mehrmaliges Aufziehen resuspendiert, in ein 2 ml Reaktionsgefäß transferiert und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform werden die Lösungen durch Schütteln (15 Sekunden) gut durchmischt, 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bei 14000 rpm und 4°C für 20 Minuten zentrifugiert. Die obere Phase wird in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert, 600 µl Isopropanol und 1 µl Glykogen (10 mg/ml) zugegeben und die RNA 10 Minuten bei -20°C gefällt. Nach 20minütiger Zentrifugation bei 14000 rpm bei 4°C wird das Pellet mit 1 ml 70 % EtOH gewaschen, 5 Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert, 5 Minuten getrocknet und anschließend in 20 µl DEPC-H₂O durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren und Inkubation bei 60°C für 10 Minuten gelöst. Die so isolierte RNA wird bei -80°C gelagert.

3.6.3 Produktion von Lentiviren in 293TD Zellen

Zur Herstellung von Lentiviren werden zu 60-70 % konfluente 293 TD Zellen mit 1 x PEI transfiziert. PEI (Polyethylenimin) wird seit Jahren zur Transfektion von Zellen eingesetzt, da hiermit eine sehr hohe Transfektionseffizienz erreicht wird (Godbey et al., 2000).

Am Tag der Transfektion wird zuerst ein Mediumwechsel durchgeführt, wobei nur die Hälfte der normal verwendeten Mediummenge zugefügt wird. Anschließend wird der DNA-Mix für die Transfektion vorbereitet:

	6-well	10 cm-Schale
Viruskonstrukt	2 µg	6 µg
PAX2 (psPAX2)*	1,5 µg	4,5 µg
CMV-VSVg*	1 µg	3,0 µg
DMEM pur	ad 100 µl	ad 250 µl

*PAX2 = Packaging-Plasmid; CMV-VSVg = Envelope-Plasmid

Parallel hierzu wird der PEI-Mix hergestellt. Hierfür werden pro µg DNA jeweils 2 µl 1 x PEI eingesetzt:

	6-well	10 cm-Schale
1 x PEI*	9 µl	27 µl
DMEM pur	ad 100 µl	ad 250 µl

*1 x PEI wird mit 150 mM NaCl-Lösung aus 100 x PEI (= 100 mg/ml) hergestellt.

Der PEI-Mix wird für 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend zum DNA-Mix pipettiert (Reihenfolge wichtig!) und zügig gevortext. Nach einer Inkubationszeit von 15 - 20 Minuten wird der Transfektionsmix auf die Zellen getropft und nach 6 - 8 Stunden mit der entsprechenden Menge DM10 ein Mediumwechsel durchgeführt.

Zur Induktion der Produktion von Viruspartikeln wird am folgenden Tag Natriumbutyrat zum Medium dazugegeben, sodass sich eine Endkonzentration von 10 mM ergibt, und nach 6 - 8 Stunden ein Mediumwechsel durchgeführt.

Am vierten Tag kann das Lentivirus geerntet werden. Hierzu wird der Überstand der transfizierten Zellen abgenommen und mit Hilfe eines 0,45 µm Sterilfilters steril filtriert. Der Überstand kann nun für die Infektion von Zellen verwendet werden.

3.6.4 Infektion von Zellen mit Hilfe von Lentiviren

Die zu infizierenden Zellen sollten am Tag der Infektion zu ca. 80 % konfluent sein. Die Infektion geschieht in einer 3,8 cm²-Schale. Hierfür wird von den zu infizierenden Zellen das Medium abgesaugt und pro Schale 1 ml des zuvor gewonnenen Virusüberstandes zugegeben. Zugewetztes Polybren in einer Endkonzentration von 8 µg/ml erleichtert das Eindringen der Viruspartikel in die Zielzellen. Nach 6 - 8 Stunden wird ein Mediumwechsel durchgeführt. Am folgenden Tag kann mit der Selektion der transduzierten Zellen mittels entsprechendem Antibiotikum begonnen werden. Eine Expression von Markergenen, wie z.B. GFP, ist nach frühestens zwei Tagen nachweisbar.

3.6.5 Vorbereiten der Zellen für die FACS-Analyse

10 x PBS:	1,4 M NaCl
	3 mM KCl
	8 mM Na ₂ HPO ₄
	2 mM KH ₂ PO ₄

Etwa 500.000 Zellen werden durch Trypsinieren von der Zellkulturschale abgelöst, wobei die Inkubation mit Trypsin etwas länger erfolgen sollte als beim normalen Passagieren, um die komplette Vereinzelung aller Zellen zu erreichen. Anschließend werden die Zellen in 10 ml Medium mit 10 % Serum resuspendiert, 5 Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert und mit 10 ml eiskaltem 1 x PBS gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation bei 1000 rpm für 5 Minuten wird tropfenweise unter langsamem Vortexen 1 ml eiskaltes, 80 %iges Ethanol zu den Zellen gegeben, um die Zellen zu fixieren. Die Zellen werden mindestens für ein paar Stunden, besser jedoch über Nacht, bei 4°C gelagert und anschließend bis zur Messung bei -20°C aufbewahrt.

Ungefähr 1 bis 2 Stunden vor der FACS-Analyse werden die Zellen für die Messung vorbereitet. Hierfür werden die Zellen für 10 Minuten bei 1000 rpm und 4°C abzentrifugiert und in 5 ml eiskaltem 1 x PBS gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation bei 1200 rpm werden die Zellen in 500 µl Natriumcitrat (38 mM) und 5 µl RNaseA (50 mg/ml) resuspendiert, für 30 Minuten bei 37°C (bzw. über Nacht bei 4°C) inkubiert, 15 µl Propidiumiodid (1 mg/ml) zugegeben und für die Messung in FACS-Röhrchen überführt. Propidiumiodid (PI) ist ein DNA-Interkalator, der zur Bestimmung des DNA-Gehaltes von Zellen benutzt werden kann. Hierzu wird PI mittels Laser angeregt und die Fluoreszenz gemessen, welche proportional zum DNA-Gehalt der Zelle ist. Da apoptotische und tote Zellen meist einen niedrigeren DNA-Gehalt als den einfachen Chromosomensatz aufweisen, ermöglicht diese Messung zudem die Unterscheidung zwischen apoptotischen/toten und lebenden Zellen.

3.6.6 Seneszenzfärbungen

Neben der Verwendung des „Senescence detection kit“ von Biovision (Mountain View, USA) können Seneszenzfärbungen auch nach folgendem Protokoll durchgeführt werden:

10 x PBS (pH 7,2):	s. 3.6.5
10 x PBS (pH 6,0):	zum Ansetzen der Färbelösung s. 3.6.5 , mit HCl auf pH 6,0 einstellen
Färbelösung:	1 mg/ml X-Gal (20 mg/ml in DMSO) 0,12 mM $K_3Fe(CN)_6$ 0,12 mM $K_4Fe(CN)_6$ 1 mM $MgCl_2$ in 1 x PBS pH 6,0 ansetzen

Zellen werden mit 1 x PBS gewaschen und anschließend in 0,5 % Glutaraldehyd (in 1 x PBS) für 10 Minuten fixiert. Nach dem Waschen mit 1 x PBS/1 mM $MgCl_2$ wird die Färbelösung zugegeben und über Nacht bei 37°C im Dunkeln gefärbt. Am folgenden Tag kann die Färbelösung abgesaugt und die Zellen mit 1 x PBS überschichtet werden, wodurch sie über mehrere Monate hinweg bei 4°C gelagert werden können. Abhängig von der Größe der für die Seneszenzfärbung verwendeten Schalen werden die Mengen der Lösungen so gewählt, dass die Zellen jeweils gut bedeckt sind.

3.7 Proteinanalyse

3.7.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Sammelgel:	250 mM Tris-HCl pH 6,8 5 % Acrylamid:Bisacrylamid (29:1) 0,1 % SDS 0,1 % APS 0,1 % TEMED
Trenngel:	375 mM Tris-HCl pH 8,8 8 – 15 % Acrylamid:Bisacrylamid (29:1) 0,1 % SDS 0,1 % APS 0,06 % TEMED

10 x SDS-Laufpuffer:	250 mM Tris 1,92 M Glycin 1 % SDS
2 x SDS-Probenpuffer:	0,1 M Tris-HCl pH 6,8 22,9 % Glycerin 4 % SDS 0,2 M DTT 0,02 % Bromphenolblau

Für die denaturierende SDS-PAGE werden Gele benutzt, die sich aus zwei verschiedenen Teilen mit unterschiedlicher Acrylamid-Konzentration zusammensetzen. Hierbei werden die Proteine zunächst mit Hilfe eines niederprozentigen (5 %) Sammelgels fokussiert und anschließend in einem höherprozentigen Trenngel entsprechend ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Die Acrylamidkonzentration des Trenngels richtet sich hierbei nach der Größe der Proteine und liegt generell zwischen 8 und 15 %.

Proben für die SDS-PAGE werden 1:1 mit 2x SDS-Probenpuffer versetzt, zum Denaturieren 5 Minuten aufgeköcht und anschließend 5 Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert. Je 20 µl jeder Probe werden auf das Gel geladen und in 1 x SDS-Laufpuffer bei 100 Volt ca. 1 Stunde aufgetrennt.

3.7.2 Westernblot

Transferpuffer (pH 8,3):	25 mM Tris 150 mM Glycin 10 % Methanol
1 x PBT:	1 x PBS 0,02 % Tween 20
Trockenmilch:	5 g Milchpulver 50 ml 1 x PBT

Der Transfer der mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran erfolgt mit Hilfe einer semi-dry-Elektroblot-Kammer von Biometra bei 5 mA/cm² für 30 Minuten bei 4°C. Anschließend wird die Membran in 10 % Trockenmilch über Nacht bei 4°C inkubiert, um freie Bindungsstellen auf der Membran abzusättigen. Nach Waschen mit 1 x PBT (2x kurz, 1x 15 min, 2x 5 min) erfolgt die Inkubation mit dem Erstantikörper Anti-Flag bzw. Anti-HA in 1 x PBT plus 1 % Trockenmilch für eine Stunde

bei Raumtemperatur, entsprechend den Herstellerangaben in einer 1:1000 Verdünnung. Die Membran wird nochmals mit 1 x PBT gewaschen (2x kurz, 1x 15 min, 2x 5 min) und mit dem Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper (1:5000 in 1 x PBT) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgt ein weiterer Waschschrift mit 1 x PBT (2x kurz, 1x 15 min, 2x 5 min) und der Nachweis der auf der Nitrozellulose gebundenen Antigene mit Hilfe eines ECL (enhanced chemiluminescence) Detektionskits entsprechend der Herstellerangaben (Amersham Pharmacia).

3.8 Sequenzierungen

Standard-Sequenzieransatz: 6 µl DNA in H₂O
 1 µl Primer (5 pmol/µl)
 3 µl Master Mix (Beckmann Coulter)

Für besonders GC-reiche Sequenzen kann die Sequenzierreaktion mit Betain durchgeführt werden:

4,33 µl DNA in H₂O
 1 µl Primer (5 pmol/µl)
 6,67 µl Betain (3 M)
 8 µl Mastermix

Standard-Sequenzier-Programm:

96°C	2'	1x
96°C	30''	30x
60°C	20''	
65°C	4'	

Anschließend werden zum CEQ-Ansatz (10 µl) folgende Lösungen pipettiert:

10 µl H₂O
 2 µl 3 M NaAc
 2 µl 1 M EDTA
 1 µl Glykogen (10 mg/ml)
 60 µl 100 % EtOH (-20°C)

Die Mixtur wird bei 14000 rpm bei 4°C für 15 Minuten zentrifugiert, das Pellet mit 180 µl 70 %igem EtOH (-20°C) gewaschen, für 5 Minuten bei 14000 rpm und 4°C zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das Pellet wird lichtgeschützt für ca. 5 - 10 Minuten bei

Raumtemperatur getrocknet und in 30 µl SLS-Puffer gelöst. Die Sequenzierung kann nun entweder bei -20°C gelagert oder direkt zum Sequenzieren gegeben werden, welche auf dem CEQ8000 Sequenzierer von Beckmann durchgeführt wird. Die Analyse der Sequenziererergebnisse erfolgt mit der CEQ Software Version 9.0.

3.8.1 Sequenzierung von Plasmiden

Für die Sequenzierung von Plasmiden werden insgesamt 100 fmol eingesetzt, was abhängig von der Größe des Plasmids zwischen 200 und 800 ng entspricht. Diese werden mit dH₂O auf insgesamt 6 µl aufgefüllt, für 3 min bei 96°C aufgeköcht und auf Eis gestellt. Anschließend wird nach Standardprotokoll verfahren.

3.8.2 Sequenzierung aus PCR

Für Mutationsanalysen wird aus genomischer DNA die zu untersuchende Region mittels PCR amplifiziert und die Fragmente auf einem Agarosegel überprüft. Anschließend werden die PCR-Produkte mittels Exonuklease I (Exo) und „Shrimp Alkaline Phosphatase“ (SAP) aufgereinigt. Hierfür werden zu 6 µl PCR jeweils 0,5 µl Exo und SAP gegeben, für 15 Minuten bei 37°C inkubiert und bei 80°C in 15 Minuten inaktiviert. Exo und SAP sind zwei hydrolytische Enzyme, die überschüssige Desoxynucleotide und Primer der PCR-Reaktion abbauen, ohne dabei Folgereaktionen zu beeinträchtigen. Aus diesem Grund können die so aufgereinigten 6 µl direkt für eine Sequenzierreaktion eingesetzt werden oder, bei entsprechend starken Banden auf dem Kontrollgel, auch auf zwei Sequenzierungen aufgeteilt werden.

3.8.2.1 Sequenzierung von β-Catenin

Die Mutations- und Deletionsanalyse von β-Catenin erfolgt ausschließlich in Exon 3. Hierzu wird der Bereich von Exon 2 bis 4 (b-catenin-ex2 und b-catenin-ex4r) amplifiziert und anschließend mit dem Primer b-catenin-in3r sequenziert.

Sequenzierprogramm:

94°C	5'	1x
94°C	30''	40x
60°C	30''	
72°C	1'20''	
72°C	10'	1x

3.8.2.2 Sequenzierung von WT1

3.8.2.2.1 Sequenzierung von WT1 aus genomischer DNA

Für die Mutationsanalyse von WT1 werden ausschließlich die Exons 7 bis 10 untersucht, da hier erfahrungsgemäß die häufigsten Mutationen auftreten. Die Amplifikation von Exon 7 erfolgt mit den Primern WT1-Ex7s und WT1-Ex7a, für Exon 10 werden die Primer WT1-Ex10s und WT1-seqEx10rev verwendet. Exon 8 und 9 werden gemeinsam amplifiziert (WT1-Ex8s_neu und WT1-Ex9as_neu).

Programm Exon 7, 10:

94°C	5'	1x
94°C	30''	35x
60°C	30''	
72°C	30''	
72°C	5'	1x

Programm Exon 8-9:

94°C	5'	1x
94°C	30''	35x
60°C	30''	
72°C	1'10''	
72°C	5'	1x

Die Sequenzierung der einzelnen Exons aus den PCR-Produkten erfolgt mit folgenden Primern unter Standardbedingungen:

- Exon 7: WT1-Ex7s
- Exon 8: WT1-Ex8s_neu
- Exon 9: WT1-Ex9s (+Betain)
- Exon 10: WT1-Ex10kurzrev

3.8.2.2.2 Sequenzierung von WT1 aus cDNA

Zur Sequenzierung von WT1 aus cDNA wird die gesamte cDNA mit den Primern WT1-Ex1seqfor und WT1-Ex10seqrev per PCR amplifiziert.

PCR-Programm:

94°C	5'	1x
94°C	30''	40x
60°C	30''	
72°C	2'	
72°C	10'	1x

5 µl der Reaktion werden auf einem 1 % TAE-Agarosegel überprüft, wobei die PCR nur dann für die Sequenzierung brauchbar ist, wenn das Produkt deutlich auf dem Agarosegel sichtbar ist. Nach dem Exo/SAP-Verdau werden die Sequenzierreaktionen nach Standardprotokoll durchgeführt. Die Amplifikation erfolgt mit WT1Seq_Ex1for bei 68°C mit Betain, mit WT1Seq_Ex5for und WT1Seq_Ex5rev bei 60°C mit Betain und mit WT1-Ex10kurzrev bei 60°C.

4. Ergebnisse

4.1 LOH-Analysen auf 11q und 16q in Wilms Tumoren

LOH-Analysen der Chromosomenregionen 11q und 16q zeigten in früheren Studien Assoziationen von Allelverlusten mit klinischen Parametern, wie z.B. ein erhöhtes Rezidivrisiko oder einer schlechten Prognose [Klamt, 1998 #3; Grundy, 2005 #5]. Da diese Studien jedoch in einer kleinen Anzahl von Tumoren bzw. in eingeschränkten Bereichen durchgeführt wurden, sollten LOH-Analysen der kompletten Regionen in einer großen Anzahl von Tumoren die prognostische Relevanz offen legen und zudem zu einer Eingrenzung der kritischen Regionen führen. Hierfür wurden 11 bzw. 6 Mikrosatelliten-Marker in 225 bzw. 223 Wilms Tumoren für die Analyse von 11q und 16q eingesetzt. Die Lage und Verteilung der ausgewählten Marker ist in Abb. 6 dargestellt. Die entsprechenden Regionen wurden mittels PCR in Tumor- und Vergleichsmaterial der Patienten amplifiziert und die Fragmente auf dem ALF Sequenziergerät analysiert. Die statistische Auswertung im Vergleich mit den klinischen Daten der Patienten sollte zeigen, inwieweit Allelverluste dieser Regionen signifikante Assoziationen mit bestimmten Parametern aufweisen.

Von den eingesetzten Markern auf 11q und 16q waren durchschnittlich 7 von 11 bzw. 5 von 6 informativ und konnten ausgewertet werden. Die LOH-Rate betrug 19,6 % für 11q bzw. 18,4 % für 16q, wobei in beiden Fällen meist der komplette Chromosomenarm oder zumindest weite Teile davon betroffen waren (vgl. Tab. 5).

	LOH 11q	LOH 16q
LOH-Rate	44 / 225 (19,6 %)	41 / 223 (18,4 %)
Kompletter Verlust	25	30
Interstitieller/terminaler Verlust	11	6
Verlust einzelner Marker	8	5

Tab. 5: Häufigkeit von Allelverlusten auf 11q und 16q.

In beiden Fällen gelang es nicht, die Region mit Allelverlusten nicht auf einen kleineren, kritischen Bereich einzugrenzen. Zwar gab es bei beiden Untersuchungen auch Tumoren, die nur Teile der Chromosomenarme verloren hatten, jedoch überlappten diese eingeschränkten Allelverluste nicht derart, dass eine Identifikation einer einzigen kritischen Region bzw. eines potenziell relevanten Tumorsuppressorgens möglich gewesen wäre (siehe Abb. 6).

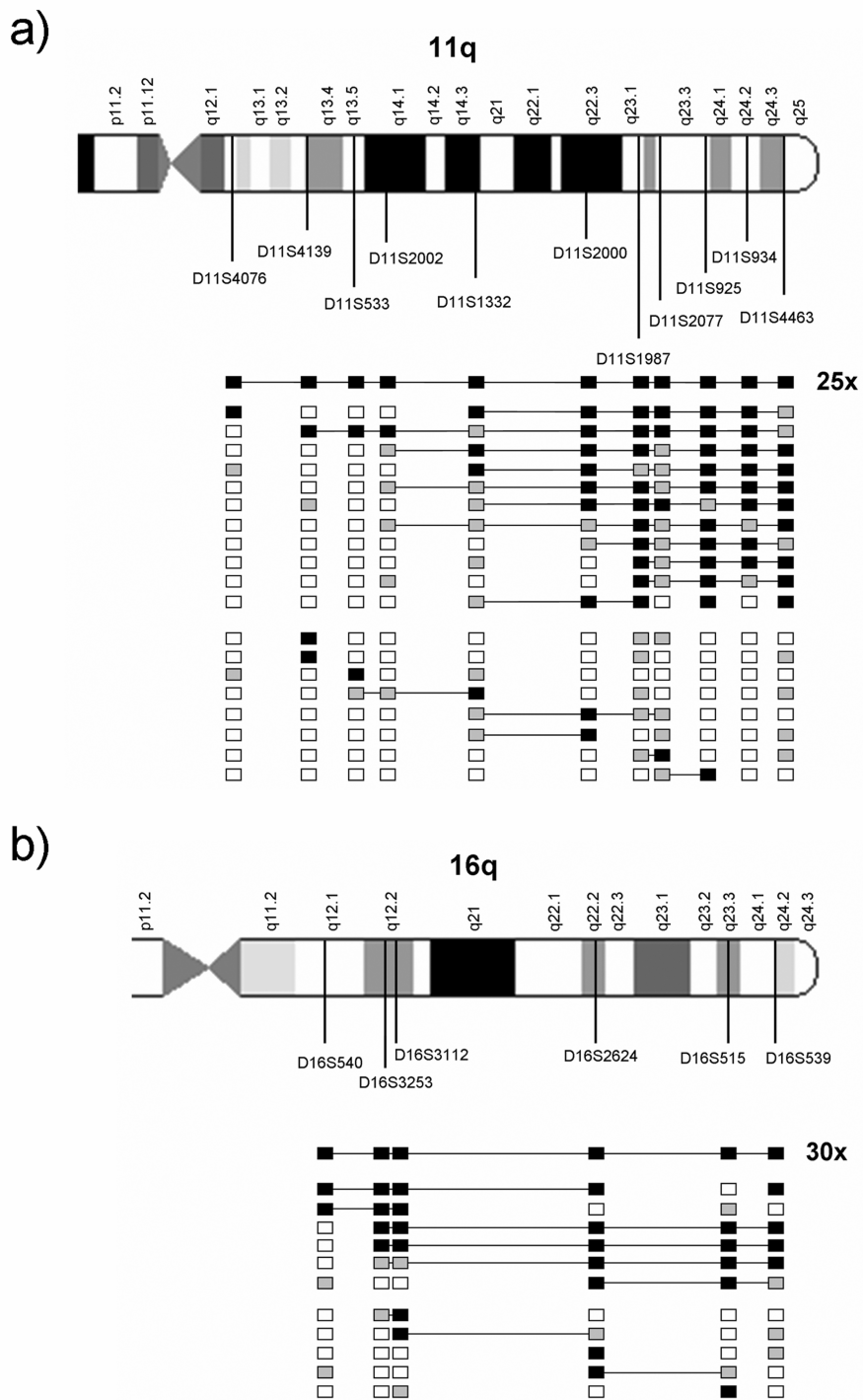


Abb. 6: Lokalisation der untersuchten Marker und Umfang der festgestellten Allelverluste.

Gezeigt ist die Lage der Mikrosatelliten-Marker für die Regionen 11q (a) und 16q (b).

Die Farbe der Kästchen indiziert die Ausmaße der Allelverluste: schwarze Kästchen bedeuten komplette Allelverluste in der entsprechenden Region, wobei der komplette Allelverlust in 25 bzw. 30 Fällen für 11q bzw. 16q jeweils in der ersten Reihe zusammengefasst dargestellt ist. Graue Kästchen stellen nicht-informative Marker dar, weiße Kästchen diejenigen Marker, die nach wie vor Heterozygotie aufwiesen. Die dünnen Verbindungslinien zwischen den Kästchen deuten auf die Ausmaße der Allelverluste entlang des Chromosoms hin. Hierin eingeschlossen sind auch nicht-informative Marker zwischen und neben Markern mit Allelverlusten, da diese ebenfalls potenziell involviert sind.

Interessanterweise waren in etwa der Hälfte der Tumoren mit LOH (N=22) Allelverluste auf 11q sowie auf 16q zu beobachten ($p < 0,0000001$).

Für 11q ergab sich zusätzlich eine Assoziation mit LOH der Regionen 11p13 und/oder 11p15, in denen sich WT1 und das postulierte WT2 befinden. Bei 27 von 44 Tumoren mit Allelverlusten auf 11q waren ebenso 11p13 und/oder 11p15 betroffen. Noch deutlicher wird diese Verbindung werden nur die 25 Tumoren betrachtet, die einen kompletten Allelverlust auf 11q aufweisen. Hier konnte bei insgesamt 21 Tumoren (84 %) zusätzlich LOH auf 11p festgestellt werden ($p < 0,00001$), wohingegen sich kein Zusammenhang zwischen den terminalen und interstitiellen Allelverlusten sowie LOH auf 11q, der nur einzelne Marker betraf, mit LOH auf 11p ergab ($p > 0,05$) (s. Tab. 6).

Ausmaß des Allelverlusts	LOH 11p15 und/oder 11p13			p-Wert (Fischer Test)
	Nein	Ja	Nicht informativ	
Kompletter Allelverlust auf 11q	3	21	1	$p < 0,00001$
Interstitieller, terminaler Allelverlust oder LOH eines einzigen Markers auf 11q	9	6	4	$p > 0,05$
Gesamt	12	27	5	

Tab. 6: Assoziation von LOH 11q und 11p.

