



# **WTX-Mutationscreen und funktionelle Analyse des Retinsäure-Signalwegs in Wilms Tumoren**

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

vorgelegt von  
Jenny Wegert  
aus Frankenberg (Sa.)

Würzburg 2010

Eingereicht am: 26. August 2010

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: .....

Gutachter: Prof. Dr. Manfred Gessler

Gutachter: Prof. Dr. Dr. Manfred Scharl

Tag des Promotionskolloquiums: .....

Doktorurkunde ausgehändigt am: .....

***Die Tragödie der Wissenschaft –  
das Erschlagen einer schönen Hypothese durch eine häßliche Tatsache***

Thomas Huxley

---

<b>Summary</b>	<b>1</b>
<b>Zusammenfassung</b>	<b>3</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>5</b>
1.1. Klinik des Wilms Tumors	5
1.1.1. Epidemiologie	5
1.1.2. Symptome und Diagnostik	5
1.1.3. Histologie und Klassifikation	6
1.1.4. Therapie	7
1.1.5. Prognose	9
1.2. Genetische Ursachen	9
1.2.1. Wilms Tumor Suppressorgen 1 (WT1)	10
1.2.2. $\beta$ -Catenin	12
1.2.3. Wilms Tumor Gen auf dem X-Chromosom (WTX)	13
1.2.4. Chromosomale Veränderungen	14
1.3. Modellsysteme des Wilms Tumors	15
1.4. Retinsäure in der Tumorthherapie	16
<b>2. Ziele der Arbeit</b>	<b>18</b>
<b>3. Material &amp; Methoden</b>	<b>19</b>
3.1. Präparation von DNA und RNA	19
3.1.1. Isolierung von DNA und RNA aus Tumor- und Nierengewebe	19
3.1.2. Isolierung von DNA aus Blut	19
3.1.3. Isolierung von DNA und RNA aus Zellen	19
3.1.4. Lasergestützte Mikrodisektion	20
3.2. PCR-Analysen	20
3.2.1. Agarose-Gelelektrophorese	20
3.2.2. PCR	21
3.2.3. Untersuchung von WTX-Deletionen	21
3.3. LOH-Analyse mit ALFexpress	22
3.4. Sequenzierung	23
3.5. Realtime-RT-PCR	25
3.5.1. cDNA-Synthese	25
3.5.2. Realtime-RT-PCR	25

---

3.6. Zellkultur	28
3.6.1. Verwendete Zelllinien	28
3.6.2. Kultivierung	28
3.6.3. Etablierung primärer Wilms Tumor-Kulturen	28
3.6.4. Immunhistochemie (IHC)	29
3.6.5. Retinsäurebehandlung	29
3.6.6. Phalloidin-Färbung	30
3.6.7. Seneszenz-assoziierte $\beta$ -Gal-Färbung (SA- $\beta$ -Gal)	30
3.7. Proteinanalysen	31
3.7.1. Proteinisolierung	31
3.7.2. SDS-PAGE	31
3.7.3. Western-Blot	32
3.8. Microarray-Analyse	33
3.9. Statistik	33
<b>4. Ergebnisse</b>	<b>34</b>
4.1. WTX-Veränderungen in Wilms Tumoren	34
4.1.1. WTX-Deletionen	34
4.1.2. Größe der deletierten Region	35
4.1.3. WTX-Expressionsanalyse	36
4.1.4. Punktmutationen im WTX-Gen	38
4.1.5. Heterogenität von WTX-Mutationen	39
4.1.6. WTX-, CTNNB1- und WT1-Mutationen	42
4.1.7. Korrelation von WTX-Veränderungen und klinischen Parametern	43
4.2. Etablierung und Charakterisierung primärer Wilms Tumor-Kulturen	45
4.2.1. Kultivierung primärer Zellen	45
4.2.2. Molekulargenetische Charakterisierung der Primärkulturen	45
4.2.3. Morphologie primärer WT-Zellen	46
4.2.4. Wachstumseigenschaften der Primärkulturen	49
4.2.5. Immunhistochemische Charakterisierung	50
4.3. Retinsäure-Signalweg in Wilms Tumoren	53
4.4. Einfluss von Retinsäurebehandlung auf primäre Wilms Tumor-Kulturen	56
4.4.1. Genregulation durch Retinoidbehandlung	57

---

4.4.2.	Zellproliferation unter kurzzeitiger Retinsäurebehandlung	59
4.4.3.	Morphologische Veränderungen unter Retinsäurebehandlung	60
4.4.4.	RA-induzierte Seneszenz	63
4.4.5.	Apoptose-Induktion durch Fenretinid	63
4.4.6.	Langzeitbehandlung mit Fenretinid	65
4.4.7.	Langfristige Effekte einer ATRA-Behandlung	66
4.4.8.	Retinoidbehandlung von Nicht-WT-Zellen	68
4.4.9.	Microarray-Analyse von ATRA-induzierter Differenzierung	70
4.4.10.	Validierung der Microarray-Daten	73
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>75</b>
5.1.	Analyse von WTX-Veränderungen in Wilms Tumoren	75
5.2.	Etablierung primärer Wilms Tumor-Kulturen	79
5.3.	Retinsäure-Signalweg in Wilms Tumoren	83
5.4.	Einfluss von Retinsäurebehandlung auf primäre Wilms Tumor-Kulturen	86
<b>6.</b>	<b>Literatur</b>	<b>92</b>
<b>7.</b>	<b>Abkürzungen</b>	<b>100</b>

## Summary

Wilms tumor (WT) – or nephroblastoma – is one of the most common solid tumors in childhood. It arises from embryonal blastema and most frequently presents as a unilateral and sporadic tumor. Mutations in WT1 and CTNNB1 are well established as causal alterations in about 10-15 % of cases. Recently, WTX (Wilms tumor gene on the X-chromosome), a gene implicated in WNT signaling, has been identified as a third WT gene, but for the majority of nephroblastomas the genetic etiology is still unclear.

Published WTX mutation rates in Wilms tumors are still based on smaller cohorts and differ significantly. Therefore, the WTX, CTNNB1 and WT1 mutation state was determined in a large set of 429 Wilms tumors. Genomic WTX alterations were identified in 17 % of WT, equally distributed between males and females. Analysis of 104 WT samples for WTX point mutations revealed a frequency of only 2 %. An additional 11,5 % of tumor samples lacked expression of WTX mRNA. These WTX alterations can occur in parallel to WT1 or CTNNB1 mutations. Incomplete deletion of WTX in several cases suggested heterogeneity of WTX alterations in tumors and this was corroborated by analysis of different regions of such tumors. In cases with heterozygous point mutations or LOH, separate tumor fragments or microdissected regions with different histology were analyzed. Despite complete allele losses at chromosome 11 varying ratios of WTX mutation were detected. This suggests that WTX alteration is not an essential and early mutation needed to drive tumorigenesis, but rather a late event that may affect only a fraction of cells with unclear clinical relevance. This hypothesis is supported by the fact that there is no significant correlation between WTX deletion status or expression level and clinical parameters suggesting that WTX mutations apparently have little direct impact on tumor behavior and presentation.

As there is no *in vitro* model for nephroblastoma that could be used to investigate genes playing a role in development and progression of WT or to test new treatment strategies, primary cultures were generated from fresh tumor tissue. Cultures from tumor samples of 12 patients with different genetic alterations could be validated as tumor derived cells. Two different cell types could be distinguished by immunohistochemistry and cell morphology: large round, slowly growing cells with epithelial characteristics and fibroblast-like cells that are less differentiated and some of which could be kept in culture for many passages before getting senescent. In this way a set of primary WT-cells could be established that is suitable

for *in vitro* approaches to study mechanisms of nephroblastoma development or to test new therapy strategies.

Prior microarray analyses suggested a deregulation of the retinoic acid (RA) pathway in advanced Wilms tumors. This should be validated in a large independent tumor set of 163 WT by realtime-RT-PCR. Deregulation of RA signaling and overexpression of NMYC was found in high risk tumors as opposed to tumors with low/intermediate risk and suggested a beneficial impact of retinoic acid on advanced nephroblastoma. To investigate whether retinoids could be employed as a novel therapeutic agent in WT primary WT-cells were treated with all-trans-RA (ATRA), 9cisRA, the synthetic retinoid fenretinide and combinations of retinoids and the HDAC inhibitor SAHA. Expression of genes deregulated in high risk tumors were analyzed and showed opposite changes upon treatment suggesting a positive effect of retinoids. For six of seven primary cultures tested cell growth was reduced upon retinoid administration. No additional synergistic effect could be observed for the combination of retinoids with the HDAC inhibitor SAHA. While fenretinide induced apoptosis in several cultures tested, ATRA and 9cisRA caused morphological changes suggesting differentiation upon treatment. Microarray analysis of ATRA treated WT-cells revealed differential expression of many genes involved in the formation of the extracellular matrix and osteogenic, neuronal or muscle differentiation processes. These findings provide further evidence of a potential utility of retinoids in Wilms tumor treatment.

## Zusammenfassung

Der Wilms Tumor (WT) – auch Nephroblastom genannt – ist einer der häufigsten bösartigen Tumoren im Kindesalter. Er entsteht aus embryonalem undifferenziertem Nierengewebe und tritt meist als unilateraler und sporadischer Tumor auf. In 10-15 % der Wilms Tumoren finden sich WT1- und/oder CTNNB1-Mutationen. Während diese schon länger als genetische Ursachen des Nephroblastoms bekannt sind, wurde erst kürzlich WTX als drittes Gen beschrieben, welches eine Rolle in der Tumorentstehung spielt. Für einen Großteil der WT ist die genetische Ursache jedoch unklar.

Da die bisher publizierten WTX-Mutationsraten auf Untersuchungen kleiner WT-Gruppen basieren und sich stark unterscheiden, sollten in dieser Arbeit WTX-, CTNNB1- und WT1-Mutationen in einem großen Set von 429 WT bestimmt werden. Verluste genetischen Materials in der WTX-Region traten in 17 % der Fälle auf und waren zwischen den Geschlechtern gleich verteilt. Die Sequenzierung von 104 WT-Proben zeigte, dass nur 2 % von WTX-Punktmutationen betroffen sind. In weiteren 11,5 % der Proben konnte keine WTX-Expression nachgewiesen werden. Die WTX-Veränderungen traten zum Teil gemeinsam mit WT1- und/oder CTNNB1-Mutationen auf. Die unvollständige WTX-Deletion in einigen WT legte die Vermutung nahe, dass innerhalb eines Tumors eine Heterogenität in Bezug auf den WTX-Status möglich ist. Dieser Verdacht konnte durch die detaillierte Untersuchung verschiedener Regionen solcher Tumoren erhärtet werden: Hierzu wurden histologisch unterschiedliche Bereiche durch Mikrodisektion isoliert und auf den Anteil einer WTX-Mutation bzw. eines WTX-LOH hin untersucht. Obwohl alle Regionen des jeweiligen Tumors einen kompletten LOH auf Chromosom 11 aufwiesen, waren die WTX-Veränderungen unterschiedlich stark ausgeprägt. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass WTX-Veränderungen keine notwendigen und frühen Ereignisse in der Tumorentstehung sind, sondern erst später auftreten und nur einen Teil der Tumorzellen betreffen können. Die Vermutung, dass WTX-Mutationen keinen direkten Einfluss auf die Tumorentwicklung und -prognose haben, wird durch das Fehlen eines signifikanten Zusammenhangs zwischen WTX-Deletion bzw. WTX-Expression und den klinischen Eigenschaften der WT gestützt.

Um die Rolle von Genen, die potentiell an der Entstehung und Entwicklung des Nephroblastoms beteiligt sind, zu untersuchen oder mögliche neue Therapiestrategien zu überprüfen, sind *in vitro*-Modelle nötig. Da ein solches für Wilms Tumoren leider nicht

etabliert ist, wurden Primärkulturen aus verschiedenen WT-Proben angelegt. Kulturen aus Tumorgewebe von 12 Patienten mit unterschiedlichen genetischen Veränderungen konnten als echte Tumorzellen validiert werden. Zwei Zelltypen ließen sich morphologisch und immunhistochemisch unterscheiden: Zum einen große runde, langsam wachsende Zellen mit Epithelcharakter und zum anderen fibroblastenähnliche Zellen, welche weniger differenziert waren und häufig für viele Passagen kultiviert werden konnten, bevor sie in Seneszenz übergingen. Somit wurde ein Set verschiedener WT-Primärkulturen etabliert, welches nun für *in vitro*-Experimente zur Untersuchung grundlegender Mechanismen der WT-Entstehung oder zum Test neuer Therapieansätze eingesetzt werden kann.

Frühere Microarray-Analysen deuteten auf eine Deregulation des Retinsäure (RA)-Signalwegs in fortgeschrittenen Wilms Tumoren hin. Diese Ergebnisse sollten in einem großen unabhängigen Proben-Set von 163 WT mittels Realtime-RT-PCR validiert werden. Eine Deregulation des RA-Signalwegs und die Überexpression von NMYC wurden für Tumoren der Hochrisikogruppe im Vergleich zu Tumoren mit geringem/mittlerem Risiko nachgewiesen. So stellte sich die Frage, ob Patienten mit fortgeschrittenem WT von einem Retinsäure-Einsatz in der Therapie profitieren könnten. Um dies zu beantworten, wurde der Effekt von verschiedenen Retinoiden auf WT-Primärkulturen untersucht. Die WT-Zellen wurden mit all-trans RA (ATRA), 9cisRA, dem synthetischen Retinoid Fenretinid (4HPR) und Kombinationen von ATRA bzw. 4HPR und einem HDAC-Inhibitor (SAHA) behandelt. Gene, welche in Hochrisiko-WT differenziell reguliert waren, wurden untersucht und zeigten nach RA-Behandlung eine entgegengesetzte Expression. In sechs der sieben verwendeten Primärkulturen wurde eine RA-vermittelte Proliferationsreduktion nachgewiesen. Für die Kombinationen von Retinoiden mit SAHA wurden keine synergistischen Effekte beobachtet. Während Fenretinid in den meisten Kulturen Apoptose induzierte, verursachten ATRA und 9cisRA morphologische Veränderungen, welche auf Differenzierungsvorgänge hindeuteten. Eine Microarray-Analyse ATRA-behandelter WT-Zellen zeigte die differenzielle Regulation vieler Gene, welche eine Rolle in der Bildung der extrazellulären Matrix oder bei Differenzierungsvorgängen von Knochen-, Knorpel-, Nerven- oder Muskelgewebe spielen. Diese Befunde bieten einen weiteren Hinweis darauf, dass Retinoide für den Einsatz in der Therapie des Nephroblastoms geeignet sein könnten.