4.1.1 LOH und Mutationen in CTNNB1 und WT1

Insgesamt 167 der 225 Wilms Tumoren wurden auf ihren CTNNB1 Mutationsstatus untersucht, wovon in 22 eine Mutation nachgewiesen werden konnte. Vergleiche mit den LOH-Analysen ergaben, dass nur einer der 22 Tumoren mit CTNNB1 Mutation LOH 11q, jedoch keiner LOH 16q aufwies. Für WT1 ergab sich ein ähnliches Bild. Von insgesamt 126 untersuchten Tumoren trugen 10 eine WT1 Mutation. Hier lies sich weder LOH auf 11q noch auf 16q finden. Somit scheinen Allelverluste in diesen Regionen in Tumoren mit Mutation in einem oder beiden Genen extrem selten zu sein bzw. gar nicht vorzukommen. Jedoch erwiesen sich diese Beobachtungen vermutlich auf Grund zu kleiner Stichprobenzahlen als nicht statistisch signifikant ($p > 0,05$), mit Ausnahme der Assoziation vom CTNNB1 Mutationsstatus mit LOH 16q ($p = 0,02$).

4.1.2 Korrelation von LOH mit klinischen Daten

Um zu testen, ob LOH-Untersuchungen von 11q und 16q prognostisch relevant sind, wurden die Daten der LOH-Analysen in Verbindung mit verschiedenen klinischen Parametern der Patienten ausgewertet. Herangezogen wurden die Histologie, das Ansprechen auf die Chemotherapie, das Vorliegen primärer Metastasen, die Entstehung eines Rezidivs und der Tod der Patienten. Für die histologische Auswertung wurden die Tumoren nach der geltenden SIOP-Klassifikation in hochmaligne (blastemreiche Tumoren und Tumoren mit diffuser Anaplasie) und niedrig/intermediär maligne (alle anderen Subtypen) Tumoren gruppiert. Beim Kriterium „Ansprechen auf die Chemotherapie“ wurden Tumoren nach der Höhe der Tumolvolumenreduktion im Verlauf der Chemotherapie beurteilt. Die Einteilung erfolgte in zwei Gruppen: Tumolvolumenreduktion um mehr als 50 % (gutes Ansprechen) gegenüber Reduktion bis zu 50 % bzw. Volumenzunahme (schlechtes Ansprechen). Für die restlichen Kriterien erfolgte die Gruppierung in „Ja“ gegen „Nein“, wobei für die Auswertung des Kriteriums Rezidiv nur diejenigen Patienten als rezidivfrei herangezogen wurden, deren primäre Erkrankung mindestens zwei Jahre zurücklag.

Leider konnten für die statistische Analyse nicht alle in der Studie eingesetzten Tumoren verwendet werden, da die klinischen Daten nur für 205 Tumoren verfügbar waren. Von den restlichen Tumoren stand lediglich fest, dass es sich tatsächlich um Wilms Tumoren handelte. Die Korrelation der klinischen Daten mit den LOH-Analysen ergab eine statistisch signifikante Assoziation von LOH 11q mit höheren Rezidiv- und Sterberaten, ebenso wie mit verschiedenen histologischen Subtypen. Gleichmaßen hing LOH 16q mit einem erhöhten Rezidivrisiko und verschiedenen histologischen Subtypen zusammen (s. Tab. 7 und 8).

Parameter	LOH 11q		p-Wert	LOH 16q		p-Wert
	Nein	Ja		Nein	Ja	
WT1 Mutation						
Nein	92	24	>0,05	87	27	>0,05
Ja	10	0		9	0	
CTNNB1 Mutation						
Nein	116	30	>0,05	117	29	0,02
Ja	21	1		22	0	
Histologie - Malignität						
Niedrig/Intermediär	151	31	>0,05 (0,07)	151	30	>0,05
Hoch	13	7		13	7	
Ansprechen auf Chemotherapie [§]						
Schlecht	40	8	>0,05	36	12	>0,05
Gut	67	16		69	15	
Primäre Metastasen						
Nein	131	33	>0,05	136	27	>0,05
Ja	34	5		30	9	
Rezidiv						
Nein (>2 Jahre)	145	30 (14*)	>0,05 (0,007*)	157	22 (21*)	<0,00001 (<0,00001*)
Ja	20	9 (8*)		14	15 (6*)	
Tod						
Nein	157	34 (17*)	>0,05 (0,01*)	158	32 (23*)	>0,05 (>0,05*)
Ja	9	5 (4*)		9	5 (4*)	

Tab. 7: Statistische Auswertung von LOH 11q und 16q mit den klinischen Daten.

[§]Schlecht: Reduktion ≤50% bzw. Volumenzunahme; Gut: Reduktion >50%

* Tumoren mit Verlust des gesamten Chromosomenarms.

Da bei zahlreichen Tumoren mit LOH 11q auch Allelverluste auf 11p vorlagen und dies mit einer hohen statistischen Signifikanz zusammenzuhängen schien (s. Tab. 6), sollte ausgeschlossen werden, dass Korrelationen mit den klinischen Daten von den Verlusten auf 11p resultieren und fälschlicherweise auf LOH 11q bezogen werden. Aus diesem Grund wurden in einer weiteren Analyse die klinischen Daten mit LOH 11p korreliert, was zu keinem statistisch signifikanten Ergebnis führte.

4.1.2.1 LOH 11q und Histologie

Für die Analyse der Assoziationen von Histologie und LOH 11q wurden die Tumoren zuerst in die zwei Hauptgruppen unterteilt: Tumoren mit hoher Malignität und Tumoren mit niedriger bzw. intermediärer Malignität. Diese Einteilung der Tumoren ergab keine signifikante Assoziation mit LOH 11q, jedoch verfehlte der p-Wert mit 0,07 nur knapp die Signifikanzhürde von 5 % (vgl. Tab. 7). Aus diesem Grund erfolgte eine getrennte Analyse der einzelnen Subtypen mit LOH 11q, wobei sich herausstellte, dass es einzelne Tumorguppen gab, die signifikant mit LOH 11q zusammenhängen (s. Tab. 8). So zeigten z.B. Mischtyp-Tumoren und Tumoren mit diffuser Anaplasie 2,4-fach und 3,9-fach erhöhte LOH-Raten verglichen mit allen anderen Tumortypen (p=0,004 und p=0,01). Im

Gegensatz hierzu wies keiner der 19 epithelialen sowie der 20 stromareichen Tumoren LOH auf 11q auf ($p=0,03$). Eine kombinierte Analyse der beiden Tumortypen ohne LOH 11q im Vergleich mit allen anderen Tumortypen, die LOH 11q aufwiesen, ergab ein noch weitaus höheres Signifikanzniveau ($p<0,001$).

Histologie	11q			16q		
	N	LOH (%)	p-Wert	N	LOH (%)	p-Wert
Gesamt	203	38 (18,7 %)	---	202	37 (18,3 %)	---
Mischtyp	69	21 (30,4 %)	<0,01	67	15 (22,4 %)	>0,05
Epithelial	19	0 (0 %)	0,03	18	0 (0 %)	0,05
Stromareich	20	0 (0 %)	0,03	20	1 (5,0 %)	>0,05
Total/subtotal regressiv	44	7 (15,9 %)	>0,05	46	9 (19,6 %)	>0,05
Blastemreich – intermediär maligne *	9	1 (11,1 %)	>0,05	9	1 (11,1 %)	>0,05
Blastemreich – hoch maligne *	14	3 (21,4 %)	>0,05	14	3 (21,4 %)	>0,05
Fokale Anaplasie	3	1 (33,3 %)	>0,05	3	2 (66,7 %)	>0,05
Diffuse Anaplasie	6	4 (66,7 %)	0,01	6	4 (66,7 %)	0,01

Tab. 8: Allelverluste in Tumoren der verschiedenen histologischen Subtypen von Wilms Tumoren.

Die p-Werte beziehen sich auf den prozentualen Anteil an LOH im entsprechenden Tumortyp verglichen mit dem Anteil an LOH in allen anderen Tumortypen.

* Blastemreiche Tumoren werden in zwei Gruppen eingeteilt, die in unterschiedliche Risikogruppen eingestuft werden. Die Einstufung als intermediär maligner Tumor erfolgt für primär operierte Tumoren, als hoch maligner Tumor, wenn auch nach erfolgter präoperativer Chemotherapie noch große Mengen von Blastem vorliegen [Vujanic, 2002 #15].

Interessanterweise stellte sich bei näherer Betrachtung der Alterationen der verschiedenen Tumortypen heraus, dass in Mischtypumoren LOH 11q oft gemeinsam mit LOH 11p13 auftrat. So waren 21 der 44 (47,7 %) Tumoren mit LOH 11q Mischtypumoren, von denen 15 (71,4 %) zusätzlich Allelverluste auf 11p13 aufwiesen. Um diese Beobachtung statistisch zu evaluieren, wurden diejenigen Tumoren mit LOH in beiden Regionen mit den Tumoren verglichen, die LOH nur in einer der beiden Regionen zeigten. Tatsächlich ergab sich eine hoch signifikante Assoziation von Mischtypumoren mit LOH in beiden Regionen ($p<0,01$).

4.1.2.2 LOH 16q und Histologie

Bei der Evaluierung der Histologie (unterteilt in niedrig/intermediär und hoch maligne Tumoren) mit LOH 16q ergab sich, wie bereits zuvor für 11q, keine statistisch signifikante Assoziation (s. Tab. 7). Jedoch resultierte auch hier die detaillierte Analyse der einzelnen Subtypen mit LOH 16q in einem statistisch signifikanten Zusammenhang für Tumoren mit diffuser Anaplasie ($p=0,01$). Während insgesamt vier der sechs anaplastischen Tumoren LOH 16q aufwiesen, zeigten dies nur 33 der 196 (16,8 %) restlichen Tumoren anderer Histologie. Somit konnte eine 4-fach höhere LOH-Rate in diesen Tumoren festgestellt werden. Wie schon zuvor bei der Auswertung von LOH 11q gesehen, zeigten die 18 epithelialen Tumoren keinen LOH 16q ($p=0,05$) und nur einer der 20 stromareichen Tumoren, was jedoch nicht statistisch signifikant war ($p>0,05$). Bei der kombinierten Analyse der beiden Tumorgruppen, die LOH wenn überhaupt nur auf einem sehr niedrigen Niveau aufwiesen, verglichen mit allen anderen Tumortypen, ergab sich eine um 8,5-fach verminderte Inzidenz von LOH 16q, was statistisch hoch signifikant war ($p<0,01$) (vgl. Tab. 8).

4.1.3 Vergleich der Tumoren mit niedrigen LOH-Raten 11q und 16q

Nachdem sowohl Tumoren mit CTNNB1 und WT1 Mutation, sowie epitheliale und stromareiche Tumoren nur sehr geringe LOH-Raten bzw. niemals LOH in beiden Regionen zeigten, kam die Frage auf, inwieweit sich diese Gruppen überschneiden. Die Analyse zeigte, dass keiner der 16 bzw. 9 epithelialen Tumoren, die auf CTNNB1 bzw. WT1 Mutationen untersucht waren, eine Mutation in einem der beiden Gene aufwies. Somit schienen die Gruppen der epithelialen Tumoren und der Tumoren mit Mutation nicht zu überlappen und unabhängig voneinander nur sehr geringe LOH-Raten auf 11q und 16q aufzuweisen. Im Gegensatz dazu zeigten fast alle (12 von 15) der untersuchten, stromareichen Tumoren eine Mutation in CTNNB1 und etwa die Hälfte (5 von 12) eine WT1 Mutation. Diese Gruppen überschneiden sich also zu einem gewissen Anteil, vor allem die stromareichen mit den CTNNB1 mutierten Tumoren.

4.1.4 Korrelationen mit Rezidiv und Mortalität

Die Auswertung der LOH-Analysen 11q und 16q mit Rezidivbildung und Mortalität konnte in 186 bzw. 187 Wilms Tumoren durchgeführt werden, da hier die klinischen Daten vorlagen. Es zeigte sich, dass sich für LOH 11q nur dann signifikante Assoziationen ergaben, wenn der komplette lange Arm verloren war. Rezidivierende Tumoren und Tumoren von verstorbenen Patienten zeigten 3,3-fach und 3,6-fach höhere LOH-Raten verglichen mit nicht-rezidivierenden Tumoren und Tumoren von Überlebenden ($p<0,01$ und $p=0,01$). Die Auswertung für LOH 16q führte zu hoch signifikanten Ergebnissen für die Rezidivbildung, die noch etwas höher lagen, wenn auch hier nur die Tumoren mit

Verlust des kompletten Arms berücksichtigt wurden ($p < 0,00001$). In diesen Tumoren wurden 5,7-fach höhere LOH-Raten beobachtet verglichen mit nicht-rezidivierenden Tumoren. Auch was die Sterberaten betrifft, konnten Unterschiede festgestellt werden. So besaß etwa ein Drittel (30,8 %) der Tumoren von verstorbenen Patienten LOH auf 16q gegenüber nur 12,7 % bei Überlebenden. Allerdings erlangte diese Beobachtung mit einem p-Wert von 0,09 keine statistische Signifikanz.

Wie zuvor beschrieben, ergaben sich bereits für die Tumoren mit diffuser Anaplasie Assoziationen mit LOH 11q und 16q. Da die Anaplasie derzeit einen der wichtigsten Faktoren zur Vorhersage einer erhöhten Rezidivwahrscheinlichkeit und Mortalität darstellt, sollte getestet werden, ob der Einfluss von LOH 11q und 16q auf die Rezidiv- und Sterberate auch unabhängig von der Anaplasie Bestand hat oder die Ergebnisse nur die Histologie widerspiegeln. Aus diesem Grund wurden in einer weiteren Analyse die Tumoren mit Anaplasie ausgeschlossen. Es stellte sich heraus, dass nach wie vor eine Assoziation zwischen LOH 11q (kompletter Arm) und der Sterberate bestand ($p = 0,03$), sowie eine immer noch hoch signifikante Verbindung zwischen LOH 16q (kompletter Arm) und einer höheren Rezidivrate ($p < 0,00001$). Allerdings konnte in der zweiten Analyse die Verbindung von LOH 11q mit einer höheren Rezidivwahrscheinlichkeit nicht bestätigt werden ($p = 0,15$), obwohl sich immer noch 2,2x mehr Rezidive bei Tumoren mit LOH entwickelt hatten als bei Tumoren ohne LOH 11q.

4.2 Realtime RT-PCR Analysen in Wilms Tumoren

In einem zweiten Ansatz sollten von bisher veröffentlichten Genen, deren Expression bereits mit der Entwicklung bzw. dem Fortschreiten von Wilms Tumoren in Verbindung gebracht werden konnte, diejenigen herausgefiltert werden, die in einer großen Anzahl und einem breiten Spektrum von Tumoren prognostische Relevanz besitzen. Hierfür wurde eine umfangreiche Literaturrecherche durchgeführt, durch welche 29 potenziell wichtige Gene und Proteine ermittelt wurden (s. Tab. 9).

Da in früheren Veröffentlichungen diverse Untersuchungsmethoden eingesetzt wurden, sollte die Expression der Gene mittels einer einheitlichen Methode ermittelt werden, der Realtime RT-PCR.

Gen	Referenz	Gen	Referenz
ABCC1	[Goldstein, 2003 #49]	IGF2	[Takahashi, 2002 #37]
BAX	[Ghanem, 2001 #50]	IGF2R	[Xu, 1997 #59]
BCL2		ITGA8	[Takahashi, 2002 #37]
BCL-X _L		MMP16	[Takahashi, 2002 #37]
CD44_v5	[Ghanem, 2002 #51]	MYC	[Udtha, 2003 #60]
CDKN2A	[Arcellana-Panlilio, 2000 #52]	MYCN	[Zim, 2006 #61]
CDKN2A_ARF		NTRK2_full	[Eggert, 2001 #39]
CRABP2	[Takahashi, 2002 #37]	NTRK2_trunc	
DBC1	[Takahashi, 2002 #37]	STMN1	[Takahashi, 2002 #37]
DKK1	[Wirths, 2003 #54]	TERT	[Dome, 1999 #63] [Dome, 2005 #38]
DNAJB1	[Takahashi, 2002 #37]	TGFA	[Ghanem, 2001 #55]
EGFR	[Ghanem, 2001 #55]	TOP2A	[Takahashi, 2002 #37]
EGR1	[Ghanem, 2000 #56]	TRIM22	[Zim, 2006 #61]
FASN	[Camassei, 2003 #57]	VEGF	[Ghanem, 2003 #58]
FLT1	[Ghanem, 2003 #58]		

Tab. 9: Bisherige Veröffentlichungen potenziell relevanter Marker-Gene in Wilms Tumoren.

Zusätzlich wurden HEY1, HEY2 und HEYL analysiert, da diese in die Angiogenese involviert sind und somit vermutlich auch bei der Angiogenese in Tumoren eine Rolle spielen ([Fischer, 2004 #40] und unsere nicht-publizierte Beobachtung). Da auch für CA9 und die ID-Gene eine Beteiligung an der Entwicklung menschlicher Tumoren und in Mausmodellen gezeigt werden konnte [Perk, 2005 #41; Sikder, 2003 #42; Robertson, 2004 #43], war deren Expression in Wilms Tumoren ebenso von Interesse.

Zur Bestimmung des Expressionsniveaus der Gene wurden Realtime RT-PCR Analysen in 120 (Originalsatz) bzw. 76 (Validierungssatz) Wilms Tumoren durchgeführt. Hierfür wurde RNA aus den Tumoren gewonnen, in cDNA umgeschrieben und in der Realtime RT-PCR eingesetzt. Normalisierung der Messdaten auf das Haushaltsgen HPRT sollten mögliche Mengenunterschiede zwischen den verschiedenen cDNAs abgleichen. Da auf Grund der Anzahl der Tumoren im Originalsatz die zeitgleiche Messung der Expression eines Gens in allen Tumoren nicht durchführbar war und die Messung auf zwei getrennten 96-well Platten sukzessive erfolgen musste, wurden zusätzlich jeweils 3 Kontroll-cDNAs gemessen, was den anschließenden Vergleich der beiden Platten erlaubte. Diese Kontroll-cDNAs wurden jeweils aus 3 verschiedenen, besonders aufgereinigten RNA-Proben von Wilms Tumoren synthetisiert, um somit eine sehr stabile Messung zu ermöglichen. Zur Analyse der Assoziationen mit den klinischen Daten wurden die Tumoren nach dem Abgleich auf die Kontrollproben und HPRT nach verschiedenen Kriterien gruppiert: CTNNB1 Mutationsstatus, histologische Risikogruppe, Ansprechen auf die Chemotherapie, Vorliegen primärer Metastasen, Rezidivbildung und Tod. Einen Überblick über die Verteilung der Tumoren im Original- und Validierungssatz entsprechend ihrer klinischen Daten gibt Tab. 10. Zur Bestimmung der Expressionsdifferenzen wurden die Mediane der Genexpression in den verschiedenen Tumorgruppen ermittelt. Hierfür wurde die Verdoppelung der DNA pro PCR-Zyklus angenommen und mit der Formel

$$\text{Expressionsdifferenz} = 2^{|\text{Differenz Median2} - \text{Median1}|}$$

die Expressionsdifferenzen zwischen den Gruppen berechnet. Positive Werte der Differenz von Median 2 – Median 1 wurden anschließend als Überexpression, negative Werte als Repression des Gens in der jeweils zweiten Gruppe gewertet.

Parameter	Original Tumorsatz				Validierungssatz		
	N	Nein	Ja	kD	N	Nein	Ja
Präoperative Chemotherapie	120	15	102	3	76	0	76
CTNNB1 Mutation	120	106	14	0	76	kD	kD
Primäre Metastasen	120	101	18	1	75	58	17
Reduktion des Tumolvolumens >50%	102*	27	49	26	58	22	36
Hoch maligner Tumor (gg. niedrig/intermediär maligner Tumor)	120	108	12	0	76	70	6
Rezidiv	120	98	19	3	73	60	13
Tod	120	104	13	3	75	72	3

Tab. 10: Anzahl der untersuchten Tumoren in den entsprechenden klinischen Parametern.

*nicht zutreffend für 15 primär operierte Tumoren und 3 Tumoren mit unbekannter Therapieform, kD = keine Daten

4.2.1 Statistische Analyse der Expressionsdaten

Die Reihenfolge und Verfahrensweise der statistischen Analyse ist in Abb. 7 dargestellt, wird jedoch zur besseren Verständlichkeit im folgenden Text genauer erläutert.

Diese wurde gemeinsam mit Christina Wunder vom DKFZ in Heidelberg durchgeführt, unter Verwendung des Software-Pakets R (Version 2.4.0, zusammen mit “Design” und “impute”; <http://cran.r-project.org/>), SAS (Version 9.1) und SPSS (V 11.5, Standardversion).

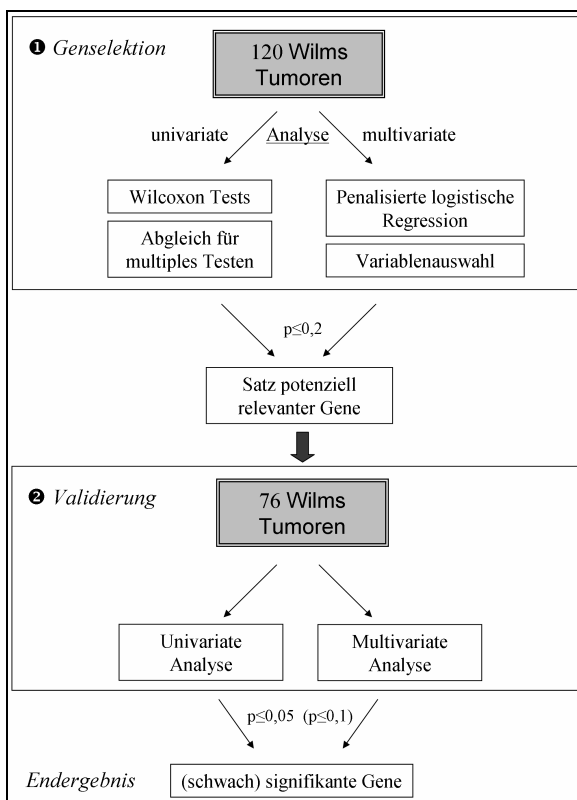


Abb. 7: Übersicht über die Verfahrensweise der statistischen Analyse.

4.2.1.1 Analysen des Original-Tumorsatzes

4.2.1.1.1 Univariate Analyse

In den meisten früheren Publikationen wurden jeweils nur die Expression einzelner Gene untersucht und diese mit den klinischen Daten verglichen. Aus diesem Grund wurde in einer ersten Analyse jedes der untersuchten Gene separat mit den klinischen Daten ausgewertet, um den direkten Vergleich mit den früheren Ergebnissen zu ermöglichen. Bei insgesamt sechs Genen, NTRK2_full, NTRK2_trunc, NTRK2_shc, TERT, TGFA und WT1, konnten auf Grund fehlender bzw. niedriger Expression des Gens bei etwa der Hälfte der Tumoren keine Messdaten erhalten werden, weshalb fehlende Werte durch den höchstmöglichen Messwert (40 Zyklen) ersetzt wurden.

In einer univariaten Analyse wurden Wilcoxon Rangsummentests durchgeführt, die dazu dienen, Mediane zweier Gruppen statistisch miteinander zu vergleichen. Es zeigte sich, dass sich für jedes untersuchte Kriterium mehrere Gene z.T. sehr stark in ihrer Expressionshöhe unterschieden (s. Tab. 11). Jedoch ergaben sich die meisten Differenzen im Bezug auf die Histologie. Hier waren insgesamt 12 Gene in ihrer Expression stark dereguliert, wovon sieben in fortgeschrittenen Tumoren reprimiert und fünf überexprimiert waren. Die markantesten Veränderungen jedoch wurden in der Expression von HEY2, MYCN, TERT, TOP2A und TRIM22 festgestellt, bei denen signifikante Expressionsunterschiede in drei oder sogar vier der untersuchten klinischen Kriterien bestanden. Zudem zeigte sich, dass sowohl die Überexpression von TERT und MYCN wie auch die Repression von HEY2 und TRIM22 stets bei fortgeschrittenen Tumoren, wie z.B. hoch malignen und rezidivierenden Tumoren, beobachtet werden konnte. Überraschenderweise besaßen zahlreiche Gene jedoch keinerlei Expressionsunterschiede zwischen verschiedenen Tumorguppen, obwohl dies in früheren Studien der Fall war: BAX, CDK4, CRABP2, DNAJB1, EGFR, FASN, HEY1, HEYL, ID1, ID3, IGF2R, MMP16, sowie die zwei der drei Isoformen von NTRK2, NTRK2_full und NTRK2_truncated.

	CTNNB1-Mut Nein (106) - Ja (14)	Histologie Niedrig/intermediär maligne (108) - Hoch maligne (12)	Ansprechen auf Chemotherapie Schlecht (27) – Gut (49)	Primäre Metastasen Nein (101) - Ja (18)	Rezidiv Nein (98) - Ja (19)	Tod Nein (104) - Ja (13)
ABCC1	1,1x 0,84	-1,9x 0,27	1,9x 0,73	1,1x 0,77	-2,5x 0,03	-2,3x 0,07
BAX	-1,6x 0,52	1,2x 0,73	1,4x 0,58	1,8x 0,23	1,3x 0,42	1,3x 0,37
BCL2	1,6x 0,92	-1,3x 0,72	2,1x 0,02	-1,1x 0,82	-2,1x 0,11	-1,0x 0,51
BCL-XL	1,4x 0,99	-1,2x 0,70	1,9x 0,03	2,1x 0,28	-2,0x 0,52	-2,0x 0,59
CA9	-1,9x 0,70	1,2x 0,97	-1,9x 0,15	3,4x 0,02	1,1x 0,63	1,1x 0,61
CD44_v5	-1,8x 1,00	-4,9x 0,03	1,9x 0,72	2,8x 0,08	-4,1x 0,09	-5,9x 0,02
CDK4	-1,0x 0,73	1,0x 0,87	1,2x 0,36	-1,3x 1,00	-1,3x 0,66	-1,4x 0,53
CDKN2A	-2,3x 0,04	-1,2x 0,47	1,5x 0,33	1,6x 0,17	1,1x 0,65	1,1x 0,66
CDKN2A_ARF	-3,6x 0,07	-2,2x 0,19	2,4x 0,36	2,4x 0,04	-1,0x 0,81	1,1x 0,54
CRABP2	1,7x 0,10	1,9x 0,16	-1,4x 0,88	-3,7x 0,17	1,4x 0,17	1,3x 0,79
DBC1	-2,2x 0,13	3,5x 0,04	1,5x 0,26	-2,1x 0,19	2,2x 0,51	1,2x 0,99
DKK1	8,9x <0,01 ■	-2,3x 0,11	-2,8x 0,08	1,3x 0,30	-1,3x 0,83	-1,6x 0,13
DNAJB1	-1,1x 0,83	-1,8x 0,13	1,7x 0,16	1,2x 0,50	-1,6x 0,78	-1,7x 0,45
EGFR	1,2x 0,44	-1,3x 0,13	1,1x 0,29	1,9x 0,17	-2,1x 0,27	-2,8x 0,06
EGR1	1,2x 0,28	-2,3x 0,05	4,8x <0,001 ■■	4,8x 0,02	-1,3x 0,19	-1,2x 0,22
FASN	-1,7x 0,44	1,4x 0,86	1,5x 0,34	-1,1x 0,79	1,2x 0,42	-1,0x 0,89
FLT1	2,9x 0,20	-2,9x 0,02	1,1x 0,87	1,1x 0,70	1,1x 0,87	0x 0,52
HEY1	-1,0x 0,70	1,2x 0,66	-1,5x 0,14	-2,6x 0,08	-1,1x 0,64	1,7x 0,70
HEY2	1,9x <0,01 ■	-2,5x <0,01 ■	-2,0x 0,04	-1,3x 0,34	-3,5x <0,0001 ■■	-2,1x <0,01 ■
HEYL	-1,4x 0,79	-1,3x 0,47	1,5x 0,45	-1,2x 0,81	-1,9x 0,08	-1,7x 0,26
ID1	1,1x 0,82	-1,1x 0,53	-1,3x 0,84	-2,2x 0,36	0x 0,78	0x 0,61
ID2	1,0x 0,40	-2,7x 0,03	1,8x 0,21	0x 0,96	-1,4x 0,19	1,1x 0,69
ID3	1,6x 0,26	-1,4x 0,44	1,1x 0,42	-1,3x 0,56	-1,3x 0,96	-1,3x 0,63
ID4	-2,0x 0,05	2,3x 0,10	1,4x 0,34	1,4x 0,65	1,4x 0,08	1,5x 0,05
IGF2	2,5x 0,02	1,0x 0,64	2,0x 0,46	-1,5x 0,40	1,4x 0,72	1,4x 0,79
IGF2R	-1,3x 0,69	1,1x 0,46	1,9x 0,06	1,4x 0,47	-1,5x 0,26	-1,7x 0,19
ITGA8	-1,4x 0,18	2,3x 0,01	2,3x 0,02	-2,4x 0,23	1,6x 0,52	1,9x 0,39
MMP16	1,5x 0,33	1,7x 0,32	1,1x 0,36	-1,9x 0,10	-1,0x 0,95	-1,4x 0,57
MYC	-1,2x 0,79	-3,2x 0,02	1,2x 0,43	1,7x 0,12	-2,7x 0,26	-2,6x 0,20
MYCN	-1,7x 0,89	3,9x 0,02	0x 0,86	-2,5x 0,28	3,7x 0,01	4,3x 0,02
NTRK2_full	-2,9x 0,16	1,3x 0,51	2,1x 0,22	-2,8x 0,20	-1,4x 0,80	1,4x 0,90
NTRK2_shc	-1,8x 0,19	1,5x 0,78	1,2x 0,37	♦ 0,01	-1,3x 0,99	-1,3x 0,79
NTRK2_trunc	-1,6x 0,13	1,0x 0,69	1,4x 0,16	-2,5x 0,45	1,2x 0,71	1,2x 0,77
STMN1	2,0x 0,03	1,8x 0,05	-1,1x 0,38	-1,5x 0,03	1,8x 0,19	1,3x 0,81
TERT	-7,5x 0,18	9,4x <0,01 ■	-1,1x 0,67	1,4x 0,54	8,8x <0,001 ■■	8,0x <0,01 ■
TGFA	-5,14x 0,05	1,4x 0,37	2,6x 0,05	1,4x 0,98	1,1x 0,72	-2,4x 0,67
TOP2A	1,7x 0,21	2,4x 0,02	1,4x 0,40	-5,0x <0,01	2,6x 0,02	2,0x 0,09
TRIM22	-1,3x 0,65	-10,2x <0,01 ■	2,1x 0,09	1,6x 0,05	-4,4x <0,01 ■	-7,2x <0,01 ■
VEGF	1,3x 0,39	-2,5x <0,01 ■	-1,3x 0,47	1,3x 0,25	-1,5x 0,21	-2,1x 0,08
WT1	-5,3x 0,05	1,8x 0,07	-1,5x 0,87	-1,2x 0,86	1,7x 0,09	2,5x 0,04

Tab. 11: Expressionsänderungen und entsprechende p-Werte der Gene zwischen den Tumorgruppen, getestet mittels Wilcoxon Rangsummentests.

Tumorgruppen in den entsprechenden klinischen Parametern wie zuvor beschrieben (vgl. Tab 10). Fett gedruckte Zahlen stellen die Expressionsänderungen der Gene dar, darunter sind die zugehörigen p-Werten der statistischen Auswertung angegeben. Positive Werte bedeuten die stärkere Expression und negative Werte die Repression des Gens in der jeweils zweitgenannten Tumorgruppe. Farblich markierte Kästchen kennzeichnen signifikant getestete Expressionsdifferenzen, wobei hellgraue Kästchen signifikanten Änderungen ($p \leq 0,05$) und dunkelgraue Kästchen hoch signifikanten Alterationen ($p \leq 0,01$) entsprechen.

♦ Expression in den meisten metastasierten Tumoren nicht messbar.

■ Potenziell relevant getestete Expressionsdifferenzen nach Bonferroni-Holm Abgleich ($p \leq 0,2$).

■■ Signifikante Expressionsdifferenzen nach Bonferroni-Holm Abgleich ($p \leq 0,05$).

4.2.1.1.2 Univariate Analyse mit Abgleich nach Bonferroni-Holm

Auf Grund der Anzahl der univariaten Tests, von denen jeder zu der Erhöhung der „family-wise error rate“ (FWER) beiträgt, besteht die Wahrscheinlichkeit, fälschlicherweise eine Nullhypothese, d.h. die Annahme, dass keine Expressionsdifferenzen zwischen den verschiedenen Tumoren bestehen, zu verwerfen. Um diesen zufälligen, falsch positiven Ergebnissen vorzubeugen wurde ein Abgleich für das multiple Testen nach der Bonferroni-Holm Methode durchgeführt. Nachdem dieser erste Datensatz nur zur Selektion potenziell relevanter Gene dienen sollte, die mittels eines zweiten Tumorsatzes validiert werden sollten, wurde ein weniger stringenter Grenzwert von 0,2, statt üblicherweise 0,05, gewählt. Nichtsdestotrotz blieben nur wenige Assoziationen übrig, die auf potenziell wichtige Gene hinwiesen: DKK1 war stärker in Tumoren mit CTNNB1 Mutation und EGR1 in Tumoren mit gutem Ansprechen auf die Chemotherapie exprimiert. Alterationen von HEY2, TERT, TRIM22 und VEGF waren allesamt in Hoch-Risiko Tumoren zu finden, ebenso wie in rezidivierenden Tumoren, dies jedoch mit Ausnahme von VEGF. In Tumoren, die zum Tod der Patienten führten, konnte ausschließlich eine verminderte Expression von TRIM22 festgestellt werden. Alle anderen Assoziationen der univariaten Analyse stellten sich nach dem Abgleich nach Bonferroni-Holm weder als signifikant noch als potenziell relevant heraus.

Parameter*	Variable	Abgleich p-Wert [#]	Expressionsänderung [#]
CTNNB1 Mutation	DKK1	0,10	8,9x
Histologie	HEY2	0,10	-2,5x
	TERT	0,06	9,4x
	TRIM22	0,14	-10,2x
	VEGF	0,14	-2,5x
Ansprechen auf Chemotherapie	EGR1	0,03	4,8x
Rezidiv	HEY2	0,003	-3,5x
	TERT	0,02	8,8x
	TRIM22	0,16	-4,4x
Tod	TRIM22	0,11	-7,2x

Tab. 12: Signifikante und potenziell relevante Variablen mit entsprechenden Expressionsänderungen, nach Abgleich auf multiples Testen ($p \leq 0,2$).

*Gruppen entsprechend Tabellen 10 und 11.

[#]Expressionsdifferenzen der Gene und entsprechende p-Werte zwischen versch. Tumorguppen, erhalten mit Wilcoxon Rangsummentests mit anschließendem Bonferroni-Holm Abgleich.

4.2.1.1.3 Einfluss der Therapieform auf die Ergebnisse

Nachdem sowohl primär operierte Tumoren sowie Tumoren nach präoperativer Chemotherapie in einem Ansatz analysiert wurden, sollte geklärt werden, ob diese Mischung der Tumoren einen Einfluss auf die Ergebnisse hatte. Da die Chemotherapie potenziell Einfluss auf die Expression mancher Gene nimmt, z.B. solcher, die in den Zellzyklus involviert sind, könnten sich diese Gene in ihrer Expression allein auf Grund der Therapieform unterscheiden und eine gemeinsame Auswertung unmöglich machen. Aus diesem Grund wurde die zuvor beschriebene Auswertung der univariaten Analyse ausschließlich mit den chemotherapierten Tumoren (n=102) wiederholt und die primär operierten Tumoren (n=15) ausgeschlossen. Leider war der umgekehrte Fall, ausschließlich die primär operierten Tumoren zu analysieren auf Grund der geringen Fallzahlen nicht möglich. Die exklusive Analyse der chemotherapierten Tumoren zeigte, dass nur minimale Veränderungen in der Genexpression und den zugehörigen Signifikanzen im Vergleich zur Gesamtgruppe resultierten (nicht gezeigt), was bedeutet, dass die unterschiedlichen Behandlungsmethoden der Tumoren keinen starken Einfluss auf die Expression der untersuchten Gene besaß. Somit war die gemeinsame Auswertung von Tumoren verschiedener Behandlungsarten in diesem Fall möglich.

4.2.1.1.4 Multivariate Analyse

Univariate Analysemethoden können ein mögliches „Confounding“, d.h. Einflüsse einer zweiten, nicht einbezogenen Variable auf das Resultat, nicht ausschließen. So könnten sich z.B. Effekte verschiedener Risikofaktoren oder Gene vermischen und gemeinsam auf den klinischen Verlauf der Tumoren auswirken. Die Folge wäre eine falsche Einschätzung der Bedeutung bestimmter Variablen [Sun, 1996 #44]. Aus diesem Grund wurde eine multivariate Regressionsanalyse durchgeführt, um den Beitrag einzelner Gene und der Histologie zu ermitteln und somit eine prognostische Markerkombination für klinisch relevante Parameter, wie das Ansprechen auf die Chemotherapie, primäre Metastasen, Rezidivbildung und Mortalität, zu finden. Hierfür wurden penalisierte, logistische Regressionsmodelle [Zhu, 2004 #45] mit den Expressionsdaten aller Gene und den Histologiedaten gespeist und anschließend für den ersten Tumorsatz eine Rückwärts-Selektion durchgeführt, um die signifikanten Variablen herauszufiltern. Die Berechnung der Odds Ratios inklusive deren 95 % Konfidenzintervalle diente zur Einschätzung des Einflusses der Variablen und deren Relevanz. Hierbei wird unter dem Begriff Odds die Chance einer möglichen Erkrankung bzw. dem Eintreten eines Ereignisses verstanden, wobei die Wahrscheinlichkeit des Ereignisses ($P(x)$) mit der Gegenwahrscheinlichkeit des Ereignisses ($1-P(x)$) in Beziehung gesetzt wird.

$$\text{Odds} = \left(\frac{P(x)}{1 - P(x)} \right)$$

Das Odds Ratio vergleicht die Odds zweier Gruppen und spiegelt den Faktor wieder, um den sich eine bestimmte Größe in Bezug auf eine betrachtete Einflussgröße ändert. Ist das OR gleich 1, so zeigen sich keine Veränderungen. Bei einem $OR > 1$ nimmt die Variable einen positiven, bei einem $OR < 1$ einen negativen Einfluss, wobei die Größe des OR die Höhe der Änderungen widerspiegelt. Die Berechnung des 95 % Konfidenzintervalls des OR dient der Angabe des Wertebereichs, den mit 95 %iger Wahrscheinlichkeit das OR annimmt.

Da für die Durchführung dieser multivariaten Analyse die Vollständigkeit der Daten notwendig war, jedoch z.T. einzelne Expressionsdaten auf Grund fehlerhafter PCR fehlten, wurden fehlende Werte zuvor durch die „10-fache Nearest Neighbor Methode“ ergänzt.

Für das Ansprechen auf die Chemotherapie konnten DKK1 und EGR1 als potenziell relevante Genkombination herausgefiltert werden ($p=0,09$ und $p=0,04$), wohingegen nur MYCN zur Vorhersage einer schlechten Prognose potenziell relevant schien ($p=0,07$). Weiterhin stellten sich CA9 und TOP2A als signifikante Genkombination für primäre Metastasen heraus ($p=0,03$ und $p=0,01$), obwohl bezogen auf diesen Parameter nach dem Abgleich der p-Werte in der univariaten Analyse keine signifikanten Ergebnisse mehr vorlagen (vgl. Tab. 11 und 12). Die erstaunlichste Beobachtung lieferte jedoch die Histologie. Hier konnten nicht nur keine Signifikanzen bei irgendeinem klinischen Parameter festgestellt werden, viel mehr zeigte sich, dass die Histologie zur falschen Vorhersage klinischer Verläufe in vielen unserer untersuchten Fälle geführt hätte bzw. hat. Für die Beurteilung des Rezidivrisikos stellten sich HEY2 ($p=0,01$) und TERT ($p=0,05$) als signifikante Markerkombination heraus (vgl. Tab. 13). Hier war, wie bereits für die Mortalität beobachtet, die Histologie ebenso kein guter Faktor für die Einschätzung des Risikos.

Parameter*	Potenziell relevante Variable	p-Wert	Odds Ratio (OR)*	95 % Konfidenz-Intervall des OR
Ansprechen auf Chemotherapie	DKK1	0,09	1,98	0,90 – 4,37
	EGR1	0,04	0,45	0,21 – 0,96
Primäre Metastasen	CA9	0,03	0,49	0,26 – 0,92
	TOP2A	0,01	2,28	1,20 – 4,31
Rezidiv	HEY2	0,01	2,89	1,30 – 6,45
	TERT	0,05	0,19	0,04 – 1,00
Tod	MYCN	0,07	0,38	0,13 – 1,09

Tab. 13: Ergebnisse der multivariaten Analyse bei einem Selektionsniveau von 10 %.

*Gruppeneinteilung entsprechend Tabellen 10 und 11.

Gezeigt sind die potenziell relevanten Marker(kombinationen) für die verschiedenen klinischen Parameter mit entsprechenden p-Werten. Die Odds Ratios inklusive ihrer 95 % Konfidenzintervalle geben den Einfluss der einzelnen Variablen an und dienen der Bewertung ihrer Relevanz. Werte des $OR = 1$ geben keinerlei, Werte > 1 einen positiven und Werte < 1 einen negativen Einfluss des untersuchten Gens auf die zweite Tumorgruppe an. Die 95 % Konfidenzintervalle des OR entsprechen den Wertebereichen, die das OR mit 95 %iger Wahrscheinlichkeit annimmt.

4.2.1.2 Validierung der Ergebnisse

Die Validierung der Ergebnisse erfolgte mit einem unabhängigen Tumorsatz bestehend aus 76 Tumoren. Hierfür wurden alle Gene herangezogen, die sich im ersten Datensatz entweder in der univariaten Analyse nach Bonferroni-Holm Abgleich oder in der multivariaten Analyse als signifikant oder potenziell relevant ($p \leq 0,2$) herausgestellt hatten: CA9, DKK1, EGR1, HEY2, MYCN, TERT, TOP2A, TRIM22, VEGF (s. Tab. 12 und 13). Die Durchführung der Messungen und Analysen erfolgte wie bereits für den ersten Tumorsatz beschrieben, jedoch konnten die Messergebnisse des Validierungssatzes nicht mit dem CTNNB1 Mutationsstatus korreliert werden, da dieser für die meisten hier verwendeten Tumoren unbekannt war.

4.2.1.2.1 Univariate Analyse inklusive Bonferroni-Holm Abgleich

Im Validierungssatz konnten zahlreiche der zuvor in der univariaten Analyse gewonnenen Assoziationen bestätigt werden, zudem entsprachen die beobachteten Expressionsänderungen weitgehend denen des ersten Tumorsatzes. HEY2 war in hoch malignen Tumoren um den Faktor 22 ($p=0,01$) schwächer exprimiert verglichen mit niedrig/intermediär malignen Tumoren, während Tumoren von verstorbenen Patienten eine signifikant schwächere Expression (8,7-fach) von TRIM22 ($p=0,03$) zeigten. Des Weiteren waren Alterationen in der Expression von TRIM22 und VEGF schwach signifikant mit hoch malignen Tumoren assoziiert (jeweils $p=0,06$), ebenso wie TERT und TRIM22 mit rezidivierenden Tumoren (jeweils $p=0,07$). Neben der statistisch (schwach) signifikanten Korrelation von TERT, TRIM22 und VEGF mit den entsprechenden Parametern ließ sich oft eine starke Deregulation der Genexpression feststellen. Vor allem TERT zeigte in rezidivierenden Tumoren einen Anstieg der Expression um das 100-fache. Aber auch TRIM22 war mit einer 5,4- bzw. 3,6-fachen Repression in hoch malignen und rezidivierenden Tumoren relativ stark dereguliert (vgl. Tab. 14).

Parameter*	Variable	p-Wert [#]	Abgeglicherer p-Wert [#]	Expressionsänderung [#]
Histologie (70 vs. 6)	HEY2	<0,001	<0,01	-22,2x
	TERT	0,14	0,14	34,9x
	TRIM22	0,02	0,06	-5,4x
	VEGF	0,03	0,06	-2,6x
Ansprechen auf Chemotherapie (22 vs. 36)	DKK1	0,29	0,29	-1,4x
	EGR1	0,10	0,20	2,7x
Primäre Metastasen (58 vs. 17)	CA9	0,41	0,41	-1,2x
	TOP2A	0,06	0,12	-6,0x
Rezidiv (60 vs. 13)	HEY2	0,23	0,23	-1,3x
	TERT	0,02	0,07	104,3x
	TRIM22	0,04	0,07	-3,6x
Tod (72 vs. 3)	MYCN	0,35	0,35	14,7x
	TRIM22	0,02	0,03	-8,7x

Tab. 14: Validierung der durch die erste Analyse ausgewählten Variablen, univariate Analyse mit Bonferroni-Holm Abgleich.

*Gruppeneinteilung entsprechend Tabellen 10 und 11. In Klammern angegeben ist die Anzahl der Tumoren in den entsprechenden Subgruppen.

[#]Expressionsänderung der Gene und entsprechende p-Werte zwischen versch. Tumorgruppen, ermittelt mit Wilcoxon Rangsummentests mit anschließendem Bonferroni-Holm Abgleich.

Fett markierte Zahlen geben signifikante Ergebnisse ($p \leq 0,05$) an.

4.2.1.2.2 Multivariate Analyse

Die zuvor erhaltenen Ergebnisse der multivariaten Analyse wurden ebenso validiert. Hier zeigte sich die Repression von TOP2A in metastasierenden Tumoren als schwach signifikant ($p=0,10$), während die verminderte Expression von TRIM22 schwach signifikant mit einer schlechten Prognose assoziiert war ($p=0,07$).

Parameter*	Berücksichtigte Variablen	Signifikante Variablen	p-Wert	Odds Ratio (OR)*	95 % Konfidenzintervall der OR
Ansprechen auf Chemotherapie	DKK1 EGR1	-			
Primäre Metastasen	CA9 TOP2A	TOP2A	0,10	2,20	0,87 – 5,57
Rezidiv	HEY2 TERT TRIM22	TERT	0,10	0,36	0,11– 1,20
Tod	MYCN TRIM22	TRIM22	0,07	2,85	0,91 – 8,89

Tab. 15: Validierung ausgewählter Variablen durch die multivariate Analyse bei einem Selektionsniveau von 10 %.

* Gruppeneinteilung und Anzahl der Tumoren entsprechend Tabelle 14.

Gezeigt sind die durch die Validierung signifikant getesteten Marker für die verschiedenen klinischen Parameter und ihre entsprechenden p-Werte. Der Einfluss und die Relevanz der Variablen wird durch die Odds Ratios und die zugehörigen 95 % Konfidenzintervalle ersichtlich (s. Tab. 13).

4.3 Untersuchungen an Wilms Tumorzellen

Von den Realtime RT-PCR Ergebnissen ausgehend stellte sich die Frage, inwieweit sich die Überexpression bzw. Repression der hierbei signifikant deregulierten Gene in Primärkulturen von Wilms Tumoren auswirkt. Aus diesem Grund wurden einerseits cDNA-Überexpressions- (EGR1, HEY2, MYCN und TRIM22) sowie shRNA-knockdown- (CD44_v5, HEY2, MYCN und TRIM22) Konstrukte kloniert, die anschließend mittels lentiviraler Transduktion in Wilms Primärkulturen transduziert wurden.

4.3.1 cDNA-Überexpressionskonstrukte

4.3.1.1 Klonierung

Für die cDNA-Überexpressionskonstrukte wurde jeweils die komplette kodierende Sequenz des gewünschten Gens aus Tumor cDNA amplifiziert und direkt hinter einen Flag-Tag in den Vektor p201FlagiEP kloniert, wodurch der Nachweis der Genexpression mittels eines Westernblots möglich war. Die zusätzliche IRES- („internal ribosomal entry site“) mit folgender EGFP- („enhanced green fluorescence protein“) und Puromycin-Sequenz erlaubte die sofortige Kontrolle der Expression im Fluoreszenzmikroskop und die Selektion der transduzierten Zellen.

Da die komplette kodierende Sequenz vom Maus-Homolog von HEY2 bereits kloniert worden war und HEY2 zwischen Mensch und Maus hoch konserviert ist, wurde mHEY2 inklusive des N-terminalen HA-Tags in den Vektor p201iEP umkloniert, der bis auf den Flag-Tag dem oben beschriebenen p201FlagiEP entspricht.

4.3.1.2 Testen der Expression in 293TD- und HeLa-Zellen

Da Wilms Primärkulturen keine immortalisierten Zelllinien sind und somit nur eine begrenzte Lebensdauer besitzen, wurde die korrekte Expression der cDNA-Überexpressionskonstrukte zuerst in 293TD- und HeLa-Zellen überprüft. Hierfür wurden diese mit Virusüberstand von 293TD-Zellen infiziert und am folgenden Tag durch Zugabe von Puromycin selektioniert. Nach ca. zwei Tagen war die Expression des Konstrukts mittels EGFP im Fluoreszenzmikroskop sichtbar. Zum Nachweis der Expression mittels Westernblot wurden Zellen einer konfluenten 9,6 cm²-Schale in SDS-Probenpuffer aufgenommen und auf einem Westernblot analysiert. Die Expression der Proteine wurde mittels Anti-HA (HEY2) bzw. Anti-Flag Antikörper nachgewiesen.

Es zeigte sich, dass alle Gene sowohl in 293TD- wie auch in HeLa-Zellen (MYCN und TRIM22) korrekt exprimiert wurden (s. Abb. 8). Hierbei besaß das Flag-getaggte MYCN ein Molekulargewicht von 67 kDa, Flag-TRIM22 von 57 kDa, Flag-EGR1 von 75 kDa und HA-HEY2 von 40 kDa.

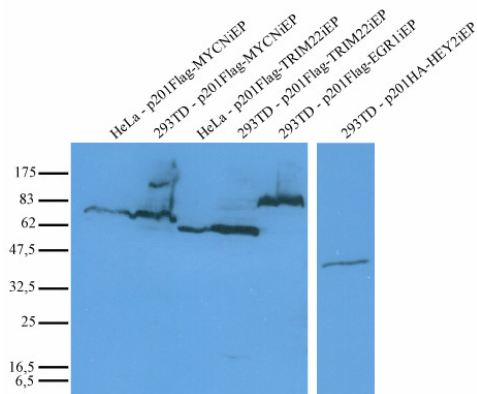


Abb. 8: Westernblot der cDNA-Überexpressionskonstrukte in HeLa- und/oder 293TD-Zellen.

Alle transduzierten Gene wurden korrekt in den Zellen exprimiert, Banden zeigten sich für Flag-MYCN, Flag-TRIM22, Flag-EGR1 und HA-HEY2 bei 67, 57, 75 und 40 kDa.