# 1. Einleitung

## 1.1. Klinik des Wilms Tumors

Der Wilms Tumor (WT) – auch bekannt als Nephroblastom – ist nach dem Pathologen und Chirurgen Max Wilms (1867–1918) benannt. Dieser beschrieb 1899 in einer Abhandlung über „Die Mischgeschwülste der Niere“ die Entstehung kindlicher Nierentumoren aus Zellen des mittleren Keimblattes. Ähnlich wie bei der Embryonalentwicklung entstehen demnach verschiedene Gewebe aus undifferenzierten Keimzellen. Max Wilms fasste in dieser Arbeit als Erster morphologisch verschiedene kindliche Nierentumoren zusammen, deren Ursache in einer embryonalen Entwicklungsstörung zu sehen ist [Coppes-Zantinga 1999].

### 1.1.1. Epidemiologie

Der Wilms Tumor ist mit 85 % der häufigste Nierentumor bei Kindern mit einer Inzidenz von  $10/10^6$  in den USA und  $8/10^6$  in Deutschland, in Asien tritt er vergleichsweise seltener auf (ca.  $3/10^6$ ) [Breslow 1993]. In Deutschland gibt es jährlich ca. 100 Neuerkrankungen. Die Altersverteilung zeigt ein Maximum bei zwei bis drei Jahren. Meist treten Wilms Tumoren unilateral (90-95 %) und sporadisch (98-99 %) auf [Huff 1998]. In den seltenen Fällen eines beidseitigen Tumors (5-10 %) sind vorwiegend sehr junge Kinder betroffen, wobei bei bilateralem WT ein erhöhtes familiäres Erkrankungsrisiko besteht.

### 1.1.2. Symptome und Diagnostik

Wilms Tumoren verursachen in der Regel eher geringe Beschwerden und werden daher erst durch eine schmerzlose Oberbauchschwellung (ca. 60 %) oder in selteneren Fällen zufällig bei regulären Vorsorgeuntersuchungen (10 %) entdeckt. Das häufigste klinische Symptom ist eine Hämaturie (15 %) [Furtwängler 2005].

Die Diagnosestellung erfolgt durch bildgebende Verfahren, meist abdominelle Sonographie und Computertomographie oder Magnetresonanztomographie. Im Zusammenhang mit dem Alter des Kindes und einer referenzradiologischen Begutachtung ist meist eine zuverlässige Diagnose möglich, wobei differenzialdiagnostisch an ein Neuroblastom zu denken ist. Tumorspezifische Marker in Blut oder Urin sind bisher nicht bekannt. Eine Tumorbiopsie ist nur bei uneindeutiger Bildgebung bei Kindern unter sechs Monaten bzw. über 16 Jahren indiziert [Babyn 1995]. Eine sichere Diagnosestellung ist nötig, da in Europa nach dem SIOP-

Protokoll bei Patienten mit Wilms Tumor meist eine präoperative Chemotherapie durchgeführt wird und eine nichtindizierte Zytostatikatherapie zu vermeiden ist.

Wilms Tumoren treten zum Teil zusammen mit weiteren Fehlbildungen oder Syndromen auf. Mit 4-7 % am häufigsten sind dabei urogenitale Anomalien, die sowohl Nierenfehlbildungen (z. B. Doppelniere, Hufeisenniere, Nierendysplasie) als auch Genitalfehlbildungen (z. B. Hypospadie, Kryptorchismus, Hodenaplasie) umfassen können. WT treten gehäuft bei Kindern mit dem WAGR- (WT, Aniridie, **g**enitale Missbildung, **R**etardierung; 1-2 %), dem Beckwith-Wiedemann- (Hemihypertrophie, Omphalozele, Makroglossie; <1 %), dem Denys-Drash- (WT, Pseudohermaphroditismus, Glomerulopathie; 2 %) oder dem Perlman-Syndrom (WT, fetale Makrosomie, Mikrognathie, Kryptorchismus, Hypoglykämie) auf.

### 1.1.3. Histologie und Klassifikation

Wilms Tumoren entstehen aus embryonalem undifferenziertem Gewebe mit einer hohen mitotischen Aktivität. Tumorvorläufer können nephrogene Reste oder eine Nephroblastomatose sein. Sie enthalten metanephrisches Blastem, das zu verschiedenen Gewebetypen differenzieren kann. Entsprechend dieser Entwicklung können WT aus einer Vielzahl unterschiedlicher Zelltypen wie Epithel, Stroma oder Blastem bestehen. Sind alle

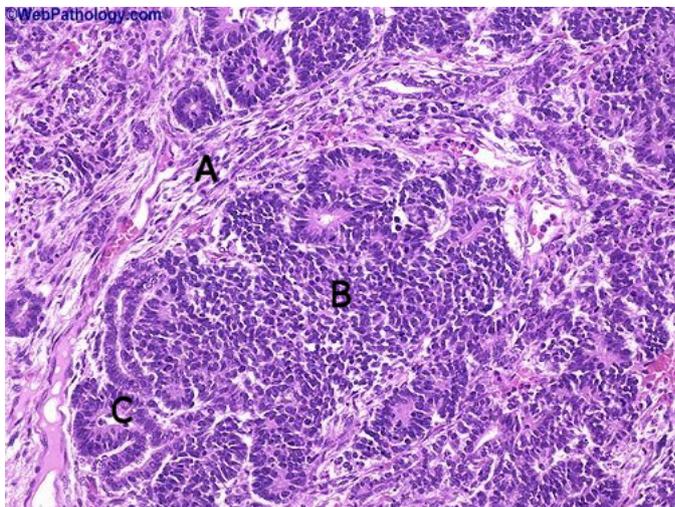


Abbildung 1: Histologie eines triphasischen Wilms Tumors mit Stroma- (A), Blastem- (B) und Epithelbereichen (C) ([www.webpathology.com](http://www.webpathology.com))

drei histologischen Typen in einem Tumor enthalten, spricht man von einem triphasischen Tumor oder einem Mischtyp (Abb. 1). Überwiegt einer der drei Gewebetypen deutlich (> 65 %), wird der Tumor entsprechend als epithel-, stroma- oder blastemreich bezeichnet. In einigen Fällen sind anaplastische Tumorregionen zu

finden.

Der histologische Subtyp eines Wilms Tumors ist von prognostischer Bedeutung. Je nach Histologie erfolgt eine Klassifikation als Tumor niedriger, intermediärer oder hoher Malignität [Vujanic 2002]. Für diese Einteilung ist es entscheidend, ob der Tumor in einer

primären Operation oder nach präoperativer Chemotherapie entfernt wurde, da die Chemotherapie Einfluss auf den histologischen Typ hat. Einen Überblick darüber gibt Tabelle 1.

**Tabelle 1: Einteilung der WT-Risikogruppen anhand des histologischen Subtyps, nach [Vujanic 2002]**

<b>Risikogruppe</b>	<b>präoperative Chemotherapie</b>	<b>primäre Operation</b>
niedrige Malignität	mesoblastisches Nephrom zystisch partiell differenziert komplett nekrotisch	mesoblastisches Nephrom zystisch partiell differenziert
intermediäre Malignität	epithelial stromareich Mischtyp regressiv fokale Anaplasie	epithelial stromareich blastemreich Mischtyp regressiv fokale Anaplasie
hohe Malignität	blastemreich diffuse Anaplasie	diffuse Anaplasie

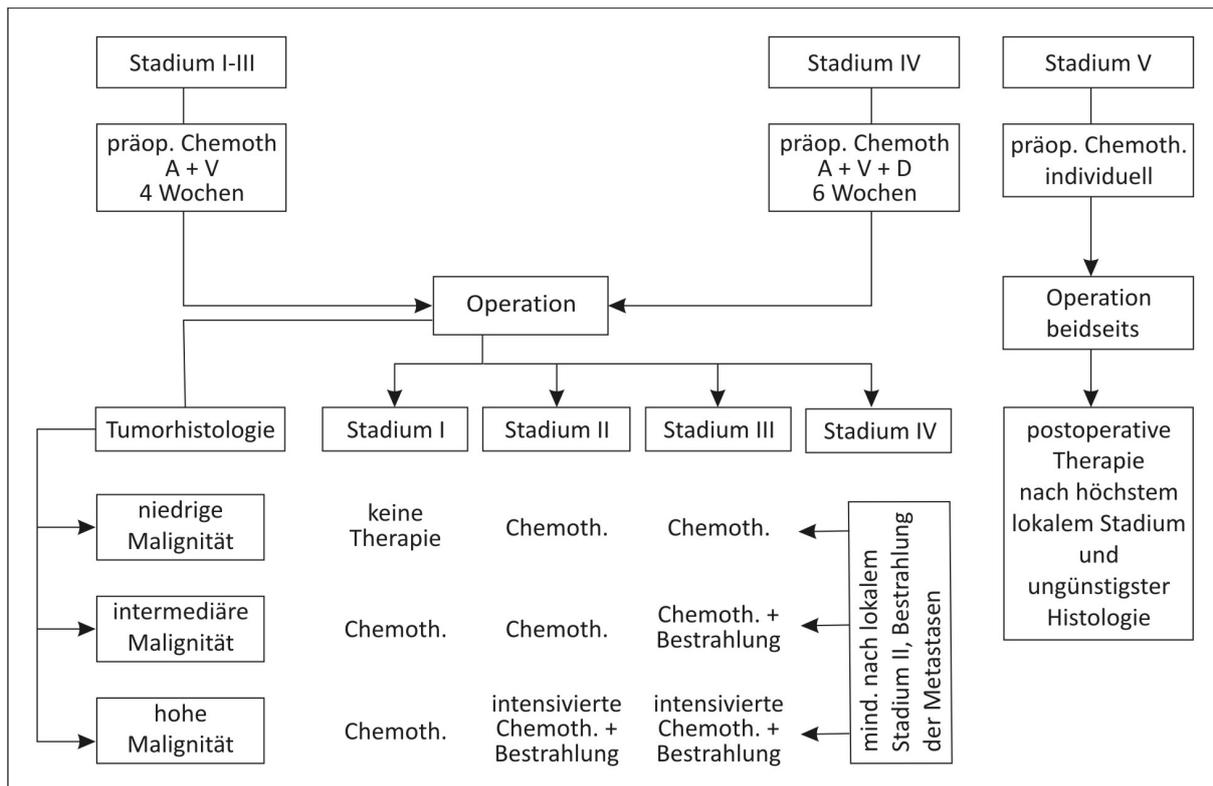
Neben dieser histologischen Typisierung (staging) wird eine operative Stadieneinteilung (grading) vorgenommen. Es werden je nach lokaler Ausbreitung des Tumors, Lymphknotenbefall und Metastasenstatus fünf Stadien unterschieden, die in Tabelle 2 zusammengefasst sind [Vujanic 2002].

**Tabelle 2: Stadieneinteilung**

<b>Stadium</b>	<b>Ausdehnung</b>
I	auf Niere beschränkt, intakte Tumorkapsel, vollständige Resektion
II	Überschreiten der Tumorkapsel, vollständige Resektion
III	unvollständige Tumorentfernung, Lymphknoten positiv, keine Fernmetastasen
IV	Fernmetastasen (Lunge, Leber, Knochen, Gehirn)
V	bilateraler WT

#### **1.1.4. Therapie**

Die Therapie erfolgt in Europa nach dem Protokoll der SIOP (Société Internationale d’Oncologie Pédiatrique) und besteht in der Regel aus kombinierter Chemotherapie, chirurgischer Entfernung des Tumors und gegebenenfalls Bestrahlung. Das Therapieschema, dargestellt in Abb. 2, ist von der Histologie und dem Stadium des Tumors abhängig.



**Abbildung 2: Therapieschema für das Nephroblastom nach SIOP-Protokoll, nach [Furtwängler 2008]**

A = Actinomycin, V = Vincristin, D = Doxorubicin

Kinder im Alter von sechs Monaten bis 16 Jahren erhalten zunächst eine vier- bis sechswöchige Chemotherapie, deren Vorteil in einer deutlichen Volumenreduktion des Tumors liegt [Graf 2003]. Dadurch sinkt zum einen das Risiko einer Tumorruptur während der Operation mit Gefahr der Aussaat von Tumorzellen, zum anderen steigt der Anteil der Patienten mit niedrigerem Tumorstadium. Bei einseitigem Wilms Tumor folgt die komplette operative Entfernung der betroffenen Niere, während bei bilateralem Tumor eine partielle Nephrektomie mit möglichst vollständiger Tumorsektion durchgeführt wird. Bei Wilms Tumoren mit niedriger oder intermediärer Malignität im Stadium I ist keine weitere Therapie erforderlich. Bei höheren Stadien folgt eine postoperative Chemo- und/oder Strahlentherapie, die je nach Stadium und Malignität festgelegt wird.

Bei Kindern, die jünger als sechs Monate oder älter als 16 Jahre sind, wird eine primäre Operation durchgeführt.

Im Gegensatz zum SIOP-Protokoll in Europa werden in den USA eine primäre Tumorsektion und im Anschluss eine Strahlen- und/oder Chemotherapie durchgeführt [Metzger 2005]. Dadurch lässt sich zwar eine nichtinduzierte (präoperative) Chemotherapie in den seltenen Fällen einer Fehldiagnose verhindern, aber in der Regel ist eine postoperative Radiotherapie notwendig. Ein zusätzliches Risiko besteht im großen

Tumorvolumen ohne vorangehende Chemotherapie, welches zu einer erhöhten OP-Komplikationsrate führt.

### **1.1.5. Prognose**

Die Prognose eines Patienten mit Wilms Tumor ist im Allgemeinen gut. Die Überlebensrate stieg durch verbesserte Operationsmethoden und eine risikoabhängige Behandlung mit Strahlen- und Chemotherapie auf über 90 %. Im Vergleich dazu lag sie zu Beginn des letzten Jahrhunderts bei nur 10 % [Sonn 2008]. Die Heilungsrate hängt jedoch stark von der Histologie und dem Stadium des Tumors ab. So haben Patienten mit hochmalignem, bilateralem oder metastasierendem WT eine rezidivfreie zweijährige Überlebensrate von unter 50 %.