4.3.2 Klonierung der shRNA-Konstrukte

Gegen jedes Gen wurde ein 97mer Hairpin Oligonukleotid entworfen und in den Vektor p201PmeIGiP kloniert. Für CD44 wurde eine shRNA ausgewählt, die spezifisch gegen das 5. variable Exon gerichtet war, da nur jene Isoformen, die dieses Exon enthielten, einen Effekt zu haben schienen [Ghanem, 2002 #51]. Die shRNA ist im Vektor p201PmeIGiP in einem miRNA Transkript der natürlich vorkommenden miR30 eingebettet, wodurch die kodierende Region der miR30 durch die shRNA Sequenz ersetzt wird. Die Integration der shRNA in die miR30 ermöglicht eine sehr effiziente Expression der shRNA [Stegmeier, 2005 #48]. Die nachfolgenden GFP-, IRES- und Puromycin-Sequenzen gestatten die Überprüfung der erfolgreichen Transduktion mittels Fluoreszenz, sowie die Selektion der Zellen.

4.3.3 Primärkulturen von Wilms Tumoren

Zur Durchführung der folgenden Experimente wurden Primärkulturen aus nativem Wilms Tumormaterial kultiviert, da keine etablierten Wilms Tumor Zelllinien zu erhalten sind. Da bei der Kultivierung aus Tumormaterial eventuell Reste von gesundem Nierenmaterial ebenso zu einem Hochwachsen von z.B. Fibroblasten führen können, musste sichergestellt werden, dass es sich bei den verwendeten Primärkulturen tatsächlich um Tumorzellen handelte. Aus diesem Grund wurde die DNA aus den Tumoren auf genetische Veränderungen untersucht und nur diejenigen Primärkulturen verwendet, bei denen die gleichen Alterationen nachgewiesen werden konnten. Hierbei wurden sowohl Mutationsanalysen von CTNNB1 und WT1, sowie LOH-Analysen häufig deletierter Regionen (7p, 9q, 11p15, 11p13, 11q, 14q, 16q) und WTx durchgeführt. Für die folgenden Untersuchungen wurden die Wilms Primärkulturen WS539, WS576 und WS591 ausgewählt, welche allesamt ein schnelles Zellwachstum aufwiesen. Zusätzlich wurde eine Primärkultur verwendet, MZ128, welche bereits in einer früheren Studie zum Einsatz kam [Zirn, 2005 #47] (s. Abb. 9).

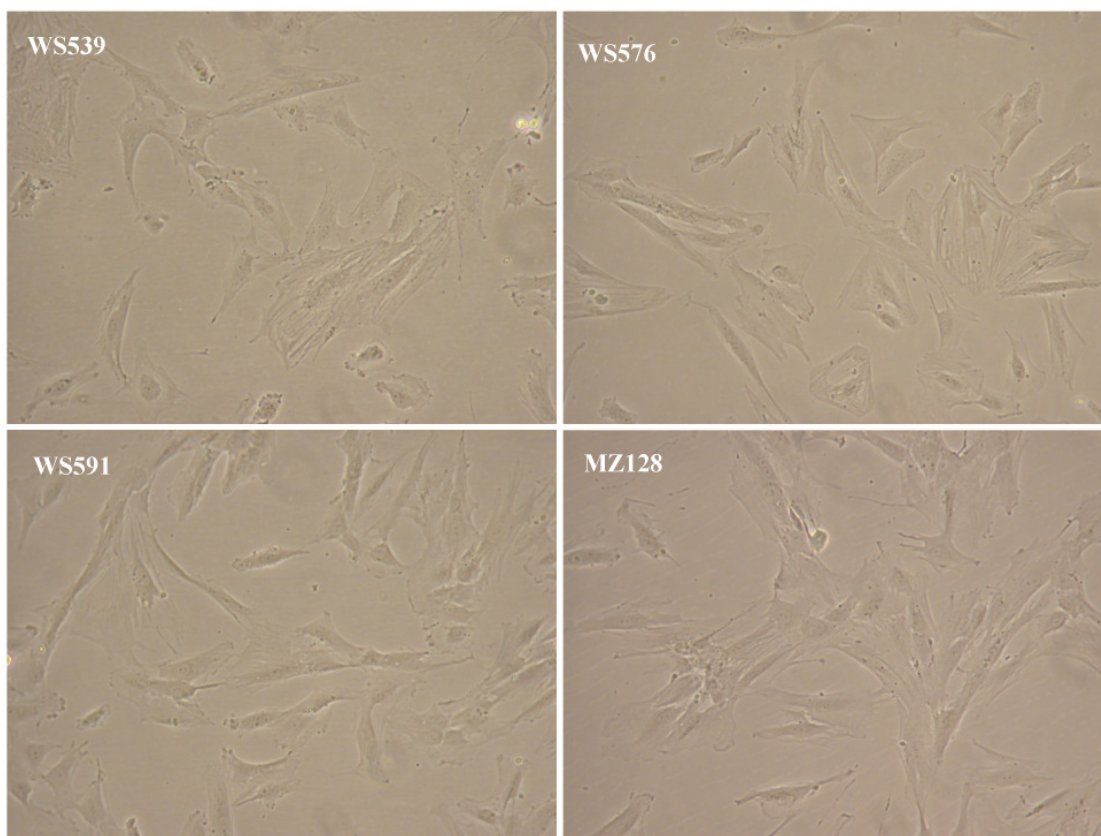


Abb. 9: Morphologie der Wilms Primärkulturen WS539, WS576, WS591 und MZ128.
Alle vier Kulturen wiesen die gleiche Morphologie auf: relativ große, ausgebreitete Zellen.

Die Histologie und die genetischen Alterationen der Tumoren, aus denen die Primärkulturen gewonnen wurden, sind in Tab. 16 zusammengefasst.

Tumor	Histologie	Mutationen	LOH / sonstige Alterationen
WS539	Stromareich	---	LOH 7p, 11p15, 11p13, WTx (3' Region)
WS576	Mischtyp	CTNNB1	---
WS591	Stromareich	---	Deletion WTx
MZ128	Stromareich	WT1	7/12 Translokation

Tab. 16: Übersicht über die Histologie und chromosomalen Veränderungen der verwendeten Wilms Primärkulturen.

4.3.4 Transduktion der Wilms Primärkulturen

Die Transduktion der Wilms Tumorzellen erfolgte mittels Virusüberstand von 293TD Zellen. Einen Tag nach der Transduktion wurde mit der Selektion der Zellen mit Hilfe von Puromycin begonnen, nach etwa 2 Wochen bestanden die Kulturen nur noch aus transduzierten Zellen. Das Picken von Einzelklonen war auf Grund der Morphologie der Zellen nicht möglich, weshalb die Mischkulturen für die weiteren Experimente eingesetzt wurden.

Bereits wenige Tage nach erfolgter Transduktion war die Expression der Gene auf Grund der Koexpression von GFP/EGFP mittels grüner Fluoreszenz sichtbar. Alle der verwendeten Wilms Tumorzellen zeigten diese Fluoreszenz, konnten also erfolgreich transduziert werden.

Jedoch lieferte die Fluoreszenz nur einen Hinweis darauf, dass die erwünschten Gene bzw. die shRNAs exprimiert wurden, da GFP und EGFP von einem alternativen Start aus translatiert werden. Der endgültige Nachweis der Expression bzw. der Repression der Gene geschah deshalb mittels Westernblot und Realtime RT-PCR (s. 4.3.6).

4.3.5 Morphologische Veränderungen

Bereits kurze Zeit nach der Transduktion ließen sich erste Veränderungen der Zellen feststellen. Die wohl gravierendste Beobachtung war die morphologische Änderung der überexprimierenden Zellen. Die Überexpression von EGR1 bewirkte eine starke Alteration des Aussehens, Zellen wurden extrem lang und spindelförmig. Mit TRIM22 transduzierte Zellen hingegen waren im Vergleich zu den unbehandelten Zellen deutlich vergrößert. Bei MYCN war bereits 2 Tage nach der Transduktion eine Verkleinerung gepaart mit einem stark veränderten Aussehen der Zellen zu beobachten (s. Abb. 10).

Gleichzeitig zu den morphologischen Veränderungen war ein vermehrtes Sterben aller überexprimierenden Zellen zu beobachten, die sich am stärksten nach Transduktion von HEY2 äußerte. Hier waren bereits kurze Zeit nach der Transduktion kaum noch lebende Zellen vorhanden.

Im Gegensatz hierzu zeigten mit den shRNAs transduzierte Zellen keine primär sichtbaren Veränderungen oder Alterationen in ihrem Wachstumsverhalten.

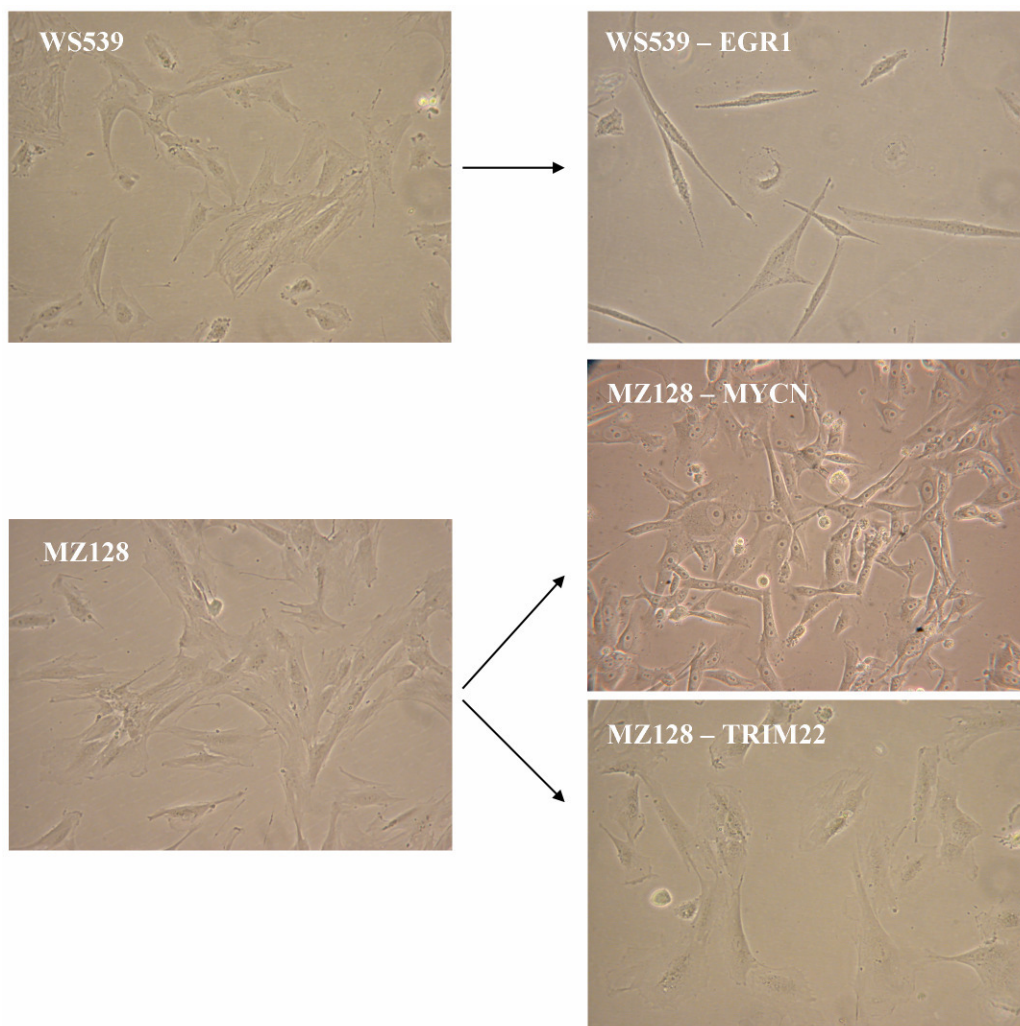


Abb. 10: Starke morphologische Änderungen der mit den cDNA-Überexpressionskonstrukten transduzierten Wilms Primärkulturen.

Gezeigt ist jeweils nur ein Beispiel für die Änderung des Aussehens der Zellen, alle anderen Zellen reagierten ähnlich auf die Transduktion.

4.3.6 Nachweis der korrekten Expression

4.3.6.1 cDNA-Überexpressionskonstrukte

Nachdem die Überexpression der Gene auf Grund der Grün-Fluoreszenz der transduzierten Zellen angenommen werden konnte, sollte der endgültige Nachweis hierfür mittels Westernblot erfolgen, da alle Gene mit einem HA- bzw. Flag-Tag versehen waren. Jeweils eine konfluente 9,6 cm²-Schale der transduzierten und selektierten Zellen wurde hierfür in SDS-Puffer aufgenommen und für eine SDS-PAGE mit anschließendem Westernblot eingesetzt. Auf Grund der extrem hohen Sterberate nach Überexpression von HEY2 konnten weder ausreichend Zellen für den Nachweis der Expression mittels Westernblot, noch für weitere Experimente gewonnen werden, weshalb HEY2 aus den weiteren Versuchen ausgeschlossen werden musste. Ausschließlich die Expression von GFP und die

daraus resultierende Fluoreszenz wiesen auf die Expression von HEY2 hin. Aber auch für EGR1, MYCN und TRIM22 war der Nachweis der Proteinexpression mittels Westernblot auf Grund zu geringer Proteinmengen nur in wenigen Fällen möglich (Abb. 11).

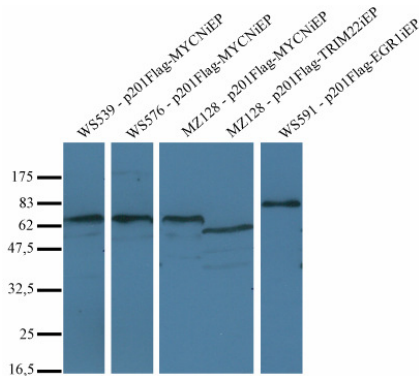


Abb. 11: Westernblot der transduzierten Primärkulturen.

Gezeigt ist die korrekte Expression von Flag-MYCN in WS539, WS576 und MZ128 Zellen, von Flag-TRIM22 in MZ128 Zellen und von Flag-EGR1 in WS591 Zellen. Auf Grund zu geringer Proteinmengen war der Nachweis der Expression mittels Westernblot nicht in allen Fällen möglich.

Der Nachweis der Genexpression von EGR1, MYCN und TRIM22 wurde schließlich mit einer parallel durchgeführten mRNA-Analyse erbracht. Hierfür wurden 1 bzw. 2 x 9,6 cm²-Schale(n) in peqGOLD TriFast aufgenommen und die RNA laut Protokoll isoliert. Jeweils 1 µg RNA wurde in cDNA umgeschrieben und mit Hilfe der Realtime RT-PCR analysiert. Zum Vergleich der Expression dienten mit dem leeren p201FlagiEP-Vektor transduzierte Zellen der jeweiligen Primärkulturen. Für EGR1 und MYCN konnte in allen Zellen eine starke Zunahme der Expression festgestellt werden, jedoch waren zwischen den verschiedenen Primärkulturen große Unterschiede zu beobachten. Der stärkste Anstieg in der Expression konnte bei den MZ128 Zellen festgestellt werden. Ebenso war TRIM22 überexprimiert, jedoch vergleichsweise um einiges geringer als die beiden zuvor genannten Gene. Auch hier zeigten sich Unterschiede zwischen den verschiedenen Wilms Tumorzellen, wobei die höchste Expressionszunahme bei den WS591 Zellen vorlag (s. Tab. 17).

Zellen	Flag-EGR1	Flag-MYCN	Flag-TRIM22
WS539	++	+++	+
WS576	++	++++	+
WS591	++	+++	+
MZ128	+++	+++++	+

Tab. 17: Überexpression der Gene in Wilms Primärkulturen.

Das Ausmaß der Überexpression in den entsprechenden Primärkulturen nach Abgleich auf die Expression in mit dem leeren Vektor p201FlagiEP transduzierten Zellen wird durch die Anzahl der (+) - Zeichen indiziert. EGR1 und MYCN wurden extrem hoch exprimiert und TRIM22 ebenso um einiges stärker als in den Vergleichszellen. Grau unterlegt sind jeweils die Zellen, bei denen nach der Transduktion des jeweiligen Konstrukts der stärkste Anstieg in der Expression beobachtet wurde.

4.3.6.2 shRNA-Konstrukte

Der Nachweis der korrekten Expression der shRNAs und somit der Repression der entsprechenden Gene erfolgte ebenfalls mittels Realtime RT-PCR. Hierfür wurde aus den transduzierten Zellen RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Als Vergleich dienten mit dem Vektor p201PmeIGiP transduzierte Zellen. Für HEY2 und MYCN zeigten sich abhängig von der Primärkultur entweder keinerlei Expressionsunterschiede zwischen den Zellen oder sogar eine höhere Expression der Gene in den transduzierten Zellen. Im Gegensatz hierzu wurde bei CD44_v5 und TRIM22 bei den meisten Primärkulturen eine Repression beobachtet, allerdings lag die Restexpression der Gene mit Werten zwischen 23 und 84 % deutlich zu hoch. Somit war mit keiner der shRNAs eine zufrieden stellende Repression des entsprechenden Gens zu erreichen, weswegen diese von den anschließenden Experimenten ausgeschlossen wurden.

4.3.7 Analyse der transduzierten Zellen

4.3.7.1 Wachstumskurven

Zusätzlich zu den morphologischen Änderungen ließ sich rasch ein erheblich eingeschränktes Wachstum bzw. das Sterben der Zellen beobachten, weshalb Wachstumskurven durchgeführt wurden, um Aufschluss über den tatsächlichen Zustand zu bekommen. Nach der Transduktion wurden die Zellen zuerst zwei Wochen lang mit Puromycin selektioniert, um auszuschließen, dass sich noch wildtypische Zellen in der Kultur befanden. Anschließend wurden jeweils 4×10^4 Zellen der Kontrollzellen sowie der transduzierten Zellen auf einer Schale von $9,4 \text{ cm}^2$ ausgesät und die Zellzahl in bestimmten Zeitabständen bestimmt. Bei allen gewählten Zellen wuchsen die Kontrollzellen am schnellsten und waren jeweils nach 8 Tagen konfluent, weswegen zu diesem Zeitpunkt alle Zellen mittels Trypsin-Behandlung abgelöst und ausgezählt wurden. Anschließend wurden wiederum jeweils 4×10^4 Zellen ausgesät und die Zellzahl nach weiteren 8 Tagen ermittelt. Die endgültige Zellzahl nach 16 Tagen ergab sich kumulativ aus den Einzeldaten. Aus jeweils drei (Kontrollzellen) bzw. zwei (transduzierte Zellen) parallelen Ansätzen wurden jeweils Mittelwert und Standardabweichung berechnet.

Wie die Abb. 12 zeigt, konnte bei allen Primärkulturen eine Zunahme der Anzahl der Kontrollzellen, hingegen ein vermindertes Wachstum bzw. Sterben der transduzierten Zellen festgestellt werden. Vor allem zu Beginn der Wachstumskurven starben relativ viele der transduzierten Zellen ab, im weiteren Verlauf zeigte sich eher eine konstant bleibende Anzahl von Zellen. Da auf Grund der Trypsin-Behandlung mit anschließendem Auszählen während der Wachstumskurven jeweils ein kleiner Anteil an Zellen verloren geht, kann davon ausgegangen werden, dass die Zellzahl nach Transduktion kontinuierlich, wenn auch nur sehr langsam, zunahm. Dies zeigte sich auch dadurch, dass nach einiger Zeit viele

der transduzierten Zellen konfluent wuchsen und für weitere Versuche einsetzbar waren (s. unten).

Die höchsten Sterberaten waren bei den mit MYCN transduzierten Zellen zu beobachten, was jedoch vermehrt am Vorgang des Ablösens und der Neu-Aussaat der Zellen während der Wachstumskurven lag. Zellen, mit Ausnahme von WS591, die parallel ohne Behandlung wachsen konnten, wuchsen zwar nur sehr langsam, aber waren nach einiger Zeit konfluent.

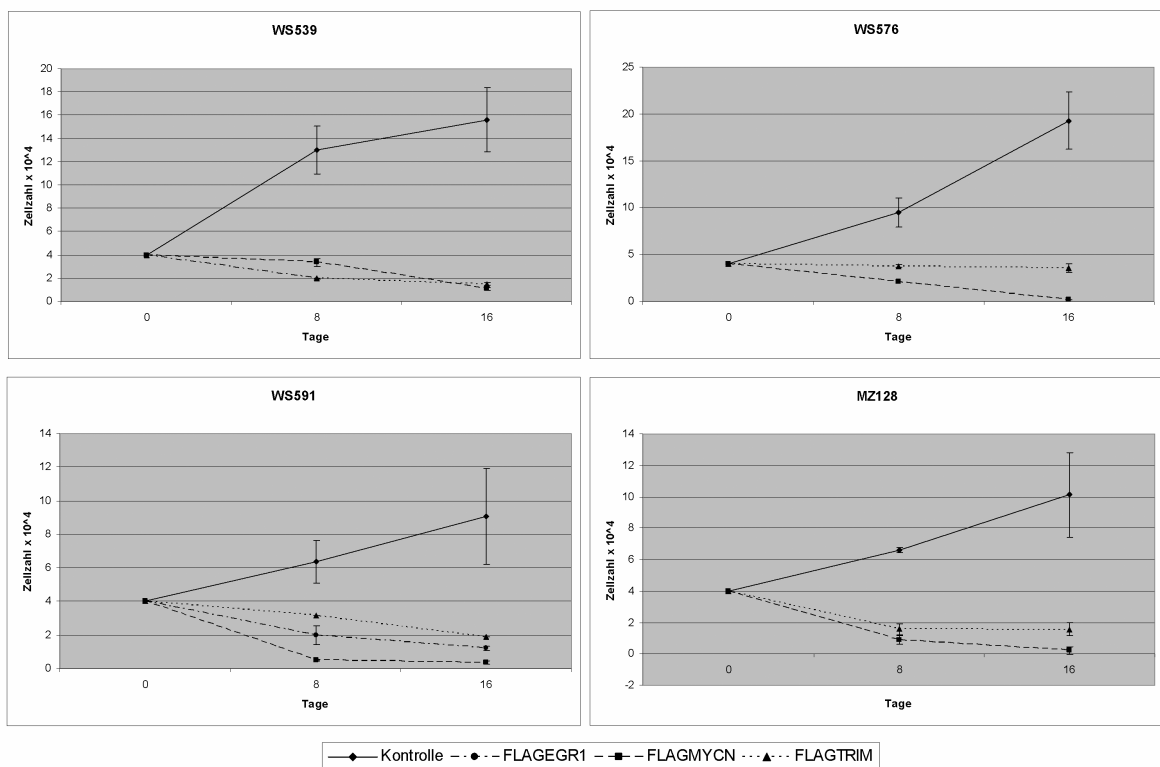


Abb. 12: Wachstumskurven der Primärkulturen nach Transduktion.

Gezeigt sind die Zellen aller Primärkulturen nach Transduktion von MYCN und TRIM22 im Vergleich zu den nicht-transduzierten Kontrollzellen. Bei WS591 wurde zusätzlich eine Wachstumskurve für EGR1 erstellt. Während die Anzahl aller Kontrollzellen im Laufe der Zeit zunahm, starben die Zellen nach der Transduktion ab bzw. zeigten ein sehr eingeschränktes Wachstum. Am stärksten war der Effekt nach der Überexpression von MYCN.

4.3.7.2 FACS-Analysen

Die Verteilung der Zellen im Zellzyklus nach der Transduktion sollte mit Hilfe von FACS-Analysen bestimmt werden. Hierzu wurden die Zellen mit Propidiumiodid (PI) angefärbt, einem Fluoreszenzfarbstoff, der in die DNA interkaliert und mittels Laser angeregt werden kann. Die gemessene Fluoreszenz einer Zelle ist somit proportional zu ihrem DNA-Gehalt, was die Unterscheidung zwischen Zellen in der G1- (einfacher Chromosomensatz) und G2/M-Phase (doppelter Chromosomensatz) ermöglicht. Zellen mit einer Fluoreszenz, die einem DNA-Gehalt zwischen einem einfachen und einem doppelten Chromosomensatz entspricht, befinden sich in der S-Phase. Des Weiteren ermöglicht die PI-Messung die Unterscheidung zwischen lebenden und apoptotischen bzw. sterbenden Zellen, da apoptotische/sterbende Zellen, sog. SubG1-Zellen, auf Grunde der Fragmentierung ihrer DNA und ihres Zellkerns meist einen geringeren DNA-Gehalt aufweisen als lebende Zellen.

Zellen von 3 x 9,6 cm² Schalen wurden als eine Probe für die FACS-Analyse vorbereitet und pro Konstrukt, soweit dies das Zellwachstum zuließ, jeweils 3 Proben gemessen.

Die Transduktion von p201Flag-MYCNiEP führte bei allen untersuchten Primärkulturen zu einer Akkumulation der Zellen in der SubG1-Phase und zu einer Reduktion in der G1-Phase, was für WS539 auf Grund der Schwankungen zwischen den drei Proben der Kontrollzellen und der daraus resultierenden Fehlerbalken jedoch nicht so deutlich erschien wie für WS576 und MZ128 (s. Abb. 13). Ebenso zeigte die Transduktion von p201Flag-TRIM22iEP eine Anreicherung der Zellen in der SubG1-, S- und G2M-Phase, während die Anzahl der Zellen in der G1-Phase stark abnahm. Jedoch konnte dies nur für die MZ128 Zellen gezeigt werden, WS591 Zellen behielten im Vergleich zu den Kontrollzellen ihre Verteilung im Zellzyklus bei (s. Abb. 14). Eine FACS-Analyse der WS591 Zellen für MYCN, der WS539 und WS576 Zellen für TRIM22 sowie aller Primärkulturen für EGR1 war auf Grund der hohen Sterberaten der Zellen nicht möglich.

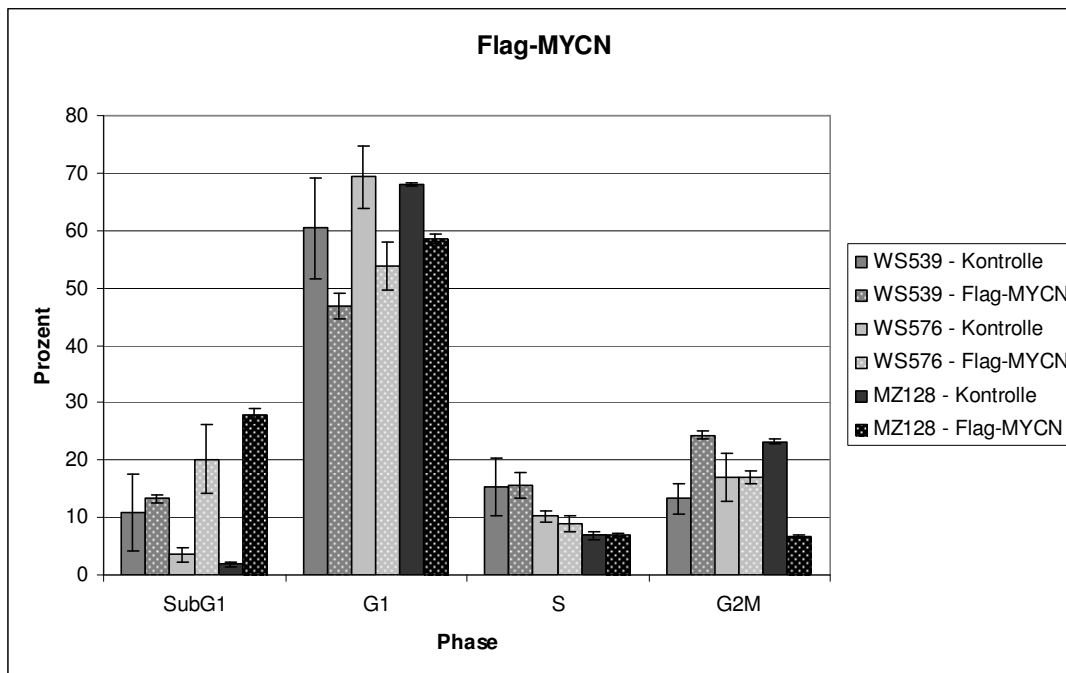


Abb. 13: FACS-Analyse der Wilms Primärkulturen, transduziert mit p201Flag-MYCNiEP.

Messungen konnten auf Grund von hoher Sterberaten der WS591 Zellen bei MYCN Überexpression nur von WS539, WS576 und MZ128 durchgeführt werden. Es war eine z.T. deutliche Zunahme der Zellen in der Sub-G1-Phase festzustellen, was vermutlich auf Apoptose zurückzuführen ist. Gleichzeitig war ein Rückgang der Zellen in der G1-Phase zu beobachten. Auch für WS539 Zellen war dies zu beobachten, jedoch waren die Schwankungen der Kontrollzellen zu groß, um eindeutige Aussagen treffen zu können.

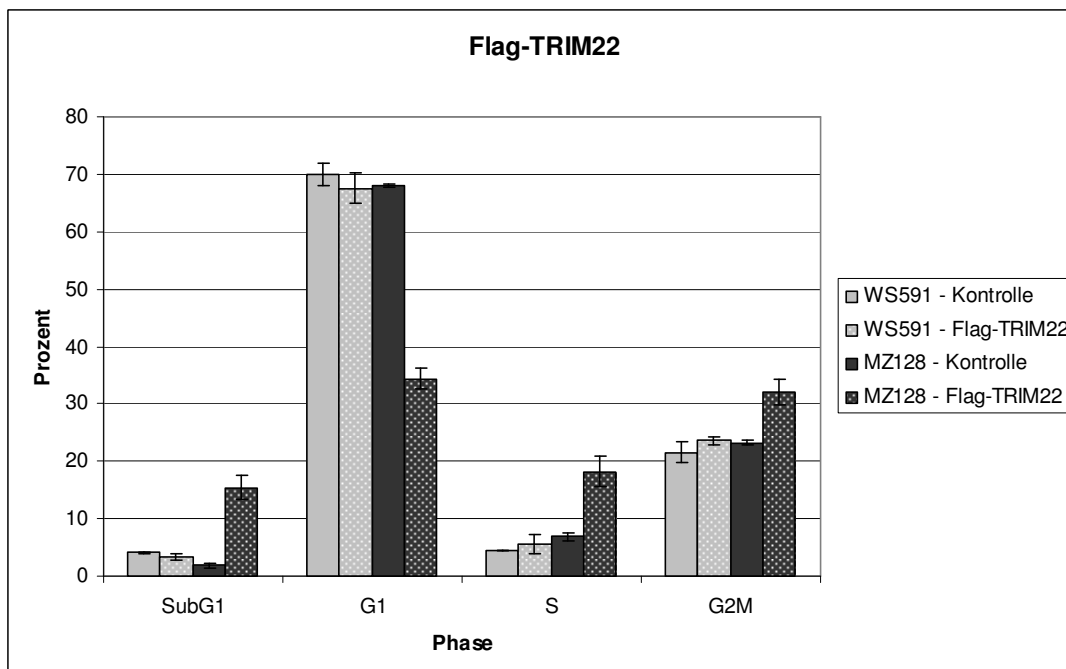


Abb. 14: FACS-Analyse der Wilms Primärkulturen, transduziert mit p201Flag-TRIM22iEP.

Bei den MZ128 Zellen ließ sich ein deutlicher Anstieg der Zellen in der Sub-G1-, S- und G2M-Phase mit einem gleichzeitigen Rückgang der Zellen in der G1-Phase feststellen. WS591 Zellen zeigten diesen Effekt nach Transduktion nicht. Hier war die Verteilung der Zellen im Zellzyklus im Vergleich zu den Kontrollzellen unverändert. Die Messung der WS539 und WS576 Zellen war auf Grund zu hoher Sterberaten nach TRIM22 Transduktion nicht durchführbar.

4.3.7.3 Apoptoseassay

FACS-Analysen können zwar einen erhöhten Anteil von toten bzw. sterbenden Zellen nachweisen, jedoch lassen sich mit ihrer Hilfe keinerlei Aussagen über den Grund für deren Tod treffen. Nichtsdestotrotz liegt die Vermutung nahe, dass sich Zellen in der Sub-G1-Phase auf Grund vermehrter Apoptose akkumulieren. Apoptotische Zellen zeichnen sich durch Schrumpfen der Zelle, Vesikelbildung, sowie Kondensation und Fragmentierung der DNA aus [Wyllie, 1980 #69]. Diese Fragmentierung führt zum partiellen Verlust von DNA in den Zellen, weshalb diese bei der FACS-Analyse in der Sub-G1 Phase lokalisiert sind, der Phase, die einen geringeren als den einfachen Chromosomensatz aufweist.

Um zu klären, ob die Apoptose für die Akkumulation der MYCN- und TRIM22-transduzierten Zellen in der Sub-G1-Phase verantwortlich war, wurden Apoptoseassays durchgeführt. Da zur Durchführung dieser Assays, im Vergleich zu den FACS-Messungen, nur eine relativ kleine Anzahl von Zellen nötig war, konnten alle Primärzellen analysiert werden, inklusive der EGR1-transduzierten Zellen (WS539 und WS591). Jeweils 1×10^4 Zellen wurden pro well auf eine Weißwand-96-well-Platte ausgesät und nach zwei Tagen die Apoptoserate mittels des Caspase 3/7-Kits von Promega bestimmt. Caspasen stellen die wichtigsten Akteure während der Apoptose dar. Sie werden in zwei Gruppen unterteilt, Initiator- und Exekutor-Caspasen. Caspase-3 und -7 gehören zur Gruppe der Exekutor-Caspasen, die bereits inaktiv im Cytosol vorliegen und im Verlauf der Apoptose durch Initiator-Caspasen aktiviert werden [Boatright, 2003 #65]. In apoptotischen Zellen vorhandene Caspasen 3/7 spalten ein in der Lösung des Kits enthaltenes Substrat, wodurch ein Signal freigesetzt wird, das mittels Luminometer gemessen werden kann. Die Menge an aktiven Caspasen 3/7 stellt also ein Maß für die apoptotische Aktivität einer Zelle dar. Zur Bestätigung der Ergebnisse wurden jeweils Triplikate gemessen und hieraus die Mittelwerte und Standardabweichungen bestimmt.

Es zeigte sich in allen mit MYCN transduzierten Primärzellen eine starke Zunahme (4 – 7-fach) der Caspase 3/7 Aktivität. Ebenso verhielten sich mit TRIM22 transduzierte Zellen, jedoch lag die Aktivität noch um einiges höher als bei MYCN. Zudem ließ sich in den verschiedenen Zellen eine unterschiedlich starke Zunahme der Aktivität (8 - 21-fach) feststellen, die stärksten Änderungen waren bei WS591 Zellen zu beobachten. So war die Caspase 3/7 Aktivität in WS591 und MZ128 Zellen etwa doppelt so hoch wie in WS539 und WS576 Zellen. Im Gegensatz hierzu zeigten sich für die EGR1-überexprimierenden Zellen weniger starke Ausschläge (2 - 3-fach). Apoptose schien hier für das Sterben der Zellen eine untergeordnete Rolle zu spielen (vgl. Abb. 15).

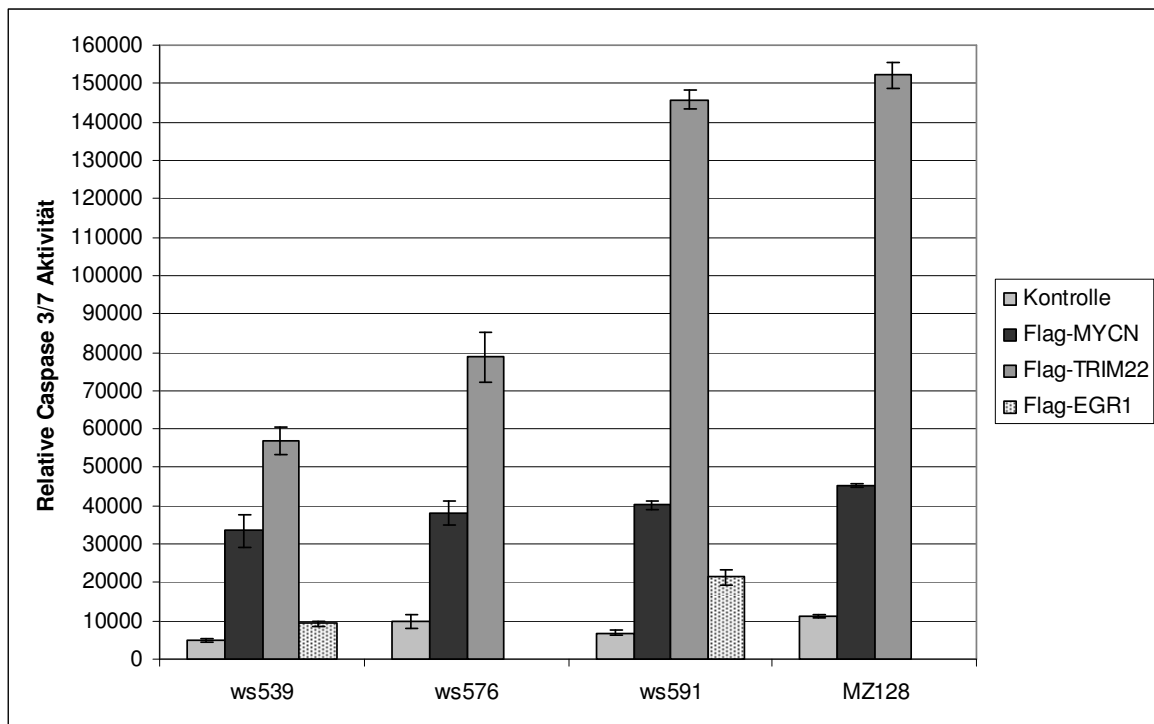


Abb. 15: Apoptoseassay der transduzierten Primärkulturen.

Gezeigt sind die Messungen der Caspase 3/7 Aktivität in Kontroll- und transduzierten Zellen der Wilms Primärkulturen, die ein Maß für die apoptotische Aktivität der Zellen darstellt. Hier eingeschlossen sind auch die EGR1-transduzierten WS539 und WS591 Zellen. Es konnte eine 4 – 7-fache Zunahme der Apoptoserate in Folge von MYCN-Überexpression festgestellt werden. Für TRIM22 ergaben sich noch stärkere Auswirkungen. In Folge der Überexpression nahm die Apoptoserate in den verschiedenen Zellen um das 8 - 21-fache zu, was verdeutlicht, dass TRIM22 in Zellen verschiedener Tumoren unterschiedlich starke Auswirkungen hat. Steigerungen der Apoptoserate um das 2 - 3-fache bei EGR1 Überexpression deuteten darauf hin, dass hier die Apoptose eher eine untergeordnete Rolle spielt.

4.3.7.4 Seneszenz-Färbungen

Eine weitere Auffälligkeit war, dass neben dem starken Sterben der transduzierten Zellen oft Restzellen auf der Platte verblieben, die jedoch auch nach längerer Zeit nicht mehr konfluent wuchsen. Somit stellte sich die Frage, ob sich verschiedene Mechanismen in den Zellen überschneiden und auch die Seneszenz beteiligt ist.

Normale menschliche Zellen können für eine beschränkte Zeit *in vitro* gehalten werden, hören jedoch ab einem gewissen Zeitpunkt auf zu proliferieren und treten in einen Zustand irreversiblen Wachstumsstopps ein, der Seneszenz [Stewart, 2002 #66]. Seneszente Zellen zeichnen sich durch eine große und flache Morphologie und einen hohen Anteil an Alterationen im Zellkern aus und können bei pH 6,0 positiv auf β -Galaktosidase angefärbt werden [Mathon, 2001 #67; Dimri, 1995 #68].

Zur Klärung, ob nach Transduktion Zellen ebenso in die Seneszenz eintraten, wurden Seneszenzfärbungen an WS576, WS591 und MZ128 Zellen einer 3,8 bzw. 9,6 cm²-Schale durchgeführt. Auf Grund der generell kürzeren Lebensdauer der WS539 Zellen im Vergleich zu den anderen Primärkulturen mussten diese von der Untersuchung ausgeschlossen werden, da zum Zeitpunkt der Seneszenzfärbungen kaum noch lebende Zellen vorhanden waren.

Nach der Fixierung der Zellen wurden diese mit Färbelösung überschichtet. Am folgenden Tag konnte die Auswertung der Seneszenzfärbung stattfinden.

Es zeigte sich ein erhöhter Anteil an Seneszenz in Zellen mit MYCN Überexpression. Prozentuale Anteile seneszenten Zellen stiegen hier unabhängig von den Primärkulturen um das ca. 10-fache an. Dagegen ergaben sich für TRIM22 transduzierte Zellen eher geringere Auswirkungen. Für EGR1 überexprimierende Zellen schien neben der Apoptose auch die Seneszenz keine Rolle zu spielen.

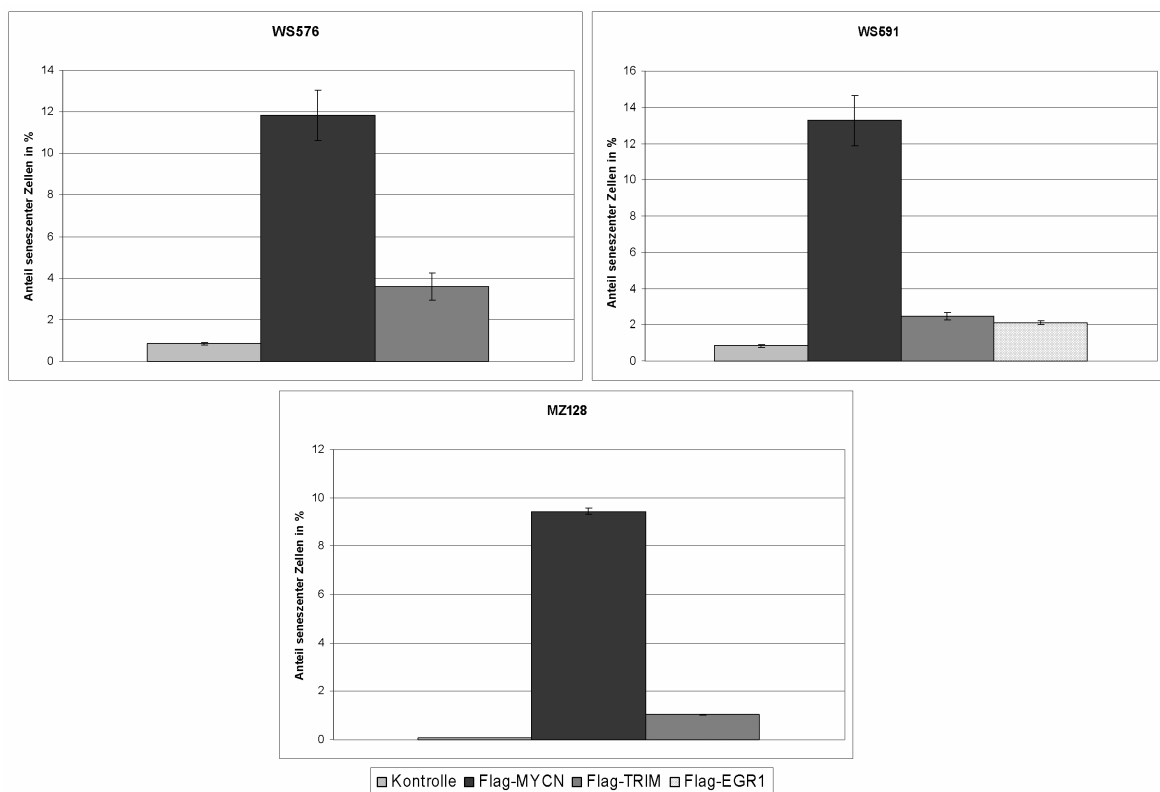


Abb. 16: Seneszenzfärbungen der Primärkulturen WS576, WS591 und MZ128.

Für die Primärkulturen WS576, WS591 und MZ128 wurden die Anteile an seneszenten Zellen bei MYCN und TRIM22 Überexpression bestimmt, für WS591 zusätzlich bei EGR1 Überexpression. MYCN überexprimierende Zellen zeigten eine deutliche Zunahme an Seneszenz. Im Gegenteil zu den Kontrollzellen, deren Anteil an seneszenten Zellen weniger als 1 % betrug, waren hier ca. 10 - 15 % der Zellen in einen Wachstumsarrest eingetreten. TRIM22 und EGR1 Überexpression hingegen führte nicht oder nur in einem kleinen Prozentsatz der Zellen zu einem Wachstumsarrest.

5. Diskussion

Seit ihrer Beschreibung durch Max Wilms vor mehr als 100 Jahren konnte durch klinische Studien die Therapie für Wilms Tumoren dramatisch verbessert werden, sodass die Überlebensraten derzeit bei über 90 % liegen. Trotz dieser positiven Entwicklung auf klinischer Ebene sind die molekularen Ursachen für die Entstehung dieser Tumoren bis heute noch immer nur unzureichend erforscht. Auf der Suche nach einem verantwortlichen Tumorsuppressorgen als Auslöser der Tumorentwicklung stellte sich heraus, dass die genetischen Alterationen der Tumoren sehr komplex sind und ihre Entstehung nicht, wie zuerst angenommen, auf ein einziges Gen zurückgeführt werden kann. So konnten bisher drei Gene mit WT in Verbindung gebracht werden: WT1, CTNNB1 und WTx. Mutationen in WT1 und CTNNB1 treten in ca. 10 - 15 % der Tumoren auf, häufig kombiniert, WTx Mutationen sind mit 30 % etwas häufiger. Die genetischen Alterationen der anderen Tumoren sind bis heute unbekannt. Zahlreiche Untersuchungen, wie z.B. LOH-, immunhistochemische und Microarray-Analysen, trugen zwar zur Identifikation potenziell wichtiger Gene bei, jedoch konnte kein weiteres Gen identifiziert werden, welches einen entscheidenden Beitrag liefert und einen Großteil der Tumoren betrifft.

5.1 LOH-Analysen in Wilms Tumoren

In den vergangenen Jahren wurden zahlreiche LOH-Analysen an Wilms Tumoren durchgeführt, die jedoch, nach der Entdeckung von WT1 auf 11p13 im Jahre 1990 (Call et al., 1990; Gessler et al., 1990), nie zur Identifikation eines weiteren Wilms Tumorsuppressorgens führten. Zwar zeigten die Regionen 11p15 und 16q immer wieder hohe Raten von Allelverlust und für 16q war die Eingrenzung auf eine minimale Region von 6,7 Megabasen möglich, jedoch konnten die in diesen Regionen stets postulierten Gene WT2 und WT3 nie bestimmt werden (Reeve et al., 1989; Maw et al., 1992; Safford et al., 2003). Für 11p15 wird mittlerweile angenommen, dass vielmehr der Verlust von Imprinting, der genomischen Prägung, statt einer Mutation, eine Rolle spielt, da in dieser Region zahlreiche Gene Imprinting aufweisen (Smith et al., 2007). Für IGF2, das in dieser Region lokalisiert ist, konnte der Verlust der genomischen Prägung (LOI) mit bestimmten Subtypen von Wilms Tumoren assoziiert werden (Ravenel et al., 2001).

Immer wieder diskutiert wurden auch die Regionen 1p, 7p, 11q, und 22q, die mit dem klinischen Fortschreiten der Tumoren und einer schlechten Prognose assoziiert zu sein schienen (Radice et al., 1995; Miozzo et al., 1996; Klamt et al., 1998; Hing et al., 2001). Des Weiteren führten genomweite Analysen zur Bestätigung publizierter Regionen, wie 1p, 11p, 11q und 16q und zur Identifikation und Eingrenzung neuer Regionen, wie z.B. 9q22.2-q31.1 und 4q24-q25, jedoch war es auch hier nicht möglich, ein potenziell

verantwortliches Tumorsuppressorgen zu bestimmen. Außerdem ergaben sich in fortgeschrittenen Tumoren erhöhte LOH-Raten für 1p, 14q, 16q und 17p (Ruteshouser et al., 2005; Yuan et al., 2005). Basierend auf der Amerikanischen NWTs Studie konnten Grundy et al. nicht nur Allelverluste auf 1p und 16q nachweisen, sondern diese zusätzlich mit einem erhöhten Rezidiv- und Sterberisiko in Verbindung bringen, jedoch nur für Patienten mit niedrig/intermediär malignen Tumoren der Stadien I und II. Für Patienten der Stadien III und IV waren erhöhte Risiken nur dann gegeben, wenn beide Regionen in Kombination verloren gegangen waren (Grundy et al., 2005). Allerdings sind in der NWTs Studie nur primär operierte Tumoren inkorporiert, weswegen sich diese genetisch von Tumoren der SIOP Studie, die präoperativ eine Chemotherapie erhalten, unterscheiden können. Nicht zuletzt konnte die Region auf 1p auf 2,32 Megabasen eingegrenzt werden (1p36.22-1p36.33), jedoch misslang auch hier die Identifikation eines Tumorsuppressorgens (Tamimi et al., 2007).

5.1.1 LOH-Analysen auf 11q und 16q

Gehäufte Allelverluste auf 11q waren bereits in diversen, früheren Studien gefunden worden, die zudem mit höheren Rezidivraten und einer schlechten klinischen Prognose assoziiert waren (Radice et al., 1995; Klamt et al., 1998; Ruteshouser et al., 2005; Yuan et al., 2005). Um dies in einer großen Anzahl von Tumoren zu bestätigen und die Region der Allelverluste auf einen kleineren Bereich einzuschränken, wurden LOH-Analysen auf 11q in 225 Wilms Tumoren durchgeführt. Die hierbei beobachtete LOH-Rate von 19,6 % entsprach den Raten von 9,8 – 37 % der kleineren Studien. Somit scheinen Allelverluste auf 11q ein stetiges und relativ häufiges Ereignis in Wilms Tumoren zu sein. Allerdings war auch hier die Eingrenzung auf einen kritischen Bereich bzw. die Bestimmung eines potenziellen Tumorsuppressorgens nicht möglich. Auch wenn deutlich mehr Verluste im Bereich des Telomers zu verzeichnen waren, konnten diese nicht ab einem bestimmten Marker beobachtet werden, sondern verteilten sich über mehrere Marker hinweg, was die Bestimmung einer prominenten Region erschwerte.

LOH-Analysen auf 16q ergaben eine LOH-Rate von 18,4 %, die ebenso den Raten früherer Studien entsprach (Maw et al., 1992; Klamt et al., 1998; Grundy et al., 2005; Ruteshouser et al., 2005; Yuan et al., 2005). Ähnlich wie bei 11q konnten zwar eingeschränkte Allelverluste in verschiedenen Regionen entdeckt werden, jedoch überlappten diese nicht derart, dass eine Eingrenzung der Region bzw. die Ermittlung eines potenziell verantwortlichen Gens möglich war. Ebenso konnte die Region von 6,7 Megabasen nicht bestätigt werden (Safford et al., 2003).