In 10-15 % der Fälle entwickeln Patienten nach Entfernung des Tumors ein Rezidiv. Dies tritt in der Regel innerhalb von zwei Jahren nach der Primärdiagnose auf. Zur frühzeitigen Erkennung erfolgen regelmäßig Nachuntersuchungen, die auch bildgebende Verfahren einschließen. Die Rezidivtherapie besteht aus chirurgischen, strahlen- und chemotherapeutischen Maßnahmen.

Da mit heutigen Behandlungsprotokollen sehr gute Überlebensraten bei Nephroblastom-Patienten erzielt werden, liegt der derzeitige Studienschwerpunkt auf einer möglichen Reduktion der postoperativen Chemotherapie, um sowohl akute als auch langfristige Nebenwirkungen der Behandlung zu minimieren. So ist das als Chemotherapeutikum eingesetzte Doxorubicin toxisch für Herzmuskelzellen und kann zu gravierenden Spätfolgen am Herzen führen. Zusätzlich haben Patienten, die im Kindesalter eine Chemo- und/oder Radiotherapie erhielten, ein deutlich höheres Risiko einer zweiten malignen Erkrankung [Taylor 2008; Wright 2009]. Es sollen daher neben Tumorstadium und -histologie zusätzliche Stratifizierungsmarker bzw. Kriterien gefunden werden, die Rückschlüsse auf die Notwendigkeit einer weiteren Therapie zulassen. Außerdem wären die Entwicklung einer weniger aggressiven, aber mindestens ebenso effektiven Behandlung sowie eine Therapiemöglichkeit bei chemotherapieresistentem Nephroblastom wünschenswert.

## **1.2. Genetische Ursachen**

Bei 98-99 % der Patienten treten Wilms Tumoren sporadisch auf. Die sehr seltene familiäre Prädisposition für die Entstehung eines Wilms Tumors wird autosomal dominant vererbt

[Matsunaga 1981]. Da nur bei ca. 10 % der betroffenen Familien sowohl Eltern als auch Kinder erkranken, geht man von unvollständiger Penetranz aus [Breslow 1996; Huff 1997].

Während für Umweltfaktoren bisher kein Einfluss auf das Erkrankungsrisiko nachgewiesen werden konnte [Birch 1995; Breslow 1993], sind einige genetische Defekte mit Assoziation zum Wilms Tumor beschrieben. Obwohl eine Reihe verschiedener Genmutationen (WT1, CTNNB1, WTX) und Chromosomenveränderungen auftritt, sind nur wenige dieser Faktoren auch prädisponierend für die Entwicklung eines Wilms Tumors. Zu diesen gehören Mutationen des Wilms Tumor Suppressorgens (WT1), die jedoch aufgrund von urogenitalen Fehlbildungen selten vererbt werden. Ein zweites potenzielles Wilms Tumor Suppressorgen (WT2) liegt in der Region 11p15, allerdings konnte dieses bisher nicht identifiziert werden [Ping 1989; Reeve 1989]. Weitere Gene, die an der Entstehung eines familiären Wilms Tumors beteiligt sind, werden vermutet, sind aber noch unbekannt. So konnten in Untersuchungen von WT-Familien die Regionen FWT1 (17q12-q21) [Rahman 1996] und FWT2 (19q13.4) [McDonald 1998] als prädisponierende Faktoren beschrieben werden, jedoch sind die betroffenen Gene selbst bisher nicht bekannt.

Insgesamt finden sich somatische Veränderungen in Wilms Tumoren vergleichsweise seltener als in Tumoren des Erwachsenenalters. Es wird außerdem angenommen, dass in embryonalem Gewebe - aus dem ein Nephroblastom entsteht - weniger somatische Mutationen für eine maligne Entartung der Zellen nötig sind. Im Folgenden wird auf einige der relevanten Gene und Chromosomenveränderungen näher eingegangen.

### **1.2.1. Wilms Tumor Suppressorgen 1 (WT1)**

WT1 wurde 1990 als Tumorsuppressor beschrieben [Call 1990; Gessler 1990]. Das Gen ist in der Chromosomenregion 11p13 lokalisiert und besteht aus zehn Exons. Es codiert ein Protein mit einer Länge von 449 Aminosäuren (AS) mit vier C-terminalen Zinkfingern, wie sie typisch für viele Transkriptionsfaktoren sind. Es werden verschiedene WT1-Isoformen beschrieben, wobei die Exon 5- und KTS-Varianten am besten untersucht sind. Das 51 Nukleotide umfassende Exon 5 kann nach alternativem Splicen fehlen und auch die drei Aminosäuren Lysin (K), Threonin (T) und Serin (S) zwischen den Zinkfingern 3 und 4 können nach Nutzung einer alternativen Splicestelle im reifen Protein ausgeschlossen sein.

WT1 spielt für die Entwicklung vieler mesodermal abgeleiteter Gewebe eine wichtige Rolle, was sowohl die Entwicklung von Nieren, Gonaden oder Gefäßen des Herzens als auch die Proliferation einiger neuraler Vorläufer umfasst [Hohenstein 2006]. Über die Funktion des

WT1-Proteins gibt es eine Vielzahl unterschiedlicher – sich zum Teil widersprechender – Berichte, die darauf hindeuten, dass die Funktion stark vom Gewebe und Kontext im Rahmen der Entwicklung abhängt. Zusätzliche Variabilität in Bezug auf die Funktion bietet die Vielzahl an WT1-Isoformen.

WT1 wird sowohl als Transkriptionsaktivator als auch -repressor beschrieben. Die Suche nach WT1-Zielgenen wird dadurch erschwert, dass keine einheitliche und eindeutige WT1-Bindungsstelle bekannt ist. Viele der bisher beschriebenen Zielgene werden durch WT1 aktiviert. Es wurden aber auch Co-Faktoren gefunden, die als transkriptionelle Co-Repressoren mit WT1 zusammenarbeiten. Wichtig ist die Feststellung, dass nur -KTS-Formen von WT1 mit hoher Affinität an DNA binden. Neben dieser Funktion in der Transkriptionsregulation liegen Daten vor, die eine Rolle von +KTS-Formen im RNA-Metabolismus wahrscheinlich machen [zusammengefasst in Hohenstein 2006].

Auch über die Aufgabe von WT1 während der Embryonalentwicklung gibt es widersprüchliche Berichte. Das vollständige Fehlen von Nieren in WT1-defizienten Mäusen [Kreidberg 1993] weist auf eine Schlüsselrolle von WT1 während der Nierenentwicklung hin. Dabei ist WT1 für die Umwandlung mesenchymaler Vorläufer zu epithelialen Zellen (mesenchymal-epithelial transition – MET) nötig [Davies 2004]. Störungen des MET werden als eine mögliche Ursache für Wilms Tumoren angesehen. Diese entwickeln sich aus mesenchymalen Zellen – hier führt ein Verlust von WT1 zum Erhalt des mesenchymalen Status während der Nierenentwicklung. Inaktivierende WT1-Mutationen finden sich in 10-15 % aller Wilms Tumoren [Gessler 1994; Maiti 2000]. Keimbahnmutationen führen häufig zu urogenitalen Missbildungen und treten in einigen Syndromen auf, die mit einem deutlich erhöhten Nephroblastom-Risiko einhergehen. So weisen Patienten mit Denys-Drash-Syndrom Punktmutationen in Exon 8 oder 9 auf, die zur Verkürzung des Proteins führen, und ein WT1-Verlust durch Deletionen in der Chromosomenregion 11p13 ist mit der Ausbildung des WAGR-Syndroms assoziiert.

Während WT1 in der embryonalen Niere unter anderem dafür verantwortlich ist, Zellen aus dem Zellzyklus zu bringen und ihre Differenzierung anzuregen, scheint es eine gegenteilige Rolle in der Herzentwicklung zu spielen. Hier ist WT1 für die Erhaltung der Gefäßvorläuferzellen in undifferenziertem Zustand und deren Proliferation von Bedeutung. Im Gegensatz zur Nierenentwicklung – wo ein WT1 induzierter MET stattfindet – ist WT1 im Herzen für EMT notwendig [Martinez-Estrada 2010; Moore 1999]. Je nach Gewebe scheint

WT1 also sowohl für als auch gegen Differenzierung zu agieren und kann abhängig vom Umfeld sehr unterschiedliche Funktionen übernehmen, wobei eine Hauptaufgabe in der Regulation des mesenchymal-epithelialen Gleichgewichts liegt.

### 1.2.2. $\beta$ -Catenin

Das Gen CTNNB1 ist auf der chromosomalen Bande 3p22.1 lokalisiert und codiert für das Protein  $\beta$ -Catenin.  $\beta$ -Catenin hat in der Zelle zwei unterschiedliche Funktionen. Zum einen vermittelt es in Zusammenarbeit mit Cadherinen die Adhäsion zwischen benachbarten Zellen, zum anderen ist es in die Signalweiterleitung innerhalb des canonischen WNT-Signalwegs involviert [Schmidt-Ott 2008]. Zytoplasmatisches  $\beta$ -Catenin wird von einem Multi-Proteinkomplex – dem  $\beta$ -Catenin-Abbau-Komplex – gebunden, der u. a. APC,  $\beta$ -TrCP, GSK3 $\beta$  und AXIN1/2 enthält. Darin wird  $\beta$ -Catenin durch GSK3 $\beta$  phosphoryliert, was zur Ubiquitinierung und anschließend zum Abbau von  $\beta$ -Catenin im Proteasom führt. Nach Aktivierung des WNT-Signalwegs durch Bindung eines Liganden werden die  $\beta$ -Catenin-Phosphorylierung und damit der Abbau inhibiert.  $\beta$ -Catenin akkumuliert im Zytoplasma, transloziert in den Zellkern und aktiviert dort als Komplex mit Transkriptionsfaktoren der TCF/Lef-Familie die Transkription spezifischer Zielgene. Eine schematische Übersicht über den WNT/  $\beta$ -Catenin-Signalweg bietet Abbildung 3.

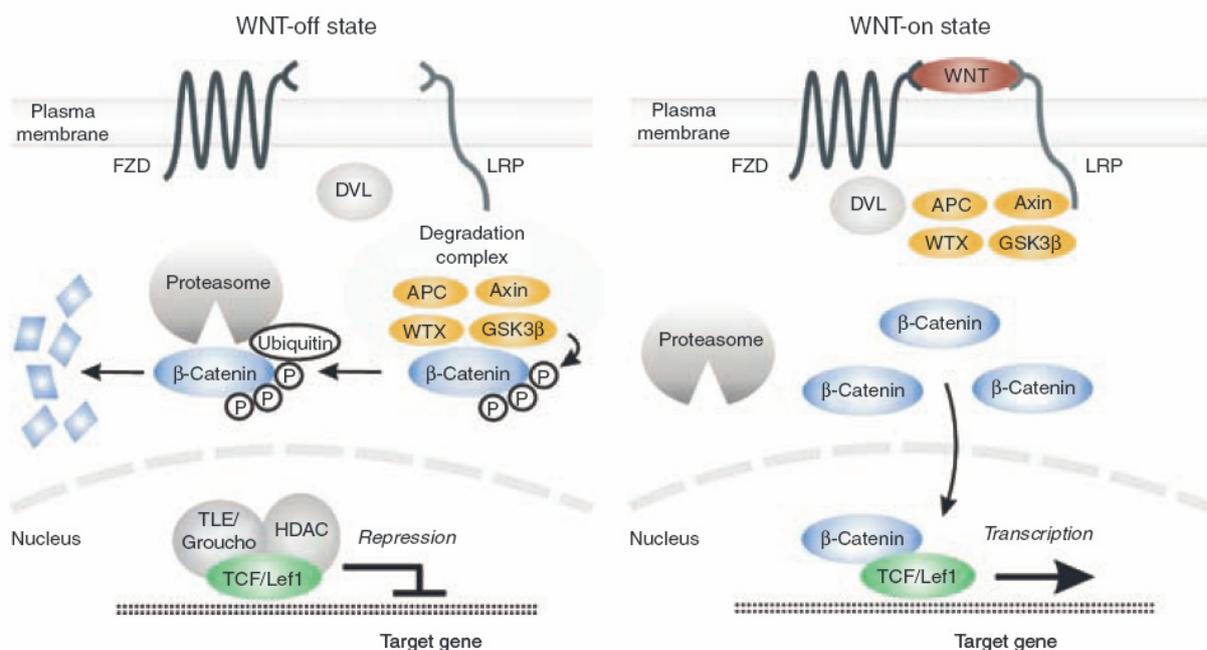


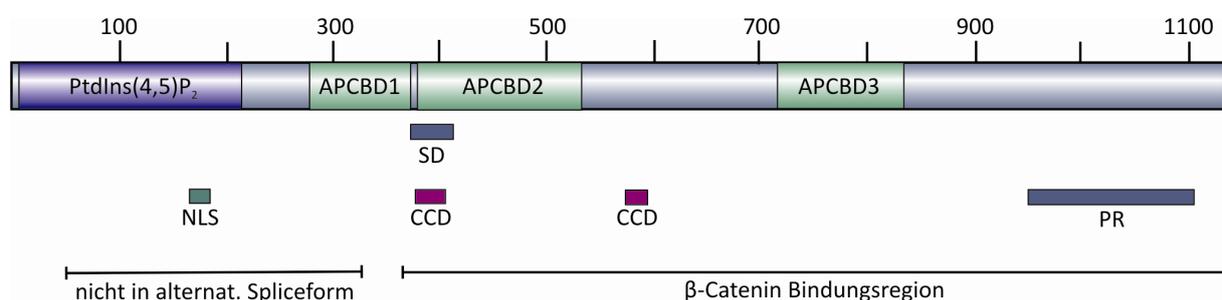
Abbildung 3: WNT-Signalweg [Schmidt-Ott 2008]

CTNNB1-Mutationen werden in 10-15 % der Wilms Tumoren gefunden und treten häufig assoziiert mit WT1-Mutationen auf [Koesters 1999; Maiti 2000]. In WT wurde ein spezifischer Mutations-hot-spot im Codon 45, Exon 3 gefunden. Serin 45 ist essentiell für die Phosphorylierung und damit den Abbau von  $\beta$ -Catenin. Häufig treten Deletionen des ganzen Triplets oder missense-Mutationen auf, die zu einem Austausch des Serins gegen Tyrosin oder Phenylalanin führen. CTNNB1-Mutationen wurden auch für eine Reihe weiterer Tumoren beschrieben, z. B. Kolorektales Karzinom und Hepatoblastom [Polakis 2000].