Ausgehend von diesen Ergebnissen muss sowohl für 11q als auch für 16q angenommen werden, dass in beiden Regionen mehr als ein Gen an der Entstehung von Wilms Tumoren beteiligt ist.

Ein Vergleich der Tumoren mit LOH 11q und 16q ergab, dass in mehr als der Hälfte der Tumoren mit LOH in einer der Regionen ebenso Verluste in der anderen Region vorlagen, diese also oft gemeinsam auftraten. Auch wenn frühere Studien bereits immer wieder auf die Relevanz dieser Chromosomenarme hinwiesen und deutlich erhöhte Raten von LOH festgestellt wurden, konnte hier zum ersten Mal gezeigt werden, dass Allelverluste in beiden Regionen oft gemeinsam auftreten und miteinander assoziiert sind.

5.1.2 LOH und Mutationen in CTNNB1 und WT1

Auffällig war, dass keiner der 10 Tumoren mit WT1 Mutation und nur einer der 22 Tumoren mit CTNNB1 Mutation Allelverluste auf 11q aufwiesen. Ebenso wenig waren Tumoren mit WT1 und/oder CTNNB1 Mutation von LOH 16q betroffen. Allerdings konnte nur die letzte dieser Beobachtungen statistisch bewiesen werden, die anderen verfehlten das Signifikanzniveau, was vermutlich an den zu kleinen Stichprobenzahlen lag, die eine statistische Analyse stets erschweren und die hieraus gewonnenen Ergebnisse sehr unverlässlich machen. Nichtsdestotrotz scheinen Tumoren mit WT1 und/oder CTNNB1 Mutation keine weiteren genetischen Ereignisse zu brauchen, um sich zu entwickeln, wie bereits früher für Tumoren mit Wildtyp-Status von WT1 gezeigt, die verglichen mit Tumoren mit Mutation in WT1 deutlich höhere LOH-Raten aufwiesen (Ruteshouser et al., 2005).

5.1.3 LOH und Histologie

Ähnlich wie Mutationen in WT1 und CTNNB1, die in Wilms Tumoren oft gemeinsam vorliegen (Maiti et al., 2000) scheinen auch gleichzeitige Allelverluste auf 11q und 16q die Ausbildung bestimmter Subtypen von Tumoren nach sich zu ziehen bzw. die Entwicklung gewisser Zelltypen zu behindern. Nachdem sowohl LOH auf 11q sowie LOH 16q bereits mit der Entwicklung von Anaplasie in Verbindung gebracht werden konnte (Klamt et al., 1998), brachte diese Untersuchung höhere LOH-Raten auf 11q und 16q in Mischtypen und diffus anaplastischen Tumoren zum Vorschein, während epitheliale und stromareiche Tumoren niemals LOH 11q und nur ein stromareicher Tumor LOH 16q aufwiesen. Zudem ergab ein Vergleich von LOH 11q und 11p, dass in einem großen Anteil von Mischtypen mit LOH 11q auch 11p13 betroffen war. Somit scheinen Allelverluste auf 11q (inklusive 11p13) und 16q Gene zu beeinträchtigen, die normalerweise für die Ausbildung bzw. die Differenzierung von Epithel- und Stromazellen verantwortlich sind. Andererseits könnte die Expression dieser Gene aber auch einen negativen Einfluss auf die Anreicherung von Blastemzellen bzw. die Ausbildung von Anaplasie nehmen. Eine weitere Erklärung wäre, dass die Verbindung von LOH 11q und 16q mit bestimmten Subtypen von Wilms Tumoren auf einen unterschiedlichen zellulären Ursprung und somit auf verschiedene molekulare Ursachen der Tumorentstehung hinweisen könnte, wie zuvor für Tumoren

gezeigt, die sich aus intra- oder perilobären nephrogenen Resten entwickeln (Charles et al., 1998).

5.1.4 Korrelation von LOH mit Rezidiv und Mortalität

Neben der Feststellung von Allelverlusten in beiden Regionen und deren unterschiedlicher Häufigkeiten in verschiedenen Tumorsubtypen war die Assoziation mit klinischen Parametern von besonderer Relevanz. Diese kann eine Vorhersage über den Verlauf der Tumorerkrankung und die Einteilung von Patienten in entsprechende Risikogruppen ermöglichen. Bereits in einer früheren Studie konnten LOH 11q und 16q mit einem erhöhten Rezidiv- und Sterberisiko assoziiert werden (Klamt et al., 1998), was mit dieser Untersuchung bestätigt werden konnte. Für 11q allerdings nur dann, wenn der komplette lange Arm von Chromosom 11 verloren gegangen war. Somit scheinen auf 11q mehrere Gene bzw. Bereiche für das Fortschreiten der Tumoren relevant zu sein. Diese Annahme wird durch frühere Studien bekräftigt, die ebenso nur eine erhöhte LOH-Rate, jedoch nie eine Eingrenzung der Region gehäufte Allelverluste, zeigen konnten (Radice et al., 1995; Klamt et al., 1998; Ruteshouser et al., 2005; Yuan et al., 2005). Auswertungen von LOH 11p in Tumoren mit LOH 11q zeigten, dass neben 11q auch oft 11p betroffen war, wo WT1 und das postulierte WT2 lokalisiert sind. Die separate statistische Auswertung von LOH 11p mit den klinischen Daten belegte, dass die zuvor getroffenen Assoziationen für 11q, wie z.B. die Vorhersage einer schlechten Prognose, nicht auf LOH 11p beruhen. Somit ließ sich zeigen, dass der Allelverlust auf 11q ein unabhängiges Ereignis in Wilms Tumoren darstellt und eine starke prognostische Relevanz für die Vorhersage einer schlechten Prognose besitzt.

Frühere LOH-Untersuchungen auf 16q sowohl in primär operierten Tumoren der amerikanischen NWTS-Studie wie auch in chemotherapierten Tumoren der GPOH/SIOP-Studie hatten gezeigt, dass Allelverluste mit höheren Rezidiv- und Sterberaten verbunden waren (Grundy et al., 1994; Klamt et al., 1998). Auch in dieser Analyse konnte eine hoch signifikante Assoziation von LOH 16q und einem erhöhten Rezidivrisiko bestätigt werden, die wiederum noch stärker war, wenn der komplette Arm involviert war. In Tumoren verstorbener Patienten ließen sich im Vergleich zu Tumoren von lebenden Patienten um 2,4-fach höhere LOH-Raten feststellen. Dies deckte sich mit früheren Studien, in denen bereits eine Verbindung von LOH 16q mit einem erhöhten Sterberisiko gezeigt werden konnte (Grundy et al., 1994; Grundy et al., 1996). Allerdings stellte sich diese Beobachtung, vermutlich auf Grund zu kleiner Stichprobenzahlen, nicht als statistisch signifikant heraus.

Nachdem das Vorhandensein von Anaplasie derzeit als einer der wichtigsten prognostischen Faktoren für den klinischen Verlauf von Wilms Tumorpatienten angesehen wird und gezeigt werden konnte, dass auch diese mit höheren LOH-Raten in beiden

Regionen assoziiert war, sollte geklärt werden, ob allein sie für die Korrelationen mit den höheren Rezidiv- und Sterberaten verantwortlich war oder die Assoziationen von LOH 11q und 16q auch unabhängig von der Anaplasie Bestand hatten. Hierfür wurde eine zweite, unabhängige Auswertung von LOH 11q und 16q mit den klinischen Daten durchgeführt, wovon die anaplastischen Tumoren ausgeschlossen wurden. Die alleinige Auswertung der anaplastischen Tumoren mit den klinischen Daten war auf Grund der geringen Stichprobenzahlen leider nicht möglich, somit konnte ein Zusammenhang auf direktem Wege nicht ausgeschlossen werden. Die Auswertung ohne die anaplastischen Tumoren ergab, dass die Anaplasie nicht für die getroffenen Aussagen verantwortlich war, da sich annähernd die gleichen Assoziationen ergaben wie zuvor. Somit konnte gezeigt werden, dass neben der Anaplasie die Untersuchungen auf Allelverluste auf 11q und 16q wichtige zusätzliche prognostische Faktoren darstellen, die zur Einschätzung eines erhöhten Risikos, im Verlauf der Tumorerkrankung an einem Rezidiv zu erkranken bzw. zu sterben, hilfreich scheinen.

5.2 Realtime RT-PCR Analysen in Wilms Tumoren

Eine umfangreiche Literatursuche führte zu einer Liste von Genen, deren Expression bereits früher mit bestimmten klinischen Parametern von Wilms Tumoren, wie z.B. einem Fortschreiten des Tumors oder einer schlechten Prognose, assoziiert werden konnten (s. Tab. 9). Die Expression dieser Gene wurde mittels Realtime RT-PCR in einer großen Anzahl von Tumoren gemessen, statistisch ausgewertet und anschließend mit einem zweiten, unabhängigen Tumorsatz validiert. Zusätzlich wurden Gene einbezogen, die bereits in diversen anderen Tumorarten auffällig geworden waren. Hiermit sollten die für Wilms Tumoren relevanten Gene herausgefiltert werden. Weiterhin sollte getestet werden, ob derartige Analysen zur Vorhersage bestimmter klinischer Verläufe und zur Abschätzung des Rezidiv- und Sterberisikos dienen können und somit in Zukunft zur Anwendung kommen sollten.

Erstaunlicherweise stellte sich heraus, dass für viele der bereits publizierten Gene (BAX, CDK4, CRABP2, DNAJB1, EGFR, FASN, HEY1, HEYL, ID1, ID3, IGF2R, MMP16, NTRK2_full und NTRK2_truncated) früher getroffene Zusammenhänge nicht bestätigt werden konnten, auch nicht, wenn nur die p-Werte der univariaten Analyse ohne Abgleich auf multiples Testen betrachtet wurden. Somit schienen diese für eine große Anzahl von Tumoren nicht relevant zu sein, wobei zum Teil auch die unterschiedlichen Untersuchungsmethoden für die Diskrepanzen verantwortlich sein können.

Die hier beschriebenen Ergebnisse wurden allein durch die Messung der Genexpression auf mRNA-Basis mit Hilfe der Realtime RT-PCR erhalten. Im Gegensatz hierzu wurden in früheren Publikationen diverse Methoden angewandt, in etwa der Hälfte die

Immunhistochemie. Potenzielle Unterschiede in der Translationseffizienz, Proteinstabilität und der histologischen Zusammensetzung der Tumoren, die bei dieser Methode eine Rolle spielen können, werden in Realtime RT-PCR Untersuchungen nicht berücksichtigt. Des Weiteren waren nicht in allen Veröffentlichungen die kompletten histologischen Daten der Tumoren verfügbar und auch die unterschiedliche histologische Klassifikation in Folge andersartiger Behandlungsstrategien erschwert den direkten Vergleich mit den hier erhaltenen Daten ((Jones and Pritchard-Jones, 2004) und darin enthaltene Referenzen). Nichtsdestotrotz weisen die Diskrepanzen bei verschiedenen Genen, die zuvor mit vergleichbaren Methoden auf RNA-Basis, wie z.B. Microarrays, Northern Blot Hybridisierung oder RT-PCR, untersucht wurden darauf hin, dass Unterschiede bei Genen, die mit Antikörperfärbungen analysiert wurden, nicht zwangsweise auf die Methode per se zurückzuführen sind, sondern z.T. auch generell nicht reproduzierbar sind.

Da bestimmte Gene auf Chemotherapeutika reagieren und in dieser Analyse sowohl primär operierte als auch chemotherapierte Tumoren involviert waren, sollte ausgeschlossen werden, dass die unterschiedlichen Therapieformen zu unterschiedlichen Ergebnissen bei den hier untersuchten Genen führten. Wäre dies der Fall, würde eine gemeinsame Auswertung zu falschen Ergebnissen führen, weswegen die beiden Tumorentitäten getrennt betrachtet werden müssten. Eine zweite Evaluierung, von der die primär operierten Tumoren ausgeschlossen wurden, zeigte jedoch kaum Unterschiede zu den zuvor erhaltenen Ergebnissen. Somit schien bei den hier untersuchten Genen die gewählte Therapieform nicht von Bedeutung zu sein, was die gemeinsame Auswertung aller Tumoren gestattete.

5.2.1 Assoziationen mit CTNNB1 Mutationen

Verbindungen mit Mutationen in CTNNB1 konnten nur für wenige Gene festgestellt werden. Die 8,9-fach erhöhte Expression von Dickkopf-1 (DKK1) in Tumoren mit CTNNB1 Mutation, die sich zudem auch nach Bonferroni-Abgleich als potenziell relevant ($p=0,1$) herausstellte, war hier das erwähnenswerteste Ergebnis. Das DKK1 Protein bindet an LRP5/6 (LDL receptor-related protein 5/6), wodurch die Signalübertragung über den Wnt-Signalweg blockiert und CTNNB1 stabilisiert wird (Lee et al., 2004). Zudem konnte gezeigt werden, dass mutiertes und stabilisiertes CTNNB1 wiederum den DKK1 Promoter aktiviert. Somit stellt eine erhöhte DKK1 Expression einen negativen Feedback Mechanismus dar, der dem anderer Komponenten aus dem Wnt-Signalweg in Wilms Tumoren mit CTNNB1 Mutationen ähnelt (Gonzalez-Sancho et al., 2005; Zirn et al., 2006).

5.2.2 Assoziationen mit dem Ansprechen auf die Chemotherapie und primären Metastasen

Mit Hilfe der univariaten Analyse (jedoch ohne Abgleich auf multiples Testen) konnten für das Ansprechen auf die Chemotherapie insgesamt fünf Gene herausgefiltert werden, die allesamt in Tumoren mit gutem Ansprechen auf die Chemotherapie, was einer Volumenreduktion um mehr als 50 % entspricht, signifikant hochreguliert waren: BCL2, BCL-X_L, EGR1, ITGA8 und TGFA. Alle diese Gene besitzen antiapoptotische Aktivität, die vermutlich zum Überleben dieser Zellen in Tumoren mit ansonsten starker Apoptose führt. Die Expression von EGR1 war interessanterweise in Tumoren mit gutem Ansprechen auf die Chemotherapie am höchsten, währenddessen eher geringe Expressionsniveaus sowohl in primär operierten Tumoren als auch in Tumoren mit einer geringen Volumenreduktion gefunden wurden. In einer früheren Studie konnte mittels Immunhistochemie die Expression von EGR1 im Blastem mit dem klinischen Fortschreiten der Tumoren und einem erhöhten Sterberisiko in Verbindung gebracht werden (Ghanem et al., 2000). Eine im Blastem vorherrschende Expression von EGR1 konnte in diesem Tumorsatz nicht bestätigt werden, allerdings ist auch die Unterscheidung zwischen der Expression verschiedener Zelltypen in dieser Art von Analyse nicht möglich. Nach dem Bonferroni-Abgleich auf multiples Testen war EGR1 der einzige signifikante Marker für das Ansprechen auf die Chemotherapie, zusätzlich stellte sich EGR1 zusammen mit DKK1 in der multivariaten Analyse als potenziell relevante Markerkombination für die Tumolvolumenreduktion heraus. Aus diesem Grund sollten DKK1 und EGR1 in prospektiven Studien genauer untersucht und ihre prognostische Fähigkeit validiert werden.

Assoziationen mit primären Metastasen wurden mit Hilfe der unabgeglichenen Wilcoxon Rangsummentests für die Expression von EGR1, CA9, CDKN2A_ARF, NTRK2_shc, STMN1 und TOP2A erhalten, welche jedoch allesamt durch Abgleich an multiples Testen verloren gingen. Viel wichtiger war allerdings die multivariate Analyse, durch die sich die Carboanhydrase IX (CA9) und die Topoisomerase 2A (TOP2A) als signifikante Markerkombination für das Vorliegen primärer Metastasen herausstellten. Im Gegensatz zu einer generellen TOP2A-Überexpression in allen Formen von Wilms Tumoren (Takahashi et al., 2002) konnte hier die deutlich verminderte Expression von TOP2A in Tumoren mit primären Metastasen gezeigt werden. Nichtsdestotrotz sind die Entwicklung und das Wachstum primärer Metastasen von einer Menge an Faktoren abhängig, die vermutlich in Gesamt-RNA aus dem Primärtumor nicht nachzuweisen sind. Die offensichtlichen Unstimmigkeiten zwischen den abgeglichenen Ergebnissen der Wilcoxon Rangsummentests und der multivariaten Analyse mögen an der Unfähigkeit der univariaten Tests liegen, Zusammenhänge zwischen verschiedenen untersuchten Variablen

einzubezieh. Somit können in univariaten Tests wichtige Variablen verloren gehen, die erst in Verbindung mit anderen Variablen relevant erscheinen (Flury, 1989; Sun et al., 1996).

5.2.3 Assoziationen mit der Histologie

Die Expression von insgesamt 12 Genen unterschied in der univariaten Analyse signifikant zwischen niedrig/intermediär und hoch malignen Tumoren, von denen jedoch nur HEY2, TERT, TRIM22 und VEGF nach dem Bonferroni-Holm Abgleich als potenziell relevant galten. Erstaunlicherweise waren Faktoren, die an der Angiogenese beteiligt sind, wie z.B. HEY2, ein bHLH Faktor und wichtiger arterieller Marker (Fischer et al., 2004), VEGF und FLT1 erheblich geringer in Tumoren der Hochrisikogruppe exprimiert als in Tumoren von niedriger/intermediärer Malignität. Dies verdeutlicht, dass das Tumorstadium scheinbar nicht so extrem von der Angiogenese abhing wie angenommen werden konnte (vgl. Tab. 11). Die Proliferationsmarker TERT, TOP2A und MYCN hingegen waren in hoch malignen Tumoren stets stärker exprimiert - wenn auch auf Grund erheblicher Schwankungen zwischen den Tumoren nicht immer signifikant - , was die erhöhte Aggressivität der Zellen veranschaulicht. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu veröffentlichten Antikörperfärbungen an Blastenzellen (Ghanem et al., 2002; Ghanem et al., 2003). Höchst erstaunlich war zuletzt die Tatsache, dass sich die Histologie selbst, die zur Zeit den wichtigsten Faktor für die klinische Beurteilung der Tumoren darstellt, in der multivariaten Analyse weder für die Einschätzung des Rezidiv- noch des Sterberisikos als starker prognostischer Marker herausstellte.

5.2.4 Prognostische Marker für Rezidiv und Tod

Tumoren, die mindestens zwei Jahre nach der Erstdiagnose noch kein Rezidiv bekommen hatten, wurden als rezidivfrei klassifiziert, da dieses Ereignis in den meisten Fällen in den ersten zwei Jahren nach der Initialdiagnose eintritt (Weirich et al., 2004). Wilcoxon Rangsummentests ergaben für die Expression von ABCC1, CD44_v5, HEY2, ID4, MYCN, TERT, TOP2A, TRIM22 und WT1 signifikante Assoziationen mit dem Auftreten von Rezidiven und dem folgenden Tod. Nach Bonferroni-Abgleich stellte sich für die Rezidive nur noch die Expression von HEY2, TERT und TRIM22 und für den Tod nur noch TRIM22 als signifikant heraus. Der Verlust der meisten signifikanten Ergebnisse für die Mortalität nach Abgleich an multiples Testen mag v.a. an der relativ niedrigen Stichprobenzahl von verstorbenen Patienten liegen, die eine korrekte statistische Auswertung erschwert. TRIM22, ein Ring-Finger Protein der „tripartite motif“ Familie, scheint für die Drosselung der Zellproliferation und den Eintritt in den Zellzyklusarrest zu sorgen (Obad et al., 2004). Eine Microarray-Analyse an Wilms Tumoren hatte bereits früher eine verminderte Expression von TRIM22 in rezidivierenden Tumoren gezeigt (Zirn

et al., 2006), mit Hilfe dieser Studie konnte dies für eine große Anzahl von Wilms Tumoren bestätigt werden. Ausgehend von diesen Entdeckungen scheint eine genaue Erforschung des derzeit relativ unbekanntes Proteins TRIM22 und dessen Funktion von großer Bedeutung zu sein.

Für die Expression von TERT wurden bereits früher in Tumoren der NWTS-Studie deutlich höhere Werte in rezidivierenden Tumoren festgestellt, weswegen die Bestimmung der mRNA Mengen von TERT zur Vorhersage der Rezidivwahrscheinlichkeit bei Tumorpatienten dienen sollte (Dome et al., 2005). Die hier festgestellten Expressionsdifferenzen von TERT bekräftigen diese Annahmen, weswegen weitere Anstrengungen unternommen werden sollten, die wahre prognostische Fähigkeit von TERT zu beurteilen und TERT als Marker zu etablieren.

Die multivariate Analyse ergab HEY2 und TERT als prognostische Markerkombination für das Auftreten von Rezidiven und ausschließlich MYCN für den Tod. MYCN ist ein Transkriptionsfaktor, der in verschiedene Vorgänge der Proliferation, Differenzierung, Transformation und Apoptose involviert ist. Erhöhte MYCN Expression konnte bereits beim Neuroblastom mit einer höheren Aggressivität der Tumoren, d.h. einem höheren Stadium, einem schnellen Fortschreiten des Tumors sowie einer schlechten Prognose, in Verbindung gebracht werden (Cohn and Tweddle, 2004), weswegen MYCN bereits als Marker für die Klassifikation dieser Tumoren eingesetzt wird. Die Situation in Wilms Tumoren scheint sehr ähnlich zu sein. Hier war ebenso eine erhöhte Expression in Tumoren mit schlechter Prognose zu beobachten. Zusätzlich war MYCN in der multivariaten Analyse das einzig potenziell relevante Gen für die Vorhersage eines möglichen Todes. Aus diesem Grund sollte MYCN, wie bereits beim Neuroblastom geschehen, auch bei Wilms Tumoren als prognostischer Faktor in Erwägung gezogen und in prospektiven Studien verifiziert werden.

5.2.5 Validierung der Ergebnisse

Um die mit dem ersten Tumorsatz erhaltenen signifikanten bzw. potenziell relevanten Gene zu validieren wurden diese erneut in einem zweiten, unabhängigen Tumorsatz bestehend aus 76 Wilms Tumoren untersucht. Die univariate Analyse inklusive Bonferroni-Holm Abgleich der neun ausgewählten Gene, CA9, DKK1, EGR1, HEY2, MYCN, TERT, TOP2A, TRIM22 und VEGF, bestätigte die signifikante Repression von HEY2 in hoch malignen Tumoren und von TRIM22 in Tumoren von verstorbenen Patienten. Zwar konnten mittels Wilcoxon Rangsummentests noch weitere Assoziationen nachgewiesen werden, wie z.B. die Alteration von TERT und TRIM22 in rezidivierenden Tumoren, jedoch verfehlten diese nach dem Abgleich an multiples Testen knapp das Signifikanzniveau. Mit Hilfe der multivariaten Analyse konnte eine schwach signifikante Verbindung von TOP2A mit primären Metastasen, von TERT mit Rezidiven, sowie von

TRIM22 mit dem Tod bekräftigt werden. Bei der Bewertung der Odds Ratios fiel auf, dass das stärkste und reproduzierbarste Ergebnis die Zunahme des Risikos für die Entwicklung primärer Metastasen bei einer Repression von TOP2A war (2,28 im Originalsatz und 2,20 im Validierungssatz, vgl. Tab. 13 und 15). Im Gegensatz hierzu konnte eine Reduktion des Rezidivrisikos in Tumoren mit höherer TERT Expression festgestellt werden (Odds Ratios von 0,19 und 0,36).

Auch wenn es im Zuge der Validierung nicht möglich war, alle zuvor signifikanten bzw. potenziell relevanten Zusammenhänge des ersten Tumorsatzes zu bekräftigen, so wurde dennoch oft eine gleichgerichtete Regulation der untersuchten Gene erhalten, mit z.T. noch höheren Expressionsdifferenzen zwischen den Gruppen als zuvor. Dass diese Auffälligkeiten von teilweise extrem hohen Expressionsänderungen trotzdem nicht durch die statistische Auswertung bestätigt werden konnten, lag aller Wahrscheinlichkeit nach an höheren Expressionsdifferenzen zwischen den Tumoren innerhalb einer Gruppe, die sich in größeren Varianzen und einer geringeren Signifikanz äußerten. Außerdem könnten zusätzlich unberücksichtigte Faktoren das Ergebnis beeinflussen bzw. verfälschen, wie z.B. eine unterschiedliche histologische Zusammenstellung der Tumoren. Wie die detaillierte Analyse der ausgewählten Tumoren ergab, unterschieden sich die zwei Tumorsätze anhand ihrer prozentualen Anteile von Mischtyp- und regressiven Tumoren. Während im Originalsatz die Mischtypen mit 42,7 % überwogen, waren diese im Validierungssatz nur noch mit 25 % vertreten. Im Gegenzug lag der Anteil an regressiven Tumoren im Validierungssatz mit 40,8 % deutlich über dem des Originalsatzes von 16,2 %. Wurden nur diese beiden Tumortypen sowohl im Original- wie auch im Validierungssatz gegeneinander verglichen, ergaben sich für die meisten der untersuchten Gene zwischen diesen beiden Gruppen signifikante Expressionsdifferenzen, was verdeutlicht, dass eine unterschiedliche Gewichtung der histologischen Subtypen in den beiden Sätzen die statistische Auswertung aller Tumoren vermutlich ebenso beeinflusst hatte.

Weiterhin sind auch die Gruppengrößen von Bedeutung. Statistische Auswertungen sind nur bei Vorliegen entsprechend großer Gruppen repräsentativ, jedoch standen v.a. im Validierungssatz in bestimmten Parametern oft nur wenige Tumoren zur Verfügung. So waren nur 6 Tumoren in die histologische Hochrisikogruppe einzuordnen, verglichen mit 70 niedrig/intermediär malignen Tumoren und nur 3 von 75 Tumoren kamen von später verstorbenen Patienten. In diesen Fällen können die durchgeführten Tests zwar eine Tendenz anzeigen, jedoch ist es sicherlich notwendig, die Analysen mit einer viel größeren Anzahl von Tumoren zu wiederholen, um repräsentativere Gruppen und somit verlässlichere statistische Ergebnisse zu erhalten.

5.2.6 Zusammenfassung

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass viele der zuvor getroffenen Assoziation auf einen neuen und histologisch anders zusammengestellten Tumorsatz nicht zutreffen, wie auch die Validierung der Realtime RT-PCR Ergebnisse durch den zweiten, unabhängigen Tumorsatz bestätigte. Nichtsdestotrotz konnte die prognostische Relevanz einiger Gene gezeigt werden, wie z.B. von HEY2, TERT und TRIM22 für erhöhte Rezidiv- und Sterberaten. Zusätzlich gelang die Identifikation der Verbindung einer veränderten HEY2-, CA9- und VEGF- Expression mit erhöhten Rezidivraten, primären Metastasen oder Tumoren der Hochrisikogruppe. Dies verdeutlicht, dass eine Charakterisierung der Hypoxie- und Angiogenese-Signalkaskaden in Wilms Tumoren v.a. bezogen auf den klinischen Fortschritt und die Ausbreitung der Tumoren notwendig ist. Die mit Hilfe der Realtime RT-PCR Analysen erhaltenen Daten belegen, dass Markergene als prognostische Faktoren zur weiteren Klassifikation der Tumoren dienen können, um Hochrisikopatienten einer intensiveren Therapie zu unterziehen bzw. die Therapie und deren Nebenwirkungen für die anderen Patienten zu reduzieren.

5.3 Untersuchungen an Wilms Tumorzellen

Da die statistische Auswertung der Realtime RT-PCR Untersuchungen eine Reihe von potenziell wichtigen Markergenen für die Entwicklung bzw. das klinische Fortschreiten von Wilms Tumoren identifiziert hatte, sollten die Effekte dieser Gene auf Wilms Tumorzellen in Kultur untersucht werden. Hierbei waren sowohl die Überexpression sowie die Repression bestimmter Gene und deren Auswirkungen von Interesse. Da keine etablierten Wilms Tumor Zelllinien zu erhalten sind, wurden Primärkulturen aus nativem Wilms Tumormaterial gewonnen, diese als wahre Tumorzellen verifiziert und für die Experimente verwendet.

5.3.1 Transduktion und Nachweis der Expression

Vier dieser Primärkulturen wurden mit Hilfe von Lentiviren transduziert. Etwa drei Tage nach der Behandlung konnte bei allen Fluoreszenz beobachtet werden, was belegte, dass sich so gewonnene Wilms Tumorzellen unterschiedlicher Tumoren erfolgreich mit Hilfe von Lentiviren transduzieren lassen und einen Hinweis auf die Expression der ausgewählten Gene bzw. shRNAs lieferte.

Der Nachweis der Überexpression der Gene mittels Westernblot gelang nur in einigen Fällen, bei den anderen Zellen schien nicht genug Protein exprimiert zu werden bzw. die Anzahl der Zellen zu gering zu sein. Die parallele mRNA-Analyse der Zellen zeigte

jedoch, dass EGR1, MYCN und TRIM22 in allen verwendeten Zellen überexprimiert wurden, wobei MYCN noch deutlich stärker als EGR1 und TRIM22 exprimiert war. Dies erklärt, warum die Expression dieses Gens bereits auf dem Westernblot nachzuweisen war. Zwar stellt die Bestimmung der mRNA-Menge zur Bestätigung der Überexpression nicht die Standardmethode dar, da hierdurch die Translation der mRNA nicht gewährleistet ist, jedoch hatten zuvor durchgeführte Experimente in 293TD- und HeLa-Zellen bereits die korrekte Translation der Gene belegt. Aus diesem Grund konnte angenommen werden, dass auch in Wilms Tumorzellen die Translation in funktionelles Protein erfolgte. Für HEY2 war auf Grund der hohen Sterberate der Zellen nach der Transduktion weder ein Nachweis auf Protein-, noch auf mRNA-Ebene möglich und auch die Durchführung weiterer Experimente ausgeschlossen. Lediglich die Fluoreszenz der Zellen in Verbindung mit dem Nachweis der Proteinexpression in 293TD Zellen gaben den Hinweis auf eine Expression von HEY2 in den transduzierten Wilms Tumorzellen. Dieser starke negative Einfluss der HEY2 Expression auf das Wachstum der Wilms Tumorzellen deckte sich mit den Erwartungen anhand der Realtime RT-PCR Analysen, die die signifikante Assoziation einer Repression von HEY2 mit fortgeschrittenen Tumoren und v.a. rezidivierenden Tumoren gezeigt hatten.

Ebenso sollte die Funktion der shRNAs auf mRNA-Basis mittels Realtime RT-PCR nachgewiesen werden, jedoch waren bei HEY2 und MYCN entweder keinerlei Unterschiede in der Expression bzw. sogar eine erhöhte Expression im Vergleich zu den Kontrollzellen zu beobachten. Mit den shRNAs für CD44_v5 und TRIM22 konnte zwar in den meisten Zellen eine leichte Repression der Gene nachgewiesen werden, jedoch war die Restexpression dieser Gene mit wenigstens 23 % noch immer zu hoch. Somit konnte mit keiner shRNA eine ausreichende Repression erreicht werden, obwohl durch die Integration der shRNAs in die miR30 generell eine sehr effiziente Expression der shRNAs erreicht wird (Stegmeier et al., 2005). Es stellt sich die Frage, ob alle hier verwendeten shRNAs nicht funktionell waren oder die Effizienz in Wilms Tumorzellen generell sehr gering ist. Dies könnte z.B. durch den Einsatz anderer shRNAs für die gleichen Gene bzw. durch die Transduktion der hier eingesetzten shRNAs in andere Zellen getestet werden. Zudem ist zu klären, wie es zu einer scheinbaren Zunahme der Expression nach der Transduktion von HEY2 und MYCN kommen konnte.

5.3.2 Einfluss der Überexpression auf die Zellen

In Folge der Überexpression der Gene ließen sich innerhalb kürzester Zeit extreme morphologische Veränderungen und ein verstärktes Sterben oder zumindest ein stark vermindertes Wachstum der Zellen feststellen. Wachstumskurven trugen zur experimentellen Bestätigung dieser subjektiven Beobachtungen bei und belegten im Vergleich zu den unbehandelten Zellen ein geringfügiges Wachstum bzw. das Sterben der

transduzierten Zellen. Ein Problem dieser Wachstumskurven war jedoch, dass durch den Vorgang des Ablösens und Auszählens stets ein gewisser Anteil der Zellen verloren ging, was auf Grund des relativ geringen Wachstums den Eindruck einer Reduktion der Zellzahl vermittelte. Zudem schienen manche Zellen auf die Trypsin-Behandlung und das Passagieren zu reagieren und begannen erst nach einer gewissen Erholungsphase erneut zu wachsen. Somit waren v.a. die kurzen Zeitabstände zwischen dem Auszählen für die negativen Verläufe der Wachstumskurven verantwortlich, die jedoch auf Grund des starken Wachstums der Kontrollzellen so gewählt werden mussten. Repräsentativere Wachstumskurven der transduzierten Zellen würden größere Zeitabstände verlangen, was deutlich aus parallelen Ansätzen der Zellen ersichtlich war, die unbeeinträchtigt z.T. über mehrere Wochen wachsen konnten. Hier zeigte sich, dass die meisten Zellen, wenn auch nur sehr langsam, konfluent wuchsen und für weitere Experimente einsetzbar waren. Trotz des negativen Verlaufs der Wachstumskurven, die teilweise nicht das wahre Wachstumsverhalten der Zellen widerspiegelten, belegten diese ein deutlich stärkeres Wachstum der Kontrollzellen im Vergleich zu Zellen nach der Transduktion.

5.3.2.1 Folgen der Überexpression von EGR1

Die Überexpression von EGR1 führte zu einem starken Sterben der WS576 und MZ128 Zellen bzw. einem stark eingeschränkten Wachstum der WS539 und WS591 Zellen, weshalb letztere zumindest in einigen Versuchen eingesetzt werden konnten. Mit Ausnahme von Prostatakrebs, bei dem sich die Expression von EGR1 in einem verstärkten Tumorwachstum auswirkt, konnte in zahlreichen anderen Krebsarten, wie z.B. Brustkrebs, Lungen- und Gehirntumoren, eine verminderte oder fehlende Expression von EGR1 nachgewiesen werden. Zusätzlich führte die Überexpression von EGR1 in Tumorzellen zu einer Normalisierung des Wachstumsverhaltens (Huang et al., 1997; Adamson and Mercola, 2002). Auf Grund dieser bekannten Wirkung von EGR1 in anderen Tumorarten und der in der Realtime RT-PCR ermittelten erhöhten Expression von EGR1 in Wilms Tumoren mit starker Volumenreduktion im Verlauf der Chemotherapie entsprachen diese Beobachtungen den Erwartungen. Allerdings konnte der Grund für das eingeschränkte Wachstum bzw. Sterben der Zellen nicht geklärt werden, da weder die Apoptose noch die Seneszenz bei den WS539 und WS591 Zellen beteiligt zu sein schien. Bereits für andere Tumorzellen konnte gezeigt werden, dass eine Re-Expression von EGR1 antiapoptotische Aktivität besitzt (Adamson and Mercola, 2002), was sich in diesen Wilms Tumorzellen zu bestätigen scheint. Es bleibt zu klären, ob dies auch für die WS576 und MZ128 Zellen zutrifft oder die Apoptose hier für die extrem hohen Sterberaten verantwortlich ist.

Der Grund für das unterschiedliche Verhalten der Primärkulturen könnte am genetischen Hintergrund der Zellen liegen. Interessanterweise weisen WS539 und WS591 Zellen beide eine Deletion im C-terminalen Bereich von WTx auf, währenddessen MZ128 und WS576

Zellen eine Mutation in WT1 bzw. CTNNB1 besitzen. Diese verschiedenen genetischen Alterationen der Primärkulturen scheint diese auch in ihrem Wachstumsverhalten voneinander abzugrenzen. Es bleibt zu klären, ob dies tatsächlich auf diese Bereiche des Genoms oder andere bisher unberücksichtigte Faktoren zurückzuführen ist, weswegen weitere und genetisch verschiedene Primärkulturen untersucht werden sollten. Zusätzlich sollte der dem Sterben zu Grunde liegende Mechanismus erforscht werden.

5.3.2.2 Folgen der Überexpression von MYCN

Die extremste Morphologieänderung der Wilms Primärkulturen konnte nach der Transduktion mit MYCN festgestellt werden. FACS-Analysen gaben zudem den Hinweis auf eine Zunahme der apoptotischen Aktivität der Zellen, die durch Apoptoseassays bestätigt werden konnte. Allerdings konnten bei zwei Primärkulturen zusätzliche Veränderungen in der G2/M-Phase festgestellt werden. Während die Zellzahl in der G2/M-Phase bei den WS539 Zellen deutlich zunahm, reduzierte sich diese bei den MZ128 Zellen. Es scheint, als ob WS539 Zellen zuerst in einen G2/M-Arrest eintreten, bevor sie in die Apoptose gehen, oder eventuell ein Teil der Zellen im Arrest verbleiben, im Gegensatz zu MZ128 Zellen, die wohl direkt, ohne vorherigen Arrest, apoptotisch werden.

Seneszenzfärbungen zeigten, dass MYCN-überexprimierende Zellen nach einiger Zeit in einen Zellzyklusarrest eintreten, was bei den WS539 früher zu geschehen scheint als bei den anderen Primärkulturen. Hier war dies bereits, wie oben erwähnt, bei den vor der Seneszenzfärbung durchgeführten FACS-Analysen zu beobachten.

Auch wenn in den unterschiedlichen Primärkulturen relativ starke Expressionsunterschiede von MYCN gemessen werden konnten, so waren die Apoptose- und Seneszenzraten bei allen relativ gleich. Somit scheint bereits die niedrigste gemessene Expression vollkommen für die starken Veränderungen der Zellen auszureichen und eine noch höhere Expression keinen weiteren Einfluss zu nehmen oder extremere Auswirkungen zu besitzen.

Jedoch stehen die Beobachtungen der Zellkultur im Kontrast zu den Realtime RT-PCR Ergebnissen. Während zuvor eine erhöhte Expression von MYCN signifikant mit dem Fortschreiten der Tumoren assoziiert war, führte hier eine erhöhte MYCN Expression zum Tod der Zellen bzw. zum Eintritt in die Seneszenz. Auch beim Neuroblastom konnte eine verstärkte MYCN Expression mit einem höheren Stadium, dem Fortschreiten der Tumoren und einer schlechten Prognose assoziiert werden (Cohn and Tweddle, 2004). Allerdings war keiner der Tumoren, aus denen die hier verwendeten Primärkulturen gewonnen wurden, von hoch maligner Histologie, noch bekamen die Patienten der Tumoren WS539 oder WS591 im Anschluss ein Rezidiv oder verstarben im Verlauf der Erkrankung. Für die Patienten WS576 und MZ128 liegen leider keine weiteren Daten vor. Somit scheinen diese Tumoren allesamt nicht zur Hochrisikokategorie zu gehören, was die Unterschiede zu den zuvor erhaltenen Messungen erklären kann. Wie an Nagerzellen bereits gezeigt werden

konnte, reichte die Kombination zweier Onkogene, MYC und RAS, allein für die Transformation dieser Zellen aus (Schmitt, 2003). Dass auch hier MYCN alleine nicht auszureichen schien, verdeutlicht, dass der genetische Hintergrund der Zellen eine sehr große Rolle spielt und wohl in keiner der hier gewählten Primärkulturen die zur Transformation zusätzlich benötigten Faktoren gegeben waren. Nichtsdestotrotz belegte allein die extreme morphologische Alteration der Zellen das ungeheure Potenzial von MYCN. Weitere Untersuchungen v.a. auch an Primärzellen fortgeschrittener und rezidivierender Tumoren könnten zeigen, ob hier die Transduktion von MYCN zu einem anderen Ergebnis bzw. dem Überleben der Zellen führen kann.

5.3.2.3 Folgen der Überexpression von TRIM22

Die Überexpression von TRIM22 äußerte sich in einem stark eingeschränkten Wachstum bzw. vermehrten Sterben der transduzierten Zellen, das hauptsächlich durch die Apoptose hervorgerufen zu werden schien. Allerdings zeigten die FACS-Analysen der MZ128 Zellen ebenso eine Zunahme der Zellen in der S- und G2/M-Phase, was verdeutlicht, dass TRIM22 zwar zu einem Eintritt der Zellen in die Apoptose führte, jedoch die verbliebenen vitalen Zellen verstärkt proliferierten. Somit schien die Expression von TRIM22 nicht auf alle Zellen der Kultur den gleichen Effekt zu haben. Da sich Wilms Tumoren aus verschiedenen Zelltypen zusammensetzen und hieraus gewonnene Primärkulturen vermutlich ebenso ein Gemisch verschiedener Zellen darstellen, könnten unterschiedliche Effekte von TRIM22 auf die verschiedenen histologischen Typen und deren genetischen Hintergrund zurückzuführen sein. Ebenso könnte die Integrationsstelle von TRIM22 einen Einfluss auf die TRIM22 Expression nehmen (s.u.). Erstaunlicherweise ergaben die FACS-Analysen der WS591 Zellen keinerlei Alterationen im Zellzyklus, jedoch konnte auch hier mittels Apoptoseassay eine stark erhöhte Apoptoserate festgestellt werden. Es ist nicht auszuschließen, dass sich die Zusammensetzung der Zellen für die FACS-Analyse von denen der Apoptoseassays unterschied, da für die FACS-Analysen eine große Anzahl an Zellen benötigt wird und diese somit viel länger in Kultur gehalten werden mussten als Zellen für die Apoptoseassays. Somit waren Zellen, die mit Apoptose auf die Überexpression reagierten, vermutlich bereits gestorben und nicht mehr nachweisbar.

Bei den anderen Primärkulturen resultierte die Überexpression von TRIM22 in einem stark verlangsamten Wachstum, sodass eine Messung per FACS nicht möglich war. Allerdings zeigten auch hier die Apoptoseassays eine starke Zunahme der apoptotischen Aktivität. Auffällig war, dass zwischen den verschiedenen Primärkulturen starke Unterschiede in der Apoptoserate bestanden. Dies deutet darauf hin, dass die Überexpression dieses Gens je nach genetischem Hintergrund einen unterschiedlich starken Einfluss auf die Zellen nimmt. Ein anderer Grund könnte jedoch auch die unterschiedliche Integration des Gens im Genom sein, wodurch die Expression durch umgebende Elemente, wie z.B. Enhancer

oder Silencer, unterschiedlich beeinflusst wird. Jedoch kann letzteres weitgehend ausgeschlossen werden, da es sich jeweils um Mischkulturen handelte, bei denen eine vergleichsweise homogene Verteilung der Integrationsstellen in den Zellen vorliegen sollte bzw. bevorzugte Stellen für die Integration (sog. Hotspots) unverändert bleiben sollten. Zudem konnte in den mRNA-Analysen eine relativ gleiche Expressionshöhe von TRIM22 in den verschiedenen Zellen gezeigt werden. Im Gegensatz hierzu waren die Expressionsdifferenzen von MYCN zwischen den Zellen deutlich größer, die sich jedoch nicht in stark unterschiedlichen Messergebnissen äußerten. Somit ist anzunehmen, dass Unterschiede im Einfluss von TRIM22 auf die Apoptoserate tatsächlich auf den genetischen Hintergrund der Zellen zurückzuführen sind.

Wie bereits für MYCN gesehen verblieben auch einige restliche TRIM22 überexprimierende Zellen auf der Schale. Allerdings zeigten diese keinerlei Anzeichen von Seneszenz.

Zusammenfassend bestätigen die vorliegenden Beobachtungen die Ergebnisse der Realtime RT-PCR-, sowie früherer Microarray-Analysen. Hier war TRIM22 signifikant in rezidivierenden Tumoren (Zirn et al., 2006), sowie in Tumoren hoher Malignität und verstorbener Patienten reprimiert. Somit konnte erneut gezeigt werden, dass TRIM22 ein potenziell relevantes Gen in Wilms Tumoren darstellt, das einen entscheidenden Einfluss auf die Wachstumskontrolle zu haben und normalerweise das Fortschreiten von Wilms Tumoren zu behindern scheint. Interessanterweise liegt TRIM22 in der Region 11p15, die in LOH-Analysen stets als prominente Region in Wilms Tumoren identifiziert wurde. Bereits seit seiner Entdeckung wird TRIM22 auf Grund seiner Proteindomänen eine Funktion als Tumorsuppressorgen zugeschrieben, was durch diese Untersuchungen bekräftigt werden kann. Allerdings sollten weitere Versuche unternommen werden, die exakte Funktion und Wirkungsweise dieses Gens aufzuklären.

5.4 Ausblick

Erste Ergebnisse der an Wilms Primärkulturen durchgeführten Untersuchungen gaben starke Hinweise auf die tatsächliche Relevanz der Überexpression bzw. Repression von EGR1, HEY2, MYCN und TRIM22 bei der Tumorgenese und dem Fortschreiten von Wilms Tumoren. Für weitere Analysen sollten jedoch induzierbare Konstrukte kloniert werden, die das ungehinderte Wachstum der Zellen bis zur Induktion der Genexpression und anschließend die sofortige Messung der resultierenden Effekte erlauben. Leider scheiterte ein erster Versuch auf Grund einer scheinbar zu geringen Transduktionseffizienz des hierbei verwendeten Vektors.

Zusätzlich sollte geklärt werden, ob die hier eingesetzten shRNAs generell oder nur in Wilms Tumorzellen nicht funktionell sind. Dies könnte einerseits durch Transduktion der

shRNAs in andere Zellen bzw. durch die Klonierung und Transduktion anderer shRNAs für die gleichen Gene in Wilms Primärkulturen getestet werden.

Nicht zuletzt sollten weitere Versuche in einer deutlich größeren Anzahl von Primärkulturen, v.a. von hoch malignen und rezidierten Tumoren, sowie von Tumoren verstorbener Patienten, unternommen werden, um den Einfluss der Überexpression und Repression der Gene abhängig vom eventuellen genetischen Hintergrund der Zellen zu beurteilen. Vor allem für die Expression von MYCN könnte dies klären, inwieweit Zellen fortgeschrittener Tumoren den genetischen Hintergrund für die endgültige Transformation und das Überleben der Zellen liefern.

6. Literaturverzeichnis

- Adamson, E. D. and Mercola, D. (2002). "Egr1 transcription factor: multiple roles in prostate tumor cell growth and survival." Tumour Biol **23**(2): 93-102.
- Arcellana-Panlilio, M. Y., Egeler, R. M., Ujack, E., Pinto, A., Demetrick, D. J., Robbins, S. M. and Coppes, M. J. (2000). "Decreased expression of the INK4 family of cyclin-dependent kinase inhibitors in Wilms tumor." Genes Chromosomes Cancer **29**(1): 63-9.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. and Struhl, K. (1988). "Current Protocols in Molecular Biology." Green and Wiley-Interscience, New York.
- Beckwith, J. B. (1998). "Nephrogenic rests and the pathogenesis of Wilms tumor: developmental and clinical considerations." Am J Med Genet **79**(4): 268-73.
- Boatright, K. M. and Salvesen, G. S. (2003). "Mechanisms of caspase activation." Curr Opin Cell Biol **15**(6): 725-31.
- Call, K. M., Glaser, T., Ito, C. Y., Buckler, A. J., Pelletier, J., Haber, D. A., Rose, E. A., Kral, A., Yeger, H., Lewis, W. H., Jones, C. and Housman, D. E. (1990). "Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus." Cell **60**(3): 509-20.
- Camassei, F. D., Jenkner, A., Rava, L., Bosman, C., Francalanci, P., Donfrancesco, A., Alo, P. L. and Boldrini, R. (2003). "Expression of the lipogenic enzyme fatty acid synthase (FAS) as a predictor of poor outcome in nephroblastoma: an interinstitutional study." Med Pediatr Oncol **40**(5): 302-8.
- Charles, A. K., Brown, K. W. and Berry, P. J. (1998). "Microdissecting the genetic events in nephrogenic rests and Wilms' tumor development." Am J Pathol **153**(3): 991-1000.
- Cohn, S. L. and Tweddle, D. A. (2004). "MYCN amplification remains prognostically strong 20 years after its "clinical debut"." Eur J Cancer **40**(18): 2639-42.
- Creutzig, U., Henze, G., Bielack, S., Herold, R., Kaatsch, P., Klussmann, J.-H., Graf, N., Reinhardt, D., Schrappe, M., Zimmermann, M. and Jürgens, H. (2003). "Krebserkrankungen bei Kindern." Deutsches Ärzteblatt Jg. **100**(Heft 13): C665-C672.
- Dimri, G. P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E. E., Linskens, M., Rubelj, I., Pereira-Smith, O., Peacocke, M. and Campisi, J. (1995). "A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(20): 9363-7.