Neue Ergebnisse zeigen, dass stabilisiertes  $\beta$ -Catenin in metanephrischem Mesenchym die Proliferation steigert, Apoptose verhindert und den Übergang zu epithelialen Strukturen blockiert [Park 2007]. In Wilms Tumoren könnte ein aktiver  $\beta$ -Catenin/TCF/Lef1-Transkriptionskomplex also eine wichtige Rolle spielen, indem er in Nephronvorläufern zum Differenzierungsstopp bei gleichzeitiger Proliferationssteigerung führt.

### 1.2.3. Wilms Tumor Gen auf dem X-Chromosom (WTX)

Das Wilms Tumor Gen auf dem X-Chromosom – auch als *AMER1* (APC membrane recruitment 1) bezeichnet – liegt zentromernah in der Region Xq11.1. Das Gen besteht aus zwei Exons, wobei nur Exon 2 translatiert wird, und codiert ein aus 1135 Aminosäuren bestehendes Protein. Dieses besitzt keine bisher bekannten funktionellen Domänen, allerdings wird ein Kernlokalisationsignal vorhergesagt. Des Weiteren besitzt WTX eine saure und eine prolinreiche Region sowie zwei Bereiche mit coiled-coil Struktur. Es existiert eine alternative Spliceform, bei der die Aminosäuren 50 bis 326 deletiert sind [Jenkins 2009].



**Abbildung 4: WTX-Struktur, nach [Ruteshouser 2009].**

Das WTX-Gen codiert ein Protein mit einer Länge von 1135 AS, in der alternativen Spliceform fehlen die AS 50-326. N-terminal liegen eine Kern-Lokalisations-Sequenz (AS 166-182, NLS) und zwei Phosphatidylinositol(4,5)-bisphosphat-Bindungsdomänen (AS 2-142 und AS 143-209, PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>). Über die drei APC-Bindungsdomänen (AS 280-368, AS 380-531 und AS 717-834, APCBD) kann WTX mit APC interagieren und dessen Lokalisation beeinflussen. Die  $\beta$ -Catenin-Bindungsregion liegt zwischen AS 367 und dem C-Terminus. Des Weiteren enthält WTX einen sauren Bereich (AS 370-411, SD), eine prolinreiche Region (AS 951-1104, RG) und zwei coiled-coil Strukturen (AS 374-403 und AS 574-593, CCD).

WTX ist an zwei unterschiedlichen Prozessen beteiligt: zum einen an der  $\beta$ -Catenin-Degradation und zum anderen an der intrazellulären Lokalisierung von APC (adenomatous polyposis coli). WTX kann an  $\beta$ -Catenin, AXIN1,  $\beta$ -TrCP1 und  $\beta$ -TrCP2 binden, die alle Bestandteile des  $\beta$ -Catenin-Abbau-Komplexes sind. Es fördert die Ubiquitinierung von  $\beta$ -Catenin und damit dessen Abbau [Major 2007]. Neben der C-terminal gelegenen  $\beta$ -Catenin Bindungsregion besitzt WTX drei Domänen, über die es APC bindet. Eine Überexpression von WTX verursacht die Rekrutierung von APC an die Zellmembran, während ein Verlust von WTX zur Assoziation von APC mit Mikrotubuli führt [Grohmann 2007]. Vor kurzem wurde ein Modell vorgeschlagen, nach dem WTX auf die transaktivierende Aktivität von WT1 Einfluss nehmen kann [Rivera 2009].

WTX wurde 2007 erstmals als Tumorsuppressorgen in Wilms Tumoren beschrieben [Rivera 2007]. Eine Besonderheit liegt hierbei in der Lokalisation auf dem X-Chromosom, die eine vollständige Inaktivierung durch ein einzelnes Mutationsereignis in männlichen Patienten erlaubt. Auch in weiblichen Patienten ist eine inaktivierende Mutation ausreichend, wenn das aktive X-Chromosom betroffen ist. Ursprünglich wurde eine WTX-Mutationsrate von 30 % in Nephroblastomen angegeben. In anderen malignen Erkrankungen (Akute myeloische Leukämie, Magen-, Darmkrebs und Hepatoblastom) wurden sehr selten Mutationen gefunden [Owen 2008; Yoo 2009].

#### **1.2.4. Chromosomale Veränderungen**

Neben Mutationen einzelner Gene gibt es weitere genetische und epigenetische Veränderungen, die beim Nephroblastom gehäuft auftreten. Zu diesen gehören der Verlust von Heterozygotie (LOH – loss of heterozygosity) und von Imprinting (LOI – loss of imprinting).

Im Gegensatz zu vielen adulten Tumorerkrankungen zeichnen sich Wilms Tumoren durch einen meist euploiden Chromosomensatz aus und sie weisen eine niedrige LOH-Frequenz (< 5 %) im gesamten Genom auf [Maw 1992]. Neben Allelverlusten in 11p13 (WT1-Region) tritt vielfach auch LOH in der Region 11p15 auf, der die Existenz eines weiteren Wilms Tumor Suppressorgens (WT2) nahe legt [Ping 1989; Reeve 1989]. Allerdings konnte bisher die betroffene Region nicht auf ein einzelnes Gen eingegrenzt werden. Möglicherweise spielt in diesem Bereich in erster Linie epigenetische Fehlregulation eine Rolle, da hier Gene liegen, welche Imprinting aufweisen (z. B. IGF2, p57-Kip2 und H19). Eine durch LOH bedingte uniparentale Disomie oder LOI können die Überexpression von IGF2 verursachen, welche

eventuell die kritische Veränderung in 11p15 darstellt [Ogawa 1993; Rainier 1993]. LOH wurde auch für die Chromosomenbereiche 1p, 1q, 7p, 9q, 11q, 16q und 22q beschrieben [Grohmann 2007; Grundy 1994; Grundy 1998; Klamt 1998; Maw 1992; Radice 1995; Ruteshouser 2005; Wilmore 1994]. Eine prognostische Bedeutung wurde für das Auftreten von LOH in den Regionen 1p, 11p, 16q und 22q gezeigt [Grundy 1994; Klamt 1998; Wittmann 2007].

### 1.3. Modellsysteme des Wilms Tumors

Für das Verständnis der molekulargenetischen Grundlagen des Nephroblastoms sowie für *in vivo*- und *in vitro*-Versuche zur Entwicklung und Testung möglicher Therapieansätze wären geeignete Zellkultur- und Tiermodelle sehr hilfreich. Leider stehen WT-Modelle nur in begrenztem Maß zur Verfügung.

Die Etablierung geeigneter Tiermodelle ist schwierig. In Ratten ist die chemische Induktion eines Nephroblastoms durch *in utero* Gabe des Karzinogens N-Ethylnitrosoharnstoff möglich. Dabei entwickeln ca. 50 % der behandelten Ratten Tumoren, die histologisch dem humanen Wilms Tumor entsprechen [Hard 1985]. Einige frühe Versuche zu Mausmodellen waren nicht geeignet, um typische Eigenschaften eines WT zu rekapitulieren. So versuchten Armstrong et al. (1993) Teile von embryonalen Nieren in Nierenkapseln verschiedener Mausstämmen zu implantieren. Diese wuchsen zwar in ca. 65 % an, wiesen aber nicht die typische WT-Histologie auf. Als Mausmodell des Nephroblastoms werden heute Xenotransplantationen von humanem Tumormaterial durchgeführt, die die typische Histologie eines WT gut wiedergeben [Garvin 1987; Houghton 2007; Yeger 1985].

Eine Schwierigkeit bei der Etablierung eines geeigneten Zellkulturmodells besteht in der Heterogenität des Nephroblastoms, welche sich nicht anhand einer einzigen Zelllinie nachbilden lässt. Dafür ist die Generierung mehrerer, verschiedener Zelllinien nötig, um möglichst ein breites Spektrum an Wilms Tumoren abzudecken. Es gab bisher verschiedene Versuche, primäre Zellkulturen aus Nephroblastom-Gewebe anzulegen. So konnten einzelne Kulturen gewonnen werden, die stets beschränkt auf spezielle Tumorguppen waren: Es sind zwei Zelllinien aus anaplastischen WT [Faussillon 2008; Hazen-Martin 1994], sowie Blastem- [Garvin 1987] und epitheliale [Hazen-Martin 1993] Zellen aus triphasischen WT beschrieben, die jedoch in der Mehrzahl nicht mehr verfügbar sind. In einer kürzlich veröffentlichten Arbeit wurden Zelllinien aus WT1-mutierten WT generiert [Royer-Pokora 2010]. Für einige

weitere WT-Zelllinien musste die Klassifizierung nach eingehenden Untersuchungen jedoch geändert werden. So stimmen die Eigenschaften der Zelllinie G401 eher mit denen eines Rhabdoidtumors als mit denen eines Nephroblastoms überein [Garvin 1993]. Die Linie SK-NEP1, deren Ausgangstumor als anaplastischer WT klassifiziert wurde, entspricht im Expressionsprofil einem Ewing Sarkom und zeigt auch das für diesen Tumor typische EWS-FLI1 Genfusions-Transkript [Smith 2008]. Eine dritte WT-Linie (WCCS-1) erzeugt bei Transplantation in Nacktmäuse Läsionen, welche Merkmale eines Klarzellsarkoms der Niere aufweisen [Talts 1993].

#### **1.4. Retinsäure in der Tumorthherapie**

Retinsäure (RA) ist ein Vitamin A-Derivat und kommt in verschiedenen Isomeren vor. Retinoide wirken als Signalmoleküle, deren entsprechende Retinsäure-Rezeptoren (RAR) und Retinoid X-Rezeptoren (RXR) als Heterodimere an Retinsäure-Responseelemente (RAREs) binden und dadurch als Transkriptionsfaktoren agieren. In ligandenfreiem Zustand verhindern RAR-RXR-Heterodimere die Expression der RA-Zielgene, indem sie Co-Repressor-Komplexe binden. Darin enthalten sind Histon-Deacetylasen (HDAC), welche Histonmoleküle deacetylieren, somit das Chromatin in der Promotorregion der Zielgene kompaktieren und die Expression verhindern. Nach Ligandenbindung erfolgt eine Konformationsänderung der Rezeptordimere, wodurch sie nicht mehr mit Co-Repressor- sondern mit Co-Aktivator-Komplexen interagieren. Zum einen können diese Komplexe Histon-Acetyl-Transferasen enthalten, die eine Chromatinauflockerung im Bereich des Zielgen-Promotors herbeiführen. Zum anderen können Co-Aktivator-Komplexe direkt an die basale Transkriptionsmaschinerie binden und damit die Transkriptionsinitiation positiv beeinflussen. In beiden Fällen ist die Expression von RA-Zielgenen die Folge [Glass 2000].

Retinsäure spielt eine große Rolle sowohl während der Embryonalentwicklung als auch bei Erwachsenen für Homöostase und die Funktionalität verschiedener Organe wie Haut, Lunge, Leber, Nerven- und Immunsystem. RA beeinflusst im Embryo eine Vielzahl an Prozessen, die von früher embryonaler Musterbildung bis hin zur Entwicklung von Herz, Knochen oder Nervensystem reichen [Kastner 1995; Niederreither 1999; Ross 2000]. Für alle Prozesse ist stets eine gut kontrollierte Regulierung der Retinsäuremenge nötig, da ein Mangel zu Fehlbildungen führen kann und zu hohe Konzentrationen teratogen wirken.

*In vitro*-Untersuchungen mit Retinsäure an verschiedenen Zellkulturen zeigten, dass RA sowohl das Zellwachstum hemmt als auch zur Ausdifferenzierung von Zellen führt. Diese Fähigkeit, Zellen in die Differenzierung oder Apoptose zu treiben, deutet auf ein Potential in der Tumortherapie hin. Neben der *all-trans*-Retinsäure (Tretinoin, ATRA) finden auch *9cis*- (Alitretinoin, 9cisRA) und *13cis*-Retinsäure (Isotretinoin, 13cisRA) Eingang in die Therapie. ATRA wird in Kombination mit Chemotherapie bereits sehr erfolgreich zur Behandlung von APL (Akute promyelozytische Leukämie) eingesetzt [Fenaux 2001]. Für weitere maligne Erkrankungen laufen klinische Studien, die für einen Einsatz von Retinsäure in der Therapie sprechen, so zum Beispiel die Behandlung des Schilddrüsenkarzinoms mit ATRA, die Gabe von 9cisRA bei Mamma- oder Nierenzellkarzinom sowie der positive Effekt von 13cisRA bei Leukoplakie. Ebenso werden synthetische Retinoide wie Fenretinid (4-HPR) auf ihre klinische Anwendbarkeit zum Beispiel bei der Behandlung von Ovarial- oder Prostatakarzinom untersucht. Eine gute Übersicht über Retinoid-Studien bietet [Altucci 2001]. Auch klinische Tests mit pädiatrischen Tumoren sind vielversprechend. So zeigten Phase III Studien Erfolge beim Einsatz von 13cisRA bei fortgeschrittenem Neuroblastom [Reynolds 2003]. Es gibt zurzeit allerdings kaum Erfahrung mit einer Retinsäuretherapie von Wilms Tumoren, da diese bisher nur in Einzelfällen durchgeführt wurde [Villablanca 2006; Witt 2009].

## 2. Ziele der Arbeit

Da bisherige Studien zu Veränderungen des WTX-Gens in Wilms Tumoren zum Teil widersprüchliche Ergebnisse lieferten und überwiegend anhand weniger Fälle durchgeführt wurden, sollte eine große Zahl an Wilms Tumor-Proben auf Veränderungen sowohl auf DNA- als auch auf RNA-Ebene überprüft werden. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob WTX einen geeigneten Marker zur Stratifizierung von WT darstellt und Mutationen bzw. das Expressionsniveau mit klinischen Eigenschaften im Zusammenhang stehen.

Um Grundlagen maligner Erkrankungen besser verstehen und mögliche neue Therapieansätze testen zu können, sind *in vitro*-Modelle nötig. Da ein solches für Wilms Tumoren nicht etabliert ist, sollten primäre WT-Kulturen aus vitalem Tumorgewebe verschiedener histologischer Subtypen angelegt werden, welche geeignet sind, die Heterogenität des Nephroblastoms widerzuspiegeln. Die WT-Zellen sollten im Zusammenhang mit dem ursprünglichen Tumormaterial durch molekulargenetische und immunhistochemische Charakterisierung verifiziert und in ihren Wachstumseigenschaften beschrieben werden.

Nachdem frühere Untersuchungen eine Rolle des Retinsäure-Signalwegs in der Tumorprogression nahe legten, sollte in einem großen Tumorset die Expression von Retinsäure-Genen mit Hilfe von Realtime-RT-PCR im Zusammenhang mit klinischen Daten untersucht werden. Die dabei gefundene Assoziation von dereguliertem RA-Signalweg und hoher Tumormalignität warf die Frage auf, ob eine RA-Behandlung eine therapeutische Option bei fortgeschrittenem Wilms Tumor darstellen könnte. Retinoide kommen bereits bei der Behandlung einiger Tumorerkrankungen zum Einsatz, es gibt jedoch keine Erfahrung zur Verwendung in der Therapie des Nephroblastoms. Erste Hinweise auf die Wirkung verschiedener Retinoide auf WT-Zellen sollten *in vitro* anhand der neu etablierten WT-Primärkulturen gewonnen werden und dafür sowohl das Wachstumsverhalten als auch Veränderungen des Expressionsmusters und eine mögliche Differenzierung unter RA-Gabe in verschiedenen WT-Zellen untersucht werden.

### 3. Material & Methoden

#### 3.1. Präparation von DNA und RNA

##### 3.1.1. Isolierung von DNA und RNA aus Tumor- und Nierengewebe

Genomische DNA und Gesamt-RNA wurden aus schockgefrorenem und bei -80 °C gelagertem Tumorgewebe mit dem Nucleobond AXR400 Kit (Macherey-Nagel) oder dem AllPrep DNA/RNA Mini Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben isoliert. Aus normalem Nierengewebe wurde die DNA mit Hilfe des DNeasy Tissue Kit (Qiagen) gewonnen.

##### 3.1.2. Isolierung von DNA aus Blut

Zur DNA-Aufreinigung aus gefrorenen Blutproben wurden diese nach dem Auftauen mit 1 Vol NP40-Lösung gemischt, 15 min auf Eis inkubiert und im Anschluss 15 min mit 5000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 30 ml NP40-Lösung resuspendiert und nach erneuter Zentrifugation in 5 ml Blut-Lysispuffer aufgenommen. Nach Zugabe von 50 µl Proteinase K (10 mg/ml) und 250 µl SDS (20 %) erfolgte der Proteinverdau über Nacht bei 50 °C. Das Lysat wurde mit ½ Vol Phenol (in TE äquilibriert, pH 8,0) versetzt, kräftig geschüttelt und für 10 min bei 5000 rpm zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde mit ½ Vol Chloroform kräftig gemischt, nach erneutem Zentrifugieren (10 min, 5000 rpm) die obere Phase in ein neues Röhrchen überführt und mit 1 Vol Isopropanol versetzt. Der durch langsames Schwenken entstehende DNA-Faden wurde mit Hilfe einer Glas-Pasteurpipette entnommen, mit 70%igem Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in 100 µl TE-Puffer gelöst.

NP40-Lösung:      0,1 %    Nonidet P40  
                         0,9 %    NaCl

Blut-Lysispuffer: 10 mM    Tris-HCl, pH 8  
                         75 mM    NaCl  
                         20 mM    EDTA

TE-Puffer:        10 mM    Tris-HCl, pH 8  
                         1 mM    EDTA

##### 3.1.3. Isolierung von DNA und RNA aus Zellen

Zur DNA-Isolierung wurde das Zellpellet ( $1-5 \times 10^6$  Zellen) in 700 µl Zell-Lysispuffer aufgenommen und nach Zugabe von 35 µl Proteinase K (10 mg/ml) über Nacht bei 55 °C

inkubiert. Am nächsten Tag wurden dem Lysat 250 µl 6 M NaCl zugesetzt und nach kräftigem Schütteln erfolgte eine siebenminütige Zentrifugation bei 12000 rpm. 750 µl des Überstandes wurden mit 500 µl Isopropanol versetzt und nach vorsichtigem Schwenken der DNA-Faden mit Hilfe einer Glas-Pasteurpipette entnommen. Die DNA wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen, anschließend getrocknet und in 100 µl TE-Puffer aufgenommen.

Gesamt-RNA aus Zellen wurde mit PeqGOLD TriFast (Peqlab) nach Herstellerangaben gewonnen.

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

#### **3.1.4. Lasergestützte Mikrodisektion**

Unterschiedliche Gewebetypen wurden aus Gefrierschnitten (5 µm) von Wilms Tumor-Proben durch lasergestützte Mikrodisektion (laser capture microdissection, LCM) mit dem PALM®-System (Microlaser Technologies, Bernried) gewonnen. Epithel-, Stroma- und Blastembereiche wurden getrennt isoliert. Anschließend erfolgte die Gewinnung und Amplifikation von genomischer DNA aus den Proben mit dem GenomiPhi Kit (Amersham Biosciences, Freiburg). Die Herkunft der isolierten DNA aus Tumorgewebe wurde durch LOH-Untersuchungen sichergestellt.

### **3.2. PCR-Analysen**

#### **3.2.1. Agarose-Gelelektrophorese**

Kleine DNA-Fragmente (PCR-Produkte) wurden in 1 % SB-Agarose-Gelen (mit 1 µg/ml Ethidiumbromid) separiert. Dafür wurden die Proben mit 0,05 Vol Ladepuffer versetzt und anschließend im Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Als Größenmarker diente das mit HaeIII geschnittene Plasmid pBluescript II KS.

20x SB-Puffer: 200 mM NaOH  
pH 8 mit H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> einstellen

Ladepuffer: 50 % Glycerin  
2,25 % Ficoll  
0,04 % Bromphenolblau  
0,9 mM EDTA

### 3.2.2. PCR

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

Standard-PCR-Ansatz: 16 µl H<sub>2</sub>O  
 2 µl 10x PCR-Puffer  
 0,2 µl dNTP-Mix (25 mM)  
 0,5 µl 5' Primer (10 pmol/µl)  
 0,5 µl 3' Primer (10 pmol/µl)  
 0,2 µl Taq (15 U/µl)  
 1 µl DNA (50 ng/µl)

Gegebenfalls wurde der Ansatz auf größere Volumina angepasst.

Standard-PCR-Programm: 94 °C 3 min  
 94 °C 20 s  
 annealing 20 s } 35 Zyklen  
 72 °C 20 s  
 72 °C 5 min

Die spezifischen annealing-Temperaturen sind zusammen mit den jeweiligen Primern angegeben. Für große PCR-Produkte wurde die Elongationszeit entsprechend verlängert.

### 3.2.3. Untersuchung von WTX-Deletionen

Tumorproben männlicher Patienten wurden über PCR auf Deletionen im Bereich des WTX-Gens untersucht. Dafür wurden in einem PCR-Ansatz spezifische Primer für die 5'- bzw. 3'-Region von WTX oder benachbarte Gene (siehe Tab. 3) zusammen mit CTNNB1-Primern verwendet. In einem 20 µl PCR-Ansatz wurden von jedem Primer 5 pmol eingesetzt, die Amplifikation erfolgte in nur 30 PCR-Zyklen. Die PCR-Produkte wurden in einem SB-Agarosegel aufgetrennt, wobei das Exon 3-Produkt von CTNNB1 als interne Kontrolle der korrekten Amplifikation aus genomischer DNA diente.

**Tabelle 3: Primer für WTX-Deletionsuntersuchung**

Produkt	Primername	Primersequenz	annealing
WTX 5' Region	WTX 5' for	AGCGGACAATAACCGGGCTAGGAAC	56 °C
	WTX 5' rev	CTAGTCCTTAGTGCCCTCCTCCAGTCC	
WTX 3' Region	WTX 3' for	ATGGCCTGTAAAGATCCAGAAAAAC	56 °C
	WTX 3' rev	GTTTACCTCTCCTGCTACTACCTTCTC	
ASB12	ASB12_for ASB12_rev	GAGAATAGTTCTCCAATTAGCCAAGA TGGTCCAAAGTATAGGAGTCGTTGT	56 °C

Produkt	Primername	Primersequenz	annealing
MTMR8	MTMR8_for_neu MTMR8_rev	CTACCAACAGAGACAAAAGATGACC ACAGTCTAGGAACTGGGTGAAGATAG	56 °C
ARHGEF9	ARHGEF9_for_neu ARHGEF9_rev	TCTTTGTCTACAGGGCTATCTGAA GTTATACTGTTTCTCCAGGTCTCTCAC	56 °C
SPIN4	SPIN4_for SPIN4_rev	CTTGATGACTACAAAGATGGTGACTT ATGTATAAAAATGCCAGTTCTCTTGG	56 °C
CTNNB1 Ex3	bcatenin-ex3-for bcatenin-ex3-rev	TTTGATGGAGTTGGACATGG CAGGACTTGGGAGGTATCCA	56 °C

### 3.3. LOH-Analyse mit ALFexpress

Der Allelstatus von Patienten wurde sowohl in DNA aus Kontrollgewebe (Niere oder Blut) als auch aus Tumorgewebe mit Hilfe von Mikrosatelliten-Markern analysiert. Über PCR wurden Mikrosatellitenbereiche aus den Chromosomenregionen 7p, 9q, 11p, 11q, 14q, 16q und Xq21 amplifiziert. Es wurden jeweils 20 µl PCR-Reaktionen angesetzt. Für die Marker D11S1392, TH01 und D14S588 enthielten diese 5 % DMSO. Die spezifische annealing-Temperatur der einzelnen Primerpaare ist in Tab. 4 angegeben, je ein Primer war am 5'-Ende mit Cy5 markiert.

**Tabelle 4: Primer für LOH-Analyse**

Produkt	Region	Primername	Primersequenz	annealing
D7S2846	7p14.1	D7S2846-for D7S2846-rev	TGGAAATAACATGTGTCCATCAAA 5'-Cy5-TGGCCTGCTGCCTTAACA	60 °C
D9S938	9q31.1	D9S938-for D9S938-rev	5'-Cy5-TGAGTAAGGGGTTGAGGTTTTG CCTGCATGCATATTCCAGTTT	60 °C
D11S1392	11p13	D11S1392-for D11S1392-rev	5'-Cy5-TTGCATCCATACGGAAAGTC ACATCTGAGACTTGTAGTAGAAGGC	60 °C
D11S934	11q24.2	D11S934-A D11S934-B	5'-Cy5-GCTGTCCCTGACAACACTACATGC TTCCATCAGAACTGGGAATGAG	60 °C
TH01	11p15.5	TH01-A-neu TH01-B-neu	ATTCAAAGGGTATCTGGGCTCTGG 5'-Cy5-GTGGGCTGAAAAGCTCCCGATTAT	64 °C
D14S588	14q24.2	D14S588-for D14S588-rev	CTCTTTGGGATAAAATGCTTGG 5'-Cy5-AAAAATTAGTCAGGCCTGGTG	57 °C
D16S540	16q12.1	D16S540-A D16S540-B	5'-Cy5-CCTCCATAATCATGTGAGCC GTGTCTTAATCTCCCAACTCAAGACC	60 °C
D16S3112	16q12.2	D16S3112-for D16S3112-rev	5'-Cy5-TACTTTGGAGCCCGAGG AGCCCCAGTGGTGTAT	60 °C
WTX-(TA) <sub>n</sub>	Xq11.1	WTX-22xTA for WTX-22xTA rev	CATCATTATTGGGGGAAAG 5'-Cy5-CTGGGTTTGGGATGCTGTAA	57 °C
WTX-(AC) <sub>n</sub>	Xq11.1	WTX-21xAC for WTX-21xAC rev	ACAGAAGTTGGGGGTGCAG 5'-Cy5-TCATTGCCAGTTCTTTCTCAG	57 °C

Produkt	Region	Primername	Primersequenz	annealing
DXS992	Xp21.2	DXS992-for	AAGAATGGGACTCCATTCA	53 °C
		DXS992-rev	GCTTATCCACTGGGACAGAA	
Androgen-Rezeptor	Xq12	AR-for	TCCAGAATCTGTTCCAGAGCGTGC	65 °C
		AR-rev	GCTGTGAAGGTTGCTGTTCCCTCAT	

Zur Fragmentanalyse wurde jeweils 1 µl PCR-Produkt mit 2,5 µl ALF-Probenpuffer versetzt, bei 80 °C für 5 min denaturiert und auf Eis abgekühlt. Die Proben wurden auf einem ReproGel High Resolution (GE Healthcare BioScience AB, Uppsala) in 0,6x TBE mit Hilfe des ALFexpress II Sequenzierers (Amersham Pharmacia Biotech) elektrophoretisch getrennt und anschließend mit der entsprechenden Software ALX2ALF V1.0.0.1 und Fragment Manager (beides Amersham Bioscience) ausgewertet.

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

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

### 3.4. Sequenzierung

Zur Sequenzierung des Exon 3 von CTNNB1 wurden der Bereich der Exons 2 bis 4 mit den Primern bcatenin-ex2f und bcatenin-ex4r per PCR amplifiziert und das Produkt anschließend mit bcatenin-in3r sequenziert.

WT1 wurde entweder exonweise aus genomischer DNA mit den in Tab. 5 aufgeführten Primern unter den angegebenen Bedingungen amplifiziert und anschließend mit einem der PCR-Primer auch sequenziert oder es erfolgte eine Untersuchung der cDNA-Sequenz. Dafür wurde das PCR-Produkt mit den Primern WT1seq-Ex1for und WT1seq-Ex10rev generiert und mit WT1seq-Ex5rev sequenziert bzw. das PCR-Produkt mit WT1seq-ex4/5 und WT1seq-Ex10rev amplifiziert und anschließend mit WT1-Ex5for-seq sequenziert. PCR-Ansätze zur Amplifizierung von WT1 aus cDNA und Exon 1 aus genomischer DNA enthielten 1 M Betain und 5 % DMSO.

Die Primer WTX-splice-for und WTX-exon2-rev wurden eingesetzt, um den N-terminalen Bereich (nt 1 – 1700) der WTX codierenden Region zu amplifizieren, die Elongationszeit betrug hier 2 min. Die Sequenzierung erfolgte mit WTX-for and WTX 3'-for.