- Dome, J. S., Bockhold, C. A., Li, S. M., Baker, S. D., Green, D. M., Perlman, E. J., Hill, D. A. and Breslow, N. E. (2005). "High telomerase RNA expression level is an adverse prognostic factor for favorable-histology Wilms' tumor." J Clin Oncol **23**(36): 9138-45.
- Dome, J. S., Chung, S., Bergemann, T., Umbricht, C. B., Saji, M., Carey, L. A., Grundy, P. E., Perlman, E. J., Breslow, N. E. and 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**(17): 4301-7.
- Eggert, A., Grotzer, M. A., Ikegaki, N., Zhao, H., Cnaan, A., Brodeur, G. M. and Evans, A. E. (2001). "Expression of the neurotrophin receptor TrkB is associated with unfavorable outcome in Wilms' tumor." J Clin Oncol **19**(3): 689-96.
- Fischer, A., Schumacher, N., Maier, M., Sendtner, M. and Gessler, M. (2004). "The Notch target genes Hey1 and Hey2 are required for embryonic vascular development." Genes Dev **18**(8): 901-11.
- Flury, B. (1989). Understanding partial statistics and redundancy of variables in regression and discriminant analysis. The American Statistician. **43**: 27-31.
- Furtwängler, R., Schenk, J.-P., Reinhard, H., Leuschner, I., Rube, C., von Schweinitz, D. and Graf, N. (2005). "Nephroblastom - Wilms-Tumor." Der Onkologe **11**: 1077-1089.
- Gessler, M., Konig, A., Arden, K., Grundy, P., Orkin, S., Sallan, S., Peters, C., Ruyle, S., Mandell, J., Li, F., Cavenee, W. and Bruns, G. (1994). "Infrequent mutation of the WT1 gene in 77 Wilms' Tumors." Hum Mutat **3**(3): 212-22.
- Gessler, M., Poustka, A., Cavenee, W., Neve, R. L., Orkin, S. H. and Bruns, G. A. (1990). "Homozygous deletion in Wilms tumours of a zinc-finger gene identified by chromosome jumping." Nature **343**(6260): 774-8.
- Ghanem, M. A., Van Der Kwast, T. H., Den Hollander, J. C., Sudaryo, M. K., Mathoera, R. B., Van den Heuvel, M. M., Noordzij, M. A., Nijman, R. J. and van Steenbrugge, G. J. (2001). "Expression and prognostic value of epidermal growth factor receptor, transforming growth factor-alpha, and c-erb B-2 in nephroblastoma." Cancer **92**(12): 3120-9.
- Ghanem, M. A., Van der Kwast, T. H., Den Hollander, J. C., Sudaryo, M. K., Oomen, M. H., Noordzij, M. A., Van den Heuvel, M. M., Nassef, S. M., Nijman, R. M. and Van Steenbrugge, G. J. (2000). "Expression and prognostic value of Wilms' tumor 1 and early growth response 1 proteins in nephroblastoma." Clin Cancer Res **6**(11): 4265-71.
- Ghanem, M. A., Van der Kwast, T. H., Den Hollander, J. C., Sudaryo, M. K., Van den Heuvel, M. M., Noordzij, M. A., Nijman, R. J., Soliman, E. H. and van

- Steenbrugge, G. J. (2001). "The prognostic significance of apoptosis-associated proteins BCL-2, BAX and BCL-X in clinical nephroblastoma." Br J Cancer **85**(10): 1557-63.
- Ghanem, M. A., van Steenbrugge, G. J., Nijman, R. J. and van der Kwast, T. H. (2005). "Prognostic markers in nephroblastoma (Wilms' tumor)." Urology **65**(6): 1047-54.
- Ghanem, M. A., van Steenbrugge, G. J., Sudaryo, M. K., Mathoera, R. B., Nijman, J. M. and van der Kwast, T. H. (2003). "Expression and prognostic relevance of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor (FLT-1) in nephroblastoma." J Clin Pathol **56**(2): 107-13.
- Ghanem, M. A., Van Steenbrugge, G. J., Van Der Kwast, T. H., Sudaryo, M. K., Noordzij, M. A. and Nijman, R. J. (2002). "Expression and prognostic value Of CD44 isoforms in nephroblastoma (Wilms tumor)." J Urol **168**(2): 681-6.
- Godbey, W. T., Barry, M. A., Saggau, P., Wu, K. K. and Mikos, A. G. (2000). "Poly(ethylenimine)-mediated transfection: a new paradigm for gene delivery." J Biomed Mater Res **51**(3): 321-8.
- Goldstein, M., Rennert, H., Bar-Shira, A., Burstein, Y., Yaron, Y. and Orr-Urtreger, A. (2003). "Combined cytogenetic and array-based comparative genomic hybridization analyses of Wilms tumors: amplification and overexpression of the multidrug resistance associated protein 1 gene (MRP1) in a metachronous tumor." Cancer Genet Cytogenet **141**(2): 120-7.
- Gonzalez-Sancho, J. M., Aguilera, O., Garcia, J. M., Pendas-Franco, N., Pena, C., Cal, S., Garcia de Herreros, A., Bonilla, F. and Munoz, A. (2005). "The Wnt antagonist DICKKOPF-1 gene is a downstream target of beta-catenin/TCF and is downregulated in human colon cancer." Oncogene **24**(6): 1098-103.
- Graf, N. and Reinhard, H. (2003). "[Wilms tumors. Diagnosis and therapy]." Urologe A **42**(3): W391-407; quiz W408-9.
- Graf, N., Semler, O. and Reinhard, H. (2004). "[Prognosis of Wilm's tumor in the course of the SIOP trials and studies]." Urologe A **43**(4): 421-8.
- Grundy, P., Telzerow, P., Moksness, J. and Breslow, N. E. (1996). "Clinicopathologic correlates of loss of heterozygosity in Wilm's tumor: a preliminary analysis." Med Pediatr Oncol **27**(5): 429-33.
- Grundy, P. E., Breslow, N. E., Li, S., Perlman, E., Beckwith, J. B., Ritchey, M. L., Shamberger, R. C., Haase, G. M., D'Angio, G. J., Donaldson, M., Coppes, M. J., Malogolowkin, M., Shearer, P., Thomas, P. R., Macklis, R., Tomlinson, G., Huff, V. and Green, D. M. (2005). "Loss of heterozygosity for chromosomes 1p and 16q is an adverse prognostic factor in favorable-histology Wilms tumor: a report from the National Wilms Tumor Study Group." J Clin Oncol **23**(29): 7312-21.

- Grundy, P. E., Telzerow, P. E., Breslow, N., Moksness, J., Huff, V. and Paterson, M. C. (1994). "Loss of heterozygosity for chromosomes 16q and 1p in Wilms' tumors predicts an adverse outcome." Cancer Res **54**(9): 2331-3.
- Han, M., Rivera, M. N., Batten, J. M., Haber, D. A., Cin, P. D. and Iafrate, A. J. (2007). "Wilms' tumor with an apparently balanced translocation t(X;18) resulting in deletion of the WTX gene." Genes Chromosomes Cancer **46**(10): 909-13.
- Hing, S., Lu, Y. J., Summersgill, B., King-Underwood, L., Nicholson, J., Grundy, P., Grundy, R., Gessler, M., Shipley, J. and Pritchard-Jones, K. (2001). "Gain of 1q is associated with adverse outcome in favorable histology Wilms' tumors." Am J Pathol **158**(2): 393-8.
- Huang, R. P., Fan, Y., de Belle, I., Niemeyer, C., Gottardis, M. M., Mercola, D. and Adamson, E. D. (1997). "Decreased Egr-1 expression in human, mouse and rat mammary cells and tissues correlates with tumor formation." Int J Cancer **72**(1): 102-9.
- Huff, V. (1998). "Wilms tumor genetics." Am J Med Genet **79**(4): 260-7.
- Jones, C. and Pritchard-Jones, K. (2004). "MIB-1 and p27Kip1 expression in nephroblastoma." Clin Cancer Res **10**(22): 7785-6; author reply 7786.
- Kaatsch, P., Spix, C. and Michaelis, J. (ed. 2002). "Jahresbericht 2000 des Deutschen Kinderkrebsregisters." Deutsches Kinderkrebsregister.
- Klamt, B., Schulze, M., Thate, C., Mares, J., Goetz, P., Kodet, R., Scheulen, W., Weirich, A., Graf, N. and Gessler, M. (1998). "Allele loss in Wilms tumors of chromosome arms 11q, 16q, and 22q correlate with clinicopathological parameters." Genes Chromosomes Cancer **22**(4): 287-94.
- Knudson, A. G., Jr. and Strong, L. C. (1972). "Mutation and cancer: a model for Wilms' tumor of the kidney." J Natl Cancer Inst **48**(2): 313-24.
- Koesters, R., Ridder, R., Kopp-Schneider, A., Betts, D., Adams, V., Niggli, F., Briner, J. and 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**(16): 3880-2.
- Lee, A. Y., He, B., You, L., Xu, Z., Mazieres, J., Reguart, N., Mikami, I., Batra, S. and Jablons, D. M. (2004). "Dickkopf-1 antagonizes Wnt signaling independent of beta-catenin in human mesothelioma." Biochem Biophys Res Commun **323**(4): 1246-50.
- Lee, S. B. and Haber, D. A. (2001). "Wilms tumor and the WT1 gene." Exp Cell Res **264**(1): 74-99.
- Lobbert, R. W., Klemm, G., Gruttner, H. P., Harms, D., Winterpacht, A. and Zabel, B. U. (1998). "Novel WT1 mutation, 11p LOH, and t(7;12) (p22;q22) chromosomal

- translocation identified in a Wilms' tumor case." Genes Chromosomes Cancer **21**(4): 347-50.
- Maiti, S., Alam, R., Amos, C. I. and Huff, V. (2000). "Frequent association of beta-catenin and WT1 mutations in Wilms tumors." Cancer Res **60**(22): 6288-92.
- Mathon, N. F. and Lloyd, A. C. (2001). "Cell senescence and cancer." Nat Rev Cancer **1**(3): 203-13.
- Maw, M. A., Grundy, P. E., Millow, L. J., Eccles, M. R., Dunn, R. S., Smith, P. J., Feinberg, A. P., Law, D. J., Paterson, M. C., Telzerow, P. E., Callen, D. F., Thompson, A. D., Richard, R. I. and Reeve, A. E. (1992). "A third Wilms' tumor locus on chromosome 16q." Cancer Res **52**(11): 3094-8.
- Miozzo, M., Perotti, D., Minoletti, F., Mondini, P., Pilotti, S., Luksch, R., Fossati-Bellani, F., Pierotti, M. A., Sozzi, G. and Radice, P. (1996). "Mapping of a putative tumor suppressor locus to proximal 7p in Wilms tumors." Genomics **37**(3): 310-5.
- Obad, S., Brunnstrom, H., Vallon-Christersson, J., Borg, A., Drott, K. and Gullberg, U. (2004). "Staf50 is a novel p53 target gene conferring reduced clonogenic growth of leukemic U-937 cells." Oncogene **23**(23): 4050-9.
- Perk, J., Iavarone, A. and Benezra, R. (2005). "Id family of helix-loop-helix proteins in cancer." Nat Rev Cancer **5**(8): 603-14.
- Radice, P., Perotti, D., De Benedetti, V., Mondini, P., Radice, M. T., Pilotti, S., Luksch, R., Fossati Bellani, F. and Pierotti, M. A. (1995). "Allelotyping in Wilms tumors identifies a putative third tumor suppressor gene on chromosome 11." Genomics **27**(3): 497-501.
- Ravenel, J. D., Broman, K. W., Perlman, E. J., Niemitz, E. L., Jayawardena, T. M., Bell, D. W., Haber, D. A., Uejima, H. and Feinberg, A. P. (2001). "Loss of imprinting of insulin-like growth factor-II (IGF2) gene in distinguishing specific biologic subtypes of Wilms tumor." J Natl Cancer Inst **93**(22): 1698-703.
- Reeve, A. E., Sih, S. A., Raizis, A. M. and Feinberg, A. P. (1989). "Loss of allelic heterozygosity at a second locus on chromosome 11 in sporadic Wilms' tumor cells." Mol Cell Biol **9**(4): 1799-803.
- Rivera, M. N., Kim, W. J., Wells, J., Driscoll, D. R., Brannigan, B. W., Han, M., Kim, J. C., Feinberg, A. P., Gerald, W. L., Vargas, S. O., Chin, L., Iafrate, A. J., Bell, D. W. and Haber, D. A. (2007). "An X chromosome gene, WTX, is commonly inactivated in Wilms tumor." Science **315**(5812): 642-5.
- Robertson, N., Potter, C. and Harris, A. L. (2004). "Role of carbonic anhydrase IX in human tumor cell growth, survival, and invasion." Cancer Res **64**(17): 6160-5.
- Ruteshouser, E. C., Hendrickson, B. W., Colella, S., Krahe, R., Pinto, L. and Huff, V. (2005). "Genome-wide loss of heterozygosity analysis of WT1-wild-type and WT1-mutant Wilms tumors." Genes Chromosomes Cancer **43**(2): 172-80.

- Safford, S. D., Goyeau, D., Freemerman, A. J., Bentley, R., Everett, M. L., Grundy, P. E. and Skinner, M. A. (2003). "Fine mapping of Wilms' tumors with 16q loss of heterozygosity localizes the putative tumor suppressor gene to a region of 6.7 megabases." Ann Surg Oncol **10**(2): 136-43.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989). "Molecular Cloning, A Laboratory Manual." Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schmitt, C. A. (2003). "Senescence, apoptosis and therapy--cutting the lifelines of cancer." Nat Rev Cancer **3**(4): 286-95.
- Sikder, H. A., Devlin, M. K., Dunlap, S., Ryu, B. and Alani, R. M. (2003). "Id proteins in cell growth and tumorigenesis." Cancer Cell **3**(6): 525-30.
- Smith, A. C., Choufani, S., Ferreira, J. C. and Weksberg, R. (2007). "Growth regulation, imprinted genes, and chromosome 11p15.5." Pediatr Res **61**(5 Pt 2): 43R-47R.
- Stegmeier, F., Hu, G., Rickles, R. J., Hannon, G. J. and Elledge, S. J. (2005). "A lentiviral microRNA-based system for single-copy polymerase II-regulated RNA interference in mammalian cells." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(37): 13212-7.
- Stewart, S. A. and Weinberg, R. A. (2002). "Senescence: does it all happen at the ends?" Oncogene **21**(4): 627-30.
- Sun, G. W., Shook, T. L. and Kay, G. L. (1996). "Inappropriate use of bivariable analysis to screen risk factors for use in multivariable analysis." Journal of Clinical Epidemiology **49**: 907-916.
- Takahashi, M., Yang, X. J., Lavery, T. T., Furge, K. A., Williams, B. O., Tretiakova, M., Montag, A., Vogelzang, N. J., Re, G. G., Garvin, A. J., Soderhall, S., Kagawa, S., Hazel-Martin, D., Nordenskjold, A. and Teh, B. T. (2002). "Gene expression profiling of favorable histology Wilms tumors and its correlation with clinical features." Cancer Res **62**(22): 6598-605.
- Tamimi, Y., Ziebart, K., Desaulniers, N., Dietrich, K. and Grundy, P. (2007). "Identification of a minimal region of loss on the short arm of chromosome 1 in Wilms tumor." Genes Chromosomes Cancer **46**(4): 327-35.
- Udtha, M., Lee, S. J., Alam, R., Coombes, K. and 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**(24): 3821-6.
- Vujanic, G. M., Sandstedt, B., Harms, D., Kelsey, A., Leuschner, I. and de Kraker, J. (2002). "Revised International Society of Paediatric Oncology (SIOP) working classification of renal tumors of childhood." Med Pediatr Oncol **38**(2): 79-82.
- Watanabe, N., Nakadate, H., Haruta, M., Sugawara, W., Sasaki, F., Tsunematsu, Y., Kikuta, A., Fukuzawa, M., Okita, H., Hata, J., Soejima, H. and Kaneko, Y. (2006). "Association of 11q loss, trisomy 12, and possible 16q loss with loss of imprinting

- of insulin-like growth factor-II in Wilms tumor." Genes Chromosomes Cancer **45**(6): 592-601.
- Weirich, A., Ludwig, R., Graf, N., Abel, U., Leuschner, I., Vujanic, G. M., Mehls, O., Boos, J., Beck, J., Royer-Pokora, B. and Voute, P. A. (2004). "Survival in nephroblastoma treated according to the trial and study SIOP-9/GPOH with respect to relapse and morbidity." Ann Oncol **15**(5): 808-20.
- Wirhth, O., Waha, A., Weggen, S., Schirmacher, P., Kuhne, T., Goodyer, C. G., Albrecht, S., Von Schweinitz, D. and Pietsch, T. (2003). "Overexpression of human Dickkopf-1, an antagonist of wingless/WNT signaling, in human hepatoblastomas and Wilms' tumors." Lab Invest **83**(3): 429-34.
- Wyllie, A. H., Kerr, J. F. and Currie, A. R. (1980). "Cell death: the significance of apoptosis." Int Rev Cytol **68**: 251-306.
- Xu, Y. Q., Grundy, P. and Polychronakos, C. (1997). "Aberrant imprinting of the insulin-like growth factor II receptor gene in Wilms' tumor." Oncogene **14**(9): 1041-6.
- Yuan, E., Li, C. M., Yamashiro, D. J., Kandel, J., Thaker, H., Murty, V. V. and Tycko, B. (2005). "Genomic profiling maps loss of heterozygosity and defines the timing and stage dependence of epigenetic and genetic events in Wilms' tumors." Mol Cancer Res **3**(9): 493-502.
- Zhu, J. and Hastie, T. (2004). Biostatistics **5**: 427-443.
- Zirn, B., Hartmann, O., Samans, B., Krause, M., Wittmann, S., Mertens, F., Graf, N., Eilers, M. and Gessler, M. (2006). "Expression profiling of Wilms tumors reveals new candidate genes for different clinical parameters." Int J Cancer **118**(8): 1954-62.
- Zirn, B., Samans, B., Spangenberg, C., Graf, N., Eilers, M. and Gessler, M. (2005). "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.
- Zirn, B., Samans, B., Wittmann, S., Pietsch, T., Leuschner, I., Graf, N. and Gessler, M. (2006). "Target genes of the WNT/beta-catenin pathway in Wilms tumors." Genes Chromosomes Cancer **45**(6): 565-74.

7. Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumimpersulfat
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	„Bovine serum albumine“ (Albumin aus Rinderserum)
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cm	Zentimeter
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i> , Bakterienstamm
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	„Enhanced green fluorescent protein“ (verstärkt grün fluoreszierendes Protein)
EtBr	Ethidiumbromid
Exo	Exonuklease I
FACS	“Fluorescence activated cell sorting” (Zellsortierung auf Grund von Fluoreszenz)
FCS	„Fetal calf serum“ (Fötales Kälberserum)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Gramm
GFP	„green fluorescent protein“ (Grün fluoreszierendes Protein)
H ₂ O	Wasser
HBSS	„Hank's balanced salt solution“
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
IRES	„Internal ribosomal entry site“ (Interne Ribosomen-Eintrittsstelle)
kb	Kilobasen

kD	Kilodalton
l	Liter
LB	LB-Medium
LOH	„Loss of heterozygosity“ (Verlust der Heterozygotie)
LOI	“Loss of imprinting” (Verlust der genomischen Prägung)
μ	Mikro (=10 ⁻⁶)
M	Molar
mA	Milliampere
min	Minuten
MOPS	3 (N-Morpholino)-Propansulfonsäure
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NaCl	Natriumchlorid, Kochsalz
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	”Phosphate buffered saline”
PCR	„polymerase chain reaction“ (Polymerase Kettenreaktion)
PEI	Polyethylenimin
pH	pH-Wert
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	„rounds per minute“ (Umdrehungen pro Minute)
RPMI	„Roswell Park Memorial Institute“, Zellkulturmedium
rRNA	ribosomale RNA
RT-PCR	Reverse Transkription der RNA in cDNA mit anschließender PCR
SAP	„Shrimp Alkaline Phosphatase“
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunden
shRNA	„short hairpin RNA“
Tab.	Tabelle
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, Trometamol
U	Unit, Einheit der Enzymaktivität
UV	Ultraviolett
V	Volt
WT	Wilms Tumor
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid

Publikationen und wissenschaftliche Beiträge

Publikationen

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

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

Zirn, B., Hartmann, O., Samans, B., Krause, M., Wittmann, S., Mertens, F., Graf, N., Eilers, M., Gessler, M. (2006). "Expression profiling of Wilms tumors reveals new candidate genes for different clinical parameters." Int J Cancer **118**, 1954-62.

Benetkiewicz, M., de Stahl, T. D., Gordor, A., Pfeifer, S., Wittmann, S., Gessler, M., Dumanski, J. P. (2006). "Identification of limited regions of genetic aberrations in patients affected with Wilms' tumor using a tiling-path chromosome 22 array." Int J Cancer **119**, 571-8.

Zirn, B., Samans, B., Wittmann, S., Pietsch, T., Leuschner, I., Graf, N., Gessler, M. (2006). "Target genes of the WNT/beta-catenin pathway in Wilms tumors." Genes Chromosomes Cancer **45**, 565-74.

Wittmann, S., Zirn, B., Alkassar, M., Ambros, P., Graf, N., Gessler, M. (2007). "Loss of 11q and 16q in Wilms tumors is associated with anaplasia, tumor recurrence, and poor prognosis." Genes Chromosomes Cancer **46**, 163-70.

Wittmann, S., Wunder, C., Zirn, B., Furtwangler, R., Graf, N., Gessler, M. (2007). "Expression Analysis of 40 Genes Correlated with Clinical Parameters in Wilms Tumors Reveals New Predictive Markers." Clin Cancer Res, submitted.

Poster

Wittmann, S., Zirn, B., Klamt, B., Graf, N., Gessler, M. (2004). "Wilms tumor molecular genetics: Correlation of clinical parameters with LOH and candidate gene expression." Deutscher Krebskongress, Berlin.

Wittmann, S., Zirn, B., Klamt, B., Graf, N., Gessler, M. (2005). "Wilms tumor molecular genetics: Correlation of clinical parameters with LOH and candidate gene expression." 13th AEK/AIO Cancer Congress, Würzburg. Onkologie 28 Suppl 2:1-70.

Wittmann, S., Zirn, B., Klamt, B., Graf, N., Gessler, M. (2006). "Expression analysis of 41 genes identifies a number of novel prognostic markers in Wilms tumors." 27. Deutscher Krebskongress, Berlin.

Wittmann, S., Wunder, C., Zirn, B., Graf, N., Gessler, M. (2006). "Novel prognostic markers for outcome in Wilms tumors identified by quantitative RT-PCR." EACR19 Meeting, Budapest, Ungarn.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Geburtsdatum: 23.08.1978
Geburtsort: Hammelburg
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

1984-1988 Grundschule Hammelburg
1988-1997 Frobenius-Gymnasium Hammelburg
Mai 1997 Abitur

Akademische Ausbildung

1997-2002 Studium der Biologie, Bayerische Maximilians-Universität
Würzburg
März/April 2000 Tierphysiologie-Praktikum in Spanien
Sep. 2001 – Okt. 2001 Diplomprüfung
Hauptfach: Genetik
Nebenfächer: Tierphysiologie, Pflanzenphysiologie
Nov. 2001 - Sep. 2002 Diplomarbeit am Lehrstuhl für Genetik und Neurobiologie in
Würzburg, „Untersuchungen zur *in-vivo* Lokalisation und
Funktion des *sap47*-Gens von *Drosophila melanogaster*“
Seit Feb. 2003 Promotion in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Manfred Gessler
am Lehrstuhl Physiologische Chemie I, Biozentrum,
Universität Würzburg
„LOH- und Expressionsanalysen zur Identifikation neuer
prognostischer Marker in Wilms Tumoren“

Erklärung

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Dissertation „LOH- und Expressionsanalysen zur Identifikation neuer prognostischer Marker in Wilms Tumoren“ selbstständig angefertigt und keine anderen als die hier angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

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

Ich habe zuvor keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den

Stefanie Wittmann

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich von Herzen bei all denen bedanken, die durch zahlreiche hilfreiche Ratschläge und aufbauende Worte entscheidend an der Entstehung dieser Arbeit beteiligt waren.

Besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Manfred Gessler, der mir ermöglichte, an einem so spannenden und vielseitigen, wenn auch manchmal schwierigen, Thema zu arbeiten. Vielen herzlichen Dank für jegliche Unterstützung bei auftauchenden Fragen und Problemen!

Des Weiteren möchte ich Prof. Dr. Ricardo Benavente und Dr. Patrick Adam für die Übernahme des Zweit- und Drittgutachtens und dem GK639 und der GSLS für die finanzielle Unterstützung, aber auch für die vielen weiteren nützlichen Dinge, die ich während der Zeit lernen durfte, danken.

Der AG Gessler möchte ich herzlich für die Anteilnahme und Hilfe bei meiner Doktorarbeit, sei es bei diversen Problemen oder auch kleinen Durchhängern, danken. Ihr habt mir doch so einige schwere Stunden erleichtert und mich wieder zum Lachen gebracht.

Besonderer Dank gilt:

- Rebecca, mit der ich so manches Schwätzchen über und um die Arbeit halten durfte, für die vielen Ratschläge und Hilfestellungen und oft auch aufbauenden Worte. Natürlich auch für die vielen netten gemeinsamen Ausflüge und Reisen per Rad, Rollerblades, Auto und Flugzeug. Es hat immer sehr viel Spaß gemacht.
- Holger, der so manches Mal zwischen Rebecca (bzw. Traudel) und mir saß und unser Geschnatter ertragen musste und uns dafür mit seinem debilen Grinsen belohnte ;). Dir auch vielen Dank für das offene Ohr bei Problemen und dass du immer versucht hast, einem zu helfen...trotz Besserwisserei ;)
- Traudel, die eine würdige Nachfolgerin für Rebecca wurde und mit der es nie langweilig geworden ist. Danke auch für deine vielen aufbauenden Worte, wenn wieder mal alles schief lief, gerade zu Ende dieser Arbeit, und den Spaß, den man mit dir haben konnte.
- Birgit nachträglich für die gute Zusammenarbeit am Wilms Tumorprojekt und für so manche Diskussion über die Tücken dieser Tumoren.
- Sabrina und Anja für die Hilfestellungen beim Klonieren und Sequenzieren. Manche haben eben doch ein goldenes Händchen ;)

Meiner Familie möchte ich recht herzlich für die allzeit selbstverständliche Unterstützung danken. Danke, dass ihr mich das habt machen lassen, obwohl ihr euch damals doch einen „ordentlichen“ Beruf für mich gewünscht habt.

Danke auch meinen Freunden, die mich all die Jahre begleitet haben und immer ein offenes Ohr für mich und meine Probleme hatten, aber auch für jeden Spaß zu haben waren.

Bei Tim kann ich mich gar nicht genug dafür bedanken, dass er in letzter Zeit so manche Stimmungsschwankungen ertragen hat und mich zudem immer wieder aufgebaut und ermutigt hat, nicht aufzugeben. Danke, dass du immer für mich da bist, ich mit dir über Alles reden kann und dass du mich immer wieder zum Lachen bringst.