Tabelle 5: Primer für Sequenzuntersuchungen

Produkt	Primernamen	Primersequenz	PCR-Bedingungen
CTNNB1	bcatenin-ex2f	TGAAAATCCAGCGTGGACAATG	60 °C
	bcatenin-ex4r	GATTGCACGTGTGGCAAGTTCT	
	bcatenin-in3r	TCTGACTTTCAGTAAGGCAATGAA	Sequenzierung
WT1 Sequenzierung aus cDNA	WT1seq-Ex1for	AGGCCAGCGCTGAACGTC	60°C
	WT1seq-Ex10rev	CCGGTATCTTGTCTTGGAAGTTG	
	WT1seq-Ex5rev	CTCTGCCCTTCTGTCCATTT	Sequenzierung
	WT1seq-ex4/5	TTAAAGGGAGTTGCTGCTG	60 °C
	WT1-Ex5for-seq	GAGTCCAGCTCAGTAAAAT	Sequenzierung
WT1 Exon 1	WT-1-1s	GGGCGTCCGGTCTGAGCCT	57 °C
	WT-1-1a	CCGAAAAAGTGGACAGTGAAGGCG	
	WT-1-2s	CGAGGAGCAGTGCCTGAGCG	57 °C
	WT-1-2a	GCGGAGAGTCCCTGGCGC	
WT1 Exon 2	WT-2s	CGAGAGCACCGCTGACACTG	60 °C
	WT-2a	GAGAAGGACTCCACTTGGTTCCG	
WT1 Exon 3	WT-3s	CCAGGCTCAGGATCTCGTGT	60 °C
	WT-3a	AAGGACCCAGACGCAGAGC	
WT1 Exon 4	WT-4s	TGCTTTTGAAGAAACAGTTGTG	60 °C
	WT-4a	GGAAAGGCAATGGAATAGAGA	
WT1 Exon 5	WT-5s	GGGCTTTTCACTGGATTCTG	60 °C
	WT-5a	CCATTTGCTTTGCCATCTCC	
WT1 Exon 6	WT-6s	GTGAGCCCACTGAGCCTTT	60 °C
	WT-6a	GGCCGGTAAGTAGGAAGAGG	
WT1 Exon 7	WT-7s	GGCTTAAAGCCTCCCTTCT	60 °C
	WT-7a	TGAGAGCCTGGAAAAGGAGC	
WT1 Exon 8-9	WT-8s	GAGATCCCCTTTTCCAGTATCA	57 °C
	WT-9a	CTTTTCCAATCCCTCTCATCA	
WT1 Exon 10	WT-10s	TGTGCCTGTCTTTTGTGTC	60 °C
	WT-10a	GTTACACACTGTGCTGCCT	
WTX	WTX-splice-for	CCCACATTTTCCATCATTTTCT	56 °C
	WTX-exon2-rev	CGAAGCTCCCAATACAACAAC	
	WTX-for	CCAGACCCCACTGTGATGCTTCTG	Sequenzierung
	WTX 3'-for	ATGGCCTGTAAAGATCCAGAAAAC	Sequenzierung

Die Sequenzierungen selbst wurden sowohl im Haus auf einem CEQ8000-Sequenzierer mit dem DyeTerminator Cycle Sequencing Quick Starter Kit (Beckmann Coulter) als auch durch kommerzielle Anbieter (GATC biotech, Konstanz) durchgeführt. Die Analysen von WT1 aus cDNA und von WTX erfolgten stets durch GATC biotech.

Wurde eine CEQ-Sequenzierung im Haus durchgeführt, musste in einem ersten Schritt das PCR-Produkt durch einen EXO/SAP-Verdau (Exonuklease, Shrimp Alkaline Phosphatase, beide Fermentas) aufgereinigt werden. Hierfür wurde der PCR-Ansatz mit je 0,5 µl EXO und

SAP versetzt, bei 37 °C 15 min inkubiert und anschließend für 15 min bei 80 °C inaktiviert.

Die so vorbereiteten PCR-Produkte wurden direkt in die Sequenzierreaktion eingesetzt.

Ansatz für CEQ-Sequenzierung: 6 µl PCR-Produkt  
 1 µl Primer (5 pmol/µl)  
 3 µl MasterMix

CEQ-Sequenzier-Programm: 96 °C 2 min  
 96 °C 30 s } 30 Zyklen  
 60 °C 20 s }  
 65 °C 4 min }

Zur Aufreinigung der Sequenzierreaktion wurden 10 µl H<sub>2</sub>O, 2 µl NaAc (3 M), 2 µl Glykogen (10 mg/ml) und 60 µl Ethanol (100 %, -20 °C) zugesetzt und für 15 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Das entstehende Pellet wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 30 µl SLS-Puffer aufgenommen. Die elektrophoretische Analyse wurde auf einem CEQ8000-Sequenzierer durchgeführt.

Die Auswertung der Daten erfolgte entweder mit der CEQ Software V9.0 (Beckman Coulter) oder ContigExpress (Vector NTI Advance 10, Invitrogen).

### 3.5. Realtime-RT-PCR

#### 3.5.1. cDNA-Synthese

Die Synthese von cDNA erfolgte mit dem RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) nach Herstellervorgaben. Es wurden jeweils 2,5 µg Gesamt-RNA unter Verwendung von oligo(dT)<sub>18</sub>- oder random hexamer-Primern umgeschrieben. Nach Ende der cDNA-Synthese wurde der Ansatz auf 200 µl mit DEPC-H<sub>2</sub>O aufgefüllt.

#### 3.5.2. Realtime-RT-PCR

Standard-RT-PCR-Ansatz: 19 µl H<sub>2</sub>O  
 2,5 µl 10x PCR-Puffer  
 0,2 µl dNTP-Mix (25 mM)  
 0,25 µl FITC (1:20000)  
 0,75 µl Sybr-Green (1:20000)  
 0,5 µl 5' Primer (10 pmol/µl)  
 0,5 µl 3' Primer (10 pmol/µl)  
 0,2 µl Taq (15 U/µl)  
 1 µl cDNA

Standard-RT-PCR Programm: 94 °C 3 min  
 94 °C 15 s } 40 Zyklen  
 60 °C 30 s }  
 55-95 °C + 1 °C/min, Schmelzkurve

Zur Untersuchung der WTX-Expression in Wilms Tumor-Proben wurde random hexamer-cDNA eingesetzt, für alle weiteren Realtime-RT-PCRs oligo(dT)<sub>18</sub>-cDNA. Für einige Gene wurde eine abweichende Annealing/Elongations-Temperatur gewählt, die in Tab. 6 zu den entsprechenden Primern angegeben ist. Des Weiteren wurden zum Teil dreistufige PCR-Protokolle mit getrennten Annealing- und Elongationsschritten durchgeführt, die ebenfalls in Tab. 6 enthalten sind.

Alle Realtime-RT-PCRs wurden mit einem i-Cycler oder iQ5-Cycler (beide Bio-Rad) durchgeführt. Die Messungen erfolgten als Doppel- oder Dreifachbestimmung mit anschließender Mittelwertbildung. Eine Normierung wurde über das Haushaltsgen HPRT ausgeführt.

**Tabelle 6: Primer für Realtime-RT-PCR**

Produkt	Primername	Primersequenz	PCR-Bedingungen
ALDH1A1	hALDH1A1-real1 hALDH1A1-real2	CGTGGGGGAATAAAGGCTAC CATGATTTGCTGCACTGGTC	60 °C
ASPN	hASPN-real5' hASPN-real3'	TCCAACAAGAGAGCCAAGAAG AATGTTGGTTGGGACTGAGG	60 °C
CAPZA1	hCAPZA1-real5' hCAPZA1-real3'	ATGAAGCCCAAAGTCCAAG GATTTTGGTGCGGGTAAGT	60 °C
CLSTN2	hCLSTN2-real5' hCLSTN2-real3'	GACCAAGTCTCAGATAAGGAGCA GCACACGGAGATGATGATGA	60 °C
CPZ	hCPZ-real5' hCPZ-real3'	ATTCGGCAAGCCAGTCAA GGGCAGCAGTCTCCAGTAGT	60 °C
CRABP2	hCRABP2_5'real hCRABP2_3'real	CCAACTTCTCTGGCAACTGG TCCTCAGCATCACATTACC	60 °C
CTGF	hCTGF-real1 hCTGF-real2	GAAGAGAACATTAAGAAGGGCAAA ATGTCTTCATGCTGGTGCAG	60 °C
DKK1	hDKK1-5'real hDKK1-3'real	GGGAATTACTGCAAAAATGGAA ACCCATCCAAGGTGCTATGA	60 °C
DPT	hDPT-5'real hDPT-3'real	CGAGGAGCAACAACCACTTT CATATGTGGACACCCTCCTGT	60 °C
ENPP2	hENPP2-real1 hENPP2-real2	TCCTAATGCCACTCTGGACA ACTCGGAGAAACACGGACAT	60 °C
EPHA4	hEPHA4-real5' hEPHA4-real3'	GACAACTCATCCGCAACC TCCATTTAATGGCCTGGAG	60 °C
EZH2	hEZH2-ex7-real5' hEZH2-ex8-real3'	GCCATTTCTCAATGTTTCC TCCATCTATGTTGGGGGTACA	58 °C, 3step

Produkt	Primernamen	Primersequenz	PCR-Bedingungen
HPRT	huHPRT1 huHPRT2	TGACACTGGCAAAACAATGCA GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT	60 °C
MGP	hMGP-real5' hMGP-real3'	CCTTCATATCCCCTCAGCAG GCGTTCGCAAAGTCTGTAGTC	60 °C
NEFL	NEFL-RT-PCR-l NEFL-RT-PCR-r	CATCAGCGCTATGCAGGAC TAGGCAGATCGGCCAAAG	60 °C
NMYC	hMYCN-real1 hMYCN-real2	CACAAGGCCCTCAGTACCTC TTCTCCACAGTGACCACGTC	60 °C
NRG1	hNRG1-real-f hNRG1-real-r	TCAGTATCCACAGAAGGAGCAA ACTCCCCTCCATTACACAG	60 °C
OMD	hOMD-real5' hOMD-real3'	CACAACAAATTGAAGCAAGCA TTTGGTCCACACGAATGTATGT	60 °C
PLN	hPLN-real5' hPLN-real3'	CCCAGCTAAACACCCGTAAG AGCTGGCAGCCAAATATGAG	60 °C
PRAME	hPRAME-real1 hPRAME-real2	CGTGGCAACAAGTACTGAG TATCGGCTCTGAATGGAACC	64 °C, 3step
RAMP	hRAMP-real1 hRAMP-real2	TGGGCCTCTCAGAAGAAAA GGGGAAGAATTGGATGGATT	60 °C
RARB	hRARB-real1 hRARB-real2	CAAGCCTCACATGTTTCCAA ATGAGAGGTGGCATTGATCC	60°C
RARG	hRARG-real1 hRARG-real2	CAGCCCTACATGTTCCCAAG GCCTGGAATCTCCATCTTCA	60°C
RARRES1	hRARRES1-real1 hRARRES1-real2	CAACTGAAAAACCCCTTGGA GAAAGCCAAATCCCAGATGA	60°C
RARRES3	hRARRES3-real1 hRARRES3-real2	TGTGAGCAGGAACTGTGAGC GCCACACCAACTTCAACCTT	60°C
SFRP4	hSFRP4-real1 hSFRP4-real2	CGCTCAAGGATGATGCTTCT GAACTGTTCTCCGCTGTTC	60 °C
SRGN1	hSRGN1-real5' hSRGN1-real3'	GCCTTGAAGAAAAAGGACCA CCGAAGCCTGATCCAGAGTA	60 °C
SULF1	hSULF1-real5' hSULF1-real3'	TAAAGATGGAGGAAGCTATGACC CTTAGGCCTTGCCAGTTGA	60 °C
TNC	hTNC-real5' hTNC-real3'	CCGGTTACCTGCTGGTCTAT CCAGGCTGTAGGAGGTGGTA	60 °C
WNT2B	hWNT2B-real5' hWNT2B-real3'	CACCCGGACTGATCTTGCT GCCACAGCACATGATTTACA	60 °C
WTX	WTX-5'real WTX-3'real	GACAATAACCGGGCTAGGAAC GAGCAGCTTCATCCTTTTGG	60 °C

### 3.6. Zellkultur

#### 3.6.1. Verwendete Zelllinien

- BJ-5ta: humane Fibroblasten, die durch Überexpression von hTERT (Telomerase) immortalisiert wurden, ATCC-Nr: CRL-4001
- Wilms Tumor Primärkulturen

#### 3.6.2. Kultivierung

Alle Zelllinien wurden in DMEM10 bestehend aus DMEM (PAN) + 10 % FCS (PAN) + 1 % Penicillin (10000 U/ml)/Streptomycin (10000 µg/ml) (Gibco) auf Gewebekulturplatten bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Zum Passagieren wurden BJ- und primäre WT-Zellen mit PBS gespült, mit 0,25%igem Trypsin/1mM EDTA abgelöst und anschließend im Verhältnis 1:3 bis 1:5 neu ausgesät.

PBS: 140 mM NaCl  
2,7 mM KCl  
8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
pH 7,5

#### 3.6.3. Etablierung primärer Wilms Tumor-Kulturen

Primäre Wilms-Zellkulturen wurden aus frischem Tumormaterial angelegt. Das Tumorgewebe wurde nach Anlieferung einmal mit DMEM10 gespült, mit Hilfe eines Skalpells fein zerkleinert und 10 bis 15 min mit 10 ml 0,25%igem Trypsin/EDTA bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden das Trypsin durch Zugabe von 10 ml DMEM10 inaktiviert und das aufgeschlossene Tumormaterial nach Pelletieren in 3 ml DMEM10 auf einer 10 cm-Zellkulturschale ausplattiert. Sechs Stunden später wurde das Medium auf 10 ml aufgefüllt. Nach Übernacht-Inkubation wurden der Überstand abgenommen und frisches Medium zugegeben. Während der Kultivierung erfolgte alle zwei Tage ein Mediumwechsel. Sobald ein konfluenter Zellrasen entstanden war, wurden die Zellen 1:3 unter Verwendung von Trypsin gesplittet. Nach der 3. Passage erfolgte die Isolierung von DNA und RNA aus den Zellen. Für die Kryokonservierung wurden ca.  $5 \times 10^6$  Zellen in 1 ml Einfriermedium (DMEM mit 30 % FCS und 10 % DMSO) aufgenommen und langsam auf -80 °C gekühlt. Die langfristige Lagerung der eingefrorenen Zellen erfolgte in der Gasphase über flüssigem Stickstoff.

### 3.6.4. Immunhistochemie (IHC)

Immunhistochemische Untersuchungen wurden am Institut für Pathologie der Universität Würzburg durchgeführt. Es wurden zum einen formalinfixiertes und in Paraffin eingebettetes Tumorgewebe und zum anderen formalinfixierte und in Zellblöcke gegossene WT-Zellen analysiert. Die Expression der in Tabelle 7 aufgeführten Proteine wurde mit den entsprechenden Primärantikörpern getestet, der Nachweis erfolgte mit dem Advance™ HRP Detectionkit (K4068) von Dako.

**Tabelle 7: Antikörper für IHC**

Zielprotein	Klon	Firma	Verdünnung	Vorbehandlung
β-Catenin	C2206	Sigma-Aldrich	1:12000	CA6,0
CD56 (NCAM)	1B6	Novocastra	1:100	CA6,0
CD105 (Endoglin)	MEM-226	Immunotools	1:200	TR
CITED1	Rabbit polyclonal	NeoMarkers	1:100	CA6,0
Cytokeratin	CAM5.2	BD	1:5	CA6,0
Endosialin	TEM1	DKFZ Heidelberg [Christian 2008]	1:50	TR
Ki67	MIB-1	Dako	1:800	CA6,0
PAX5	24	BD	1:200	CA6,0
Vimentin	V9	Dako	1:8000	CA6,0
WT1	6F-H2	Novocastra	1:80	TR

BD: BD Biosciences, San Jose, CA USA; Dako, Hamburg, Germany; Immunotools, Friesoythe, Germany; NeoMarkers, Fremont, CA USA; Novocastra, Newcastle Upon Tyne, UK  
CA6,0: Citronensäure, pH 6,0; TR: Target Retrieval (Dako)

### 3.6.5. Retinsäurebehandlung

Primäre WT-Zellen aus sehr frühen Passagen (3. bis 5.) wurden für die Behandlung mit Retinoiden eingesetzt. Zellen von mindestens drei 10cm-Zellkulturplatten mit einem nahezu dichten Zellrasen wurden abgelöst und gezählt. Für eine 24stündige Inkubation wurden  $2 \times 10^6$  Zellen pro 10cm-Zellkulturplatte ausgesät, für eine viertägige Behandlung  $1 \times 10^6$  Zellen. Für die Untersuchung der Proliferationsgeschwindigkeit wurden je  $5 \times 10^4$  Zellen pro well einer 12well-Platte eingesetzt. Nachdem die Zellen über Nacht adhären konnten, erfolgte am nächsten Morgen die Zugabe der Retinoide: *all-trans* Retinsäure (ATRA), *9cis* Retinsäure

(9cisRA) und Fenretinid (4-Hydroxy(phenyl)retinamid, 4HPR) wurden jeweils in einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  verwendet. Alle stammten von Sigma-Aldrich und wurden in DMSO gelöst. Zusätzlich erhielten Zellen eine Kombination aus 10  $\mu\text{M}$  ATRA und 0,15  $\mu\text{M}$  N<sup>1</sup>-hydroxy-N<sup>8</sup>-phenyl-octanediamide (suberoylanilide hydroxamic acid, SAHA, Cayman Chemicals) bzw. 10  $\mu\text{M}$  4HPR und 0,15  $\mu\text{M}$  SAHA. Den Kontrollzellen wurde die entsprechende Menge DMSO (1  $\mu\text{l/ml}$ ) zugegeben. Alle zwei Tage erfolgte ein Mediumwechsel. Soweit nicht anders angegeben, wurden stets die hier genannten Retinoid-Konzentrationen verwendet.

Nach 24 Stunden erfolgte die RNA-Isolierung aus den unterschiedlich behandelten Kulturen. Nach viertägiger Behandlung wurde ein Teil der Zellen für Proteinisolierung eingesetzt, der andere Teil wurde mit Formalin fixiert und zur Herstellung von Zellblöcken mit anschließender immunhistochemischer Untersuchung verwendet.

Für Wachstumskurven wurden die Zellzahl in je zwei Wells pro Behandlung mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer ermittelt und der Mittelwert daraus gebildet. Der Tag der RA-Zugabe entsprach dabei Tag 0, weitere Zellzahlbestimmungen erfolgten alle zwei oder drei Tage.

### **3.6.6. Phalloidin-Färbung**

Zellen wurden in 12well-Platten auf Deckgläser ausgesät und wie angegeben behandelt. Nach der Fixierung mit PFA (2 % in PBS) für 20 min bei Raumtemperatur erfolgte die Permeabilisierung der Zellen mit PBS-T (PBS, 0,2 % Tween) für 10 min. Daran schloss sich die 45minütige Inkubation mit 15  $\mu\text{g/ml}$  FITC-konjugiertem Phalloidin (Sigma-Aldrich) zur Färbung der Aktin-Filamente an. Nach einem ersten Waschschriff mit PBS wurden die Zellkerne mit Hoechst 33342 (Invitrogen, Verdünnung 1:10000) gegengefärbt und nach weiterem gründlichem Waschen erfolgte das Einbetten der Deckgläser mit Mowiol. Die Auswertung der Färbung erfolgte mit dem Invers-Mikroskop DMI 6000B (Leica) und der dazugehörigen Software (Leica Application Suite 1.7.0).

### **3.6.7. Seneszenz-assoziierte $\beta$ -Gal-Färbung (SA- $\beta$ -Gal)**

Zellen wurden in 6well-Platten kultiviert, einmal mit PBS pH 7,2 gewaschen und für 10 min mit 0,5 % Glutaraldehyd (in PBS pH 7,2) bei Raumtemperatur fixiert. Nach dem folgenden Spülen mit PBS (pH 7,2)/ 1 mM  $\text{MgCl}_2$  wurden 1,2 ml Färbelösung pro well zugegeben. Die Farbreaktion verlief im Dunkeln bei 37 °C und konnte nach 3-5 Stunden durch Zugabe von PBS (pH 7,2) gestoppt und im Anschluss ausgewertet werden.

Färbelösung: 1 mg/ml X-Gal  
0,12 mM  $K_3Fe(CN)_6$   
0,12 mM  $K_4Fe(CN)_6$   
1 mM  $MgCl_2$   
in PBS pH 6,0

### 3.7. Proteinanalysen

#### 3.7.1. Proteinisolierung

Zur Proteinisolierung aus Zellkulturen wurde das Zellpellet in 20-100  $\mu$ l RIPA-Puffer aufgenommen, 45 min auf Eis lysiert und anschließend 30 min bei 4 °C mit 14000 rpm abzentrifugiert. Die Bestimmung der Proteinkonzentration des Überstandes erfolgte nach der Bradford-Methode. Dafür wurden je 1  $\mu$ l des Lysats mit 1 ml 1x Färbelösung (5x Bradford Protein Assay, Bio-Rad, mit Wasser verdünnt) gemischt und die Fluoreszenz im Photometer bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen. Eine BSA-Standard-Reihe mit Konzentrationen von 25; 12,5; 6,25; 3,125 und 1,5625 mg/ml wurde zur Berechnung der Proteinkonzentration herangezogen.

RIPA-Puffer: 150 mM NaCl  
100 mM Tris-HCl, pH 7,4  
2 % NP40  
1 % Natriumdeoxycholat  
0,2 % SDS  
direkt vor Verwendung Zugabe von PMSF (50  $\mu$ g/ $\mu$ l) und Proteaseinhibitoren (complete Protease Inhibitor Cocktail, Roche, 25x stock)

#### 3.7.2. SDS-PAGE

Die Auftrennung der Proteine erfolgte über eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Die Gele bestanden aus einem Sammel- und einem 10%igen Trenngel. Gleiche Proteinmengen der einzelnen Proben wurden mit 4x SDS-Probenpuffer und DTT (Endkonzentration 0,1 M) versetzt und vor dem Auftragen auf das Gel zum Denaturieren für 5 min auf 95 °C erhitzt. Der PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas) wurde als Größenstandard eingesetzt. Die Elektrophorese erfolgte mit dem Multigel System (Biometra).

2 Trenngele (10 %):	5 ml	H <sub>2</sub> O
	4 ml	Rotiphorese® Gel 30 (Roth)
	5,7 ml	1 M Tris, pH 8,8
	75 µl	20 % SDS
	6 µl	TEMED
	150 µl	10 % APS
2 Sammelgele:	4 ml	H <sub>2</sub> O
	1 ml	Rotiphorese® Gel 30 (Roth)
	750 µl	1 M Tris, pH 6,8
	30 µl	20 % SDS
	6 µl	TEMED
	60 µl	10 % APS
4x SDS-Probenpuffer:	0,2 M	Tris pH 6,8
	8 %	SDS
	0,25 mg/ml	Bromphenolblau
	50 %	Glycerin
10x SDS-Laufpuffer:	250 mM	Tris
	1,92 M	Glycin
	1 %	SDS
		pH 8,3

### 3.7.3. Western-Blot

Die über SDS-PAGE separierten Proteine wurden in einer wet-Blot-Kammer (Criterion, Bio-Rad) über Nacht bei 4 °C elektrophoretisch (100 mA, 15 V) aus dem Gel auf eine Nitrocellulose-Membran (PROTRAN, Porengröße 0,45 µm, Schleicher & Schuell) übertragen.

Blot-Puffer: 25 mM Tris  
150 mM Glycin  
10 % Methanol  
pH 8,3

Im Anschluss wurden freie Bindungsstellen auf der Membran mit 5 % Milchpulver in PBS geblockt. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte über Nacht bei 4 °C in der in Tabelle 8 angegebenen Verdünnung. Nach gründlichem Waschen mit PBS wurde die Membran mit dem entsprechenden Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach abschließenden Waschschrinen mit PBS erfolgte der Nachweis der Protein-Antikörper-Komplexe durch Zugabe von ECL-Lösung (enhanced chemiluminescence) über Chemiluminszenz auf Röntgen-Filmen.

**Tabelle 8: Antikörper für Western-Blot**

Zielprotein	Klon	Firma	Verdünnung	Wirt	Nachweis
gespaltenes PARP	F21-852	BD Pharmingen, Heidelberg	1:2000 in PBS-T	Maus	
$\beta$ -Actin	C4	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg	1:10000 in PBS-T	Maus	
Maus IgG	(AP124P) polyklonal	Chemicon, Hofheim	1:5000 in PBS	Ziege	HRP konjugiert

ECL-Lösung: 100 mM Tris-HCl, pH 8,0  
 250 mM Luminol  
 90 mM Cumarinsäure  
 3  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (35 %) zu 10 ml ECL geben

### 3.8. Microarray-Analyse

Untersuchungen zur globalen Genregulation in WT-Zellen unter ATRA-Behandlung erfolgten in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Susanne Kneitz (Microarray core unit, IZKF Würzburg). Die Genexpression von unbehandelten Wilms Tumor-Zellen wurde mit der nach viertägiger ATRA Gabe (10  $\mu$ M) verglichen. Die Gesamt-RNA der Zellen wurde mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen) isoliert. Die Proben wurden mit Hilfe des Human Genome U133 Plus 2.0 Gene Chip (Affymetrix) analysiert.

### 3.9. Statistik

Die statistische Datenauswertung erfolgte mit der Software SPSS 16.0. Der Chi-Quadrat-Test ( $\chi^2$ -Test) wurde verwendet, um die Korrelation von WTX-Deletionen mit klinischen Parametern von Wilms Tumoren zu überprüfen. Mit dem Mann-Whitney-U-Test wurde die Genexpression in den entsprechenden WT-Klassen (Metastasen-, Rezidiventwicklung, Mortalität, Ansprechen auf Chemotherapie oder Histologischer Subtyp) miteinander verglichen. Dieser Test wurde ebenso zur Analyse des Einflusses von RA-Behandlung auf die Zellgröße eingesetzt.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. WTX-Veränderungen in Wilms Tumoren

Da frühere Untersuchungen zur Veränderung von WTX in Wilms Tumoren nur auf relativ kleinen Probenkollektiven basierten [Perotti 2008; Rivera 2007], sollte in einem großen Tumorset die Häufigkeit von WTX-, CTNNB1- und WT1-Mutationen überprüft werden. Dafür wurden sowohl WTX-Deletionen und Punktmutationen in genomischer Tumor-DNA als auch das Expressionsniveau auf RNA-Ebene analysiert.

#### 4.1.1. WTX-Deletionen

Wie erste Publikationen zeigten, wird eine WTX-Inaktivierung in erster Linie durch Deletion verursacht. Um deren Häufigkeit zu überprüfen, wurde ein Tumorset von 429 Patienten (219 männlich, 210 weiblich) auf einen genomischen WTX-Verlust überprüft.

Da der Chromosomensatz männlicher Patienten nur ein X-Chromosom enthält, konnte deren Tumor-DNA per PCR auf das Vorhandensein von DNA-Fragmenten untersucht werden – bei Verlust des einzigen WTX-Allels fand hier keine Amplifikation statt. Dafür wurden Primer eingesetzt, die spezifisch für die 5'UTR des Exons 1 bzw. die 3'-Region am Ende des einzigen codierenden Exons 2 von WTX waren. Jeder PCR-Ansatz enthielt zur internen Effizienzkontrolle Primer für das Exon 3 von CTNNB1, da in dieser Region bisher nie genomische Deletionen gefunden wurden. 35 der 219 analysierten Proben zeigten eine – mindestens partielle – Deletion der WTX-Region. In zwei Fällen war nur die 5'-Region betroffen, während das codierende Exon 2 nicht betroffen war, acht Proben wiesen einen Verlust der codierenden Region bei gleichzeitigem Erhalt der 5'UTR auf und in 25 Fällen waren beide untersuchten Bereiche betroffen (siehe Tab. 9).

Da Tumoren weiblicher Patienten in der Regel zwei X-Chromosome aufweisen, wurde der Verlust eines Allels in der Region Xq11.1 anhand einer LOH-Analyse unter Verwendung zweier polymorpher Dinukleotid-Marker überprüft: Marker WTX-(AC)<sub>n</sub> im Intron 1 und WTX-(TA)<sub>n</sub> in der 3'UTR von WTX. Der Marker WTX-(AC)<sub>n</sub> war nur in 20 % der Proben informativ und in 30 der 210 Fälle waren beide Marker nicht aussagekräftig, d. h., die Patientin zeigte für beide untersuchten Marker einen homozygoten Status.

Von den auswertbaren 180 Tumoren zeigten 33 einen Allelverlust in der WTX-Region, am häufigsten war dabei die 3'-Region betroffen. Um ausschließen zu können, dass ein Verlust

des gesamten X-Chromosoms und damit kein WTX-spezifischer Effekt vorliegt, wurden zwei weitere Marker herangezogen: DXS992 (Xp21.2) und ein Trinukleotid-Marker im Gen des Androgen-Rezeptors (AR, Xq12). In 28 der 33 Proben waren diese beiden Marker nicht von LOH betroffen, was für einen begrenzten Verlust genetischen Materials und WTX als relevantes Ziel spricht. In vier Fällen zeigte neben WTX nur ein weiterer Marker Allelverlust und in einem Tumor waren zusätzlich zu WTX auch DXS992 und AR betroffen, was auf den Verlust des ganzen X-Chromosoms hindeutet.

Für alle männlichen Patienten, die einen WTX-Verlust im Tumorgewebe aufwiesen, wurde zusätzlich Kontrollgewebe (Blut bzw. Niere) überprüft. Hier konnte jedoch nie eine Deletion der WTX-Region nachgewiesen werden. Wie auch in den Tumoren weiblicher Patienten waren WTX-Deletionen also tumorspezifisch und traten in 16,0 % der männlichen und 18,3 % der weiblichen Fälle auf. Eine Zusammenfassung der Deletionsuntersuchung bietet Tabelle 9.

**Tabelle 9: WTX-Verlust in Wilms Tumoren**

<b>Männlich</b>	<b>Deletion</b>		<b>35/219</b>	<b>16,0 %</b>
	Exon1	Exon2		
	del	wt	2/219	0,9 %
	wt	del	8/219	3,7 %
	del	del	25/219	11,4 %
	<b>keine Deletion, keine Expression*</b>		<b>14/107</b>	<b>13,1 %</b>
<b>Weiblich</b>	<b>Allelverlust in informativen Fällen</b>		<b>33/180</b>	<b>18,3 %</b>
	Intron 1, WTX-(AC) <sub>n</sub>	3'UTR, WTX-(TA) <sub>n</sub>		
	LOH	het	6/180	3,3 %
	LOH	N	1/180	0,6 %
	het	LOH	0/180	0,0 %
	N	LOH	21/180	11,7 %
	LOH	LOH	5/180	2,8 %
		<b>Heterozygot, keine Expression*</b>		<b>9/93</b>
	<b>LOH nicht informativ, keine Expression*</b>		<b>6/43</b>	<b>14,0 %</b>

wt: Wildtyp, del: deletiert, LOH: Allelverlust, het: heterozygot, N: nicht informativ

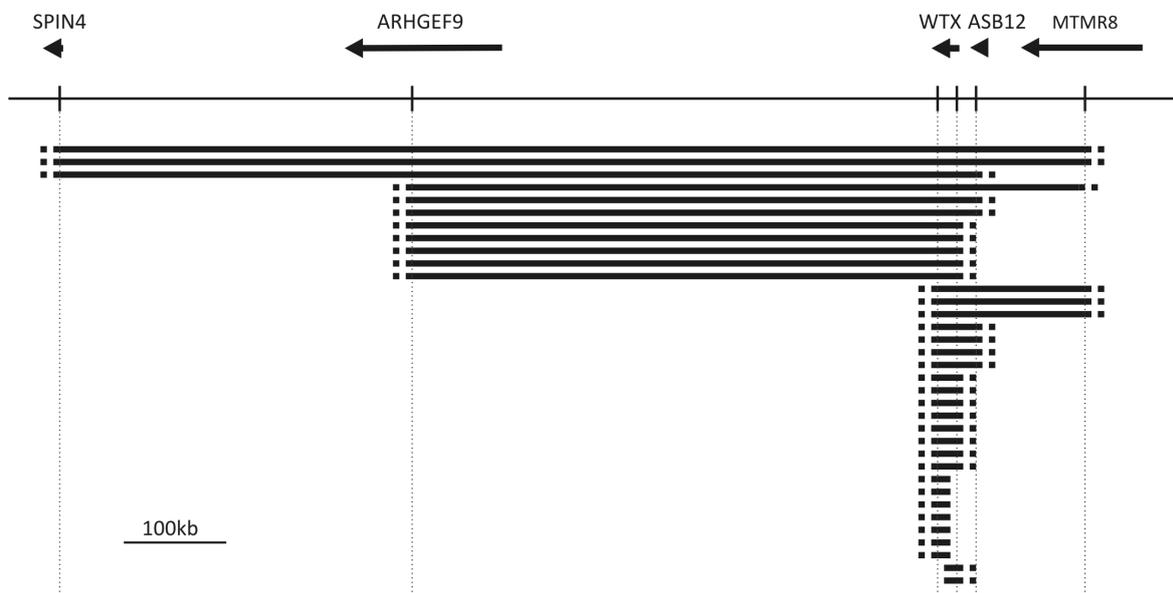
\* Expressionsanalyse beschrieben in 4.1.3.

#### 4.1.2. Größe der deletierten Region

Um einen Eindruck von den Ausmaßen der deletierten Region zu bekommen, wurden die 35 Tumorproben männlicher Patienten, die einen WTX-Verlust aufwiesen, näher untersucht. Bereiche aus je zwei Genen die von WTX aus in Richtung Telomer (ASB12, MTMR8) und in Richtung Zentromer (ARHGEF9, SPIN4) liegen, wurden aus genomischer Tumor-DNA per PCR

amplifiziert. Auch hier wurden Primer für das Exon 3 von CTNNB1 im gleichen PCR-Ansatz als interne Kontrolle eingesetzt. In Abbildung 5 sind die Ergebnisse schematisch dargestellt.

In 18 der 35 Tumoren waren die Verluste auf WTX beschränkt: In zwei Fällen war nur die 5' UTR, in acht nur das Exon 2 und in weiteren acht Fällen die gesamte WTX-Region betroffen. In 17 Tumorproben fehlte mindestens eines der benachbarten Gene, wobei nur in zwei Fällen die gesamte 1 Mb umfassende Region mit allen fünf Genen deletiert war. In einem dieser Tumoren ging wahrscheinlich das komplette X-Chromosom verloren, da auch für die weit entfernten Regionen von DMD (Xp21.2) und Faktor VIII (Xq28) kein PCR-Fragment amplifiziert werden konnte.



**Abbildung 5: Größe der deletierten Region**

Tumorproben männlicher Patienten mit einer WTX-Deletion wurden mit Hilfe von PCR auf den Verlust benachbarter Gene (SPIN4, ARHGEF9, ASB12 und MTMR8) untersucht, um die Größe der betroffenen Region abzuschätzen. Die Pfeile geben die Transkriptionsrichtung der jeweiligen Gene an.

#### 4.1.3. WTX-Expressionsanalyse

Ein funktioneller WTX-Verlust kann nicht nur durch die oben aufgeführten Deletionen des genetischen Materials, sondern auch durch epigenetische Veränderungen hervorgerufen werden, die zur Reduktion bzw. Verhinderung der WTX-Expression führen.

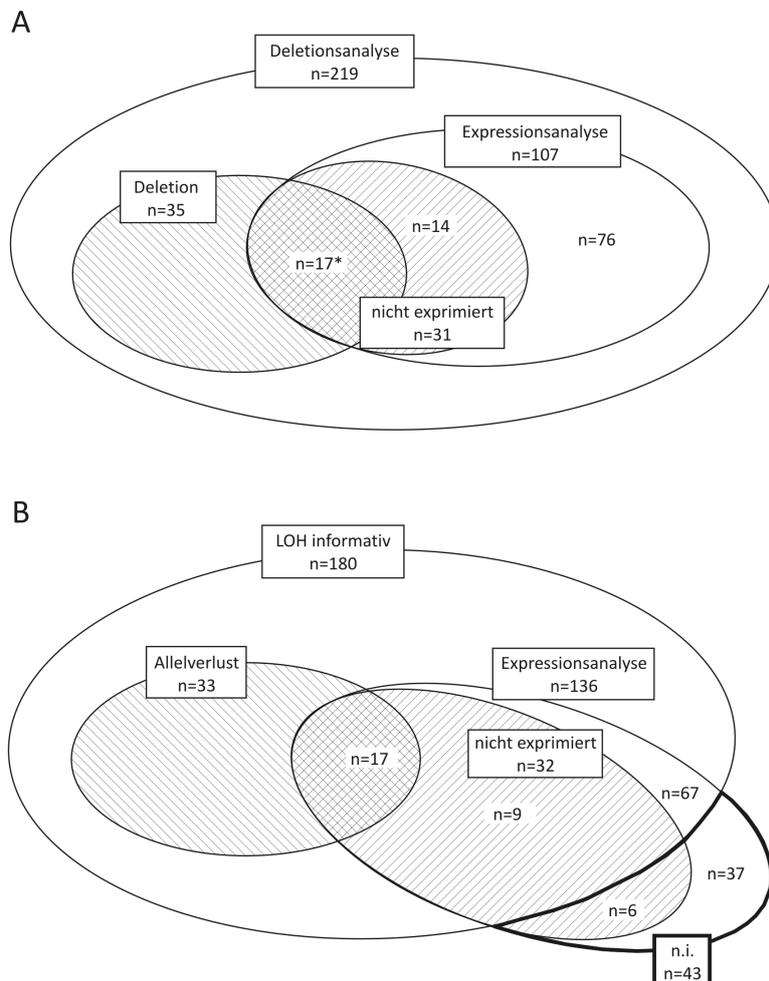
Um diesen Aspekt näher zu beleuchten, wurde das Expressionsniveau von WTX mit Hilfe quantitativer Realtime-RT-PCR für 243 WT-Proben, von denen 34 (17 männliche, 17 weibliche) eine genomische WTX-Deletion hatten, analysiert. Die Primer für diese

Untersuchungen waren so gewählt, dass sie beide WTX-Spliceformen amplifizierten. Die hierfür verwendete cDNA wurde mit random hexamer-Primern synthetisiert.

Für 25 Proben mit WTX-Deletion bzw. LOH konnte, wie erwartet, keine oder nur eine sehr schwache WTX-Expression nachgewiesen werden. Drei der 17 männlichen Patienten zeigten jedoch eine normale RNA-Expression, obwohl kein WTX-spezifisches PCR-Produkt von der genomischen DNA amplifiziert werden konnte. Für den ersten dieser Tumoren konnte ein PCR-Produkt für die 5'-Region, jedoch nicht aus dem codierenden Exon 2 detektiert werden. In diesem Fall schien der Beginn des deletierten Bereichs zwischen nt 28 der codierenden Region (Primerbindungsstelle für Realtime-RT-PCR) und nt 756 (Primerbindungsstelle für Deletionsanalyse) zu liegen. Dadurch fand wahrscheinlich die Expression einer verkürzten, aber nachweisbaren WTX-mRNA statt. Im zweiten Fall wurden DNA und RNA aus verschiedenen Tumorregionen isoliert. Beim Vergleich der DNA aus beiden Proben zeigte sich ein Allelverlust nur in einer, während für die zweite Tumorprobe ein WTX-spezifisches PCR-Produkt vorhanden war. Dies deutete auf einen unvollständigen WTX-Verlust innerhalb des Tumors hin, wobei in manchen Regionen das funktionsfähige WTX erhalten blieb. Im dritten Fall wurden DNA und RNA zwar aus dem gleichen Tumorstück gewonnen, jedoch konnte hier in der Deletionsanalyse ein schwaches WTX-Signal nachgewiesen werden. Die Ursache dafür könnte zum einen ebenfalls ein unvollständiger Verlust des genetischen Materials sein, zum anderen kommt auch eine Kontamination mit normalen Zellen (z. B. Immunzellen) in Betracht.

Sechs der Tumoren von Patientinnen mit partiellem Allelverlust zeigten eine normale WTX-Expression. Die Gründe hierfür könnten entweder das Vorhandensein einer Zellpopulation mit unverändertem WTX-Allel oder der Verlust der WTX-Region des inaktiven X-Chromosoms sein. Das Fehlen oder eine starke Reduktion der WTX-Expression beschränkte sich nicht nur auf Fälle mit genomischem WTX-Verlust. In Tumorproben von 14 der 107 männlichen Patienten konnte ebenfalls keine WTX-mRNA detektiert werden, obwohl die entsprechende Region auf DNA-Ebene nachweisbar war. Das gleiche Bild ergab sich in neun von 93 Tumoren von Patientinnen, bei denen keine WTX-Expression trotz heterozygoten Status' der DNA auftrat. Auch in sechs der 43 Proben, in denen die LOH-Untersuchung nicht informativ war (für beide Marker homozygot), konnte keine WTX-Expression detektiert werden.

Zusammengefasst zeigten 13,1 % (männliche) bzw. 9,7 % (weibliche) der untersuchten Wilms Tumoren keine oder nur eine sehr schwache WTX-Expression. Eine Übersicht aller Ergebnisse aus den Deletions- und Expressionsuntersuchungen bieten Tab. 9 und Abb. 6.



**Abbildung 6: Häufigkeit von WTX-Veränderungen**

WTX-Deletionen wurden in Tumoren männlicher (A) und weiblicher (B) Patienten auf DNA-Ebene mittels PCR- bzw. LOH-Analysen untersucht („Deletionsanalyse“). Die WTX-Expression wurde über qRT-PCR bestimmt („Expressionsanalyse“).

n: Anzahl der Proben in der jeweiligen Gruppe,  
n.i. LOH-Analyse nicht informativ

\* Es sind drei Tumورproben enthalten, die trotz Deletion auf DNA-Ebene WTX-Expression zeigen. Nähere Erläuterungen zu diesen Fällen im Text.

#### 4.1.4. Punktmutationen im WTX-Gen

Da bisher funktionelle Punktmutationen ausschließlich im Bereich der DNA-Sequenz, die für die aminoterminalen 2/3 des Proteins codiert, gefunden wurden, erfolgte eine Sequenzierung dieses Bereiches. Es wurden 104 Tumorproben (von 99 männlichen und fünf weiblichen Patienten) untersucht. Tabelle 10 fasst die aufgetretenen WTX-Punktmutationen sowie den parallel erhobenen CTNNB1- und WT1-Status der betroffenen Patienten zusammen. Vier der Proben zeigten einen bereits bekannten SNP (T477G, ref SNP ID: rs34677493) und ein Tumor (ws390) wies einen Nukleotidaustausch (C135T → Ser45Ser) auf, der keine Änderung der Aminosäuresequenz zur Folge hatte. Für den Tumor ws394 wurde

eine Insertion von vier Nukleotiden an Position 1007 detektiert, welche zum Rasterschub und einem vorzeitigen Stop-Codon bei AS378 führte. Der Tumor einer Patientin (ws609) präsentierte eine heterozygote nonsense-Mutation C1057T → Arg353Stop, die ebenfalls eine Verkürzung des WTX-Proteins hervorruft. Die drei letzten Mutationen waren tumorspezifisch, also nicht im normalen Kontrollgewebe nachweisbar, auch wenn die C135T Mutation (ws390) keine Auswirkungen auf die Aminosäuresequenz von WTX hatte.

Insgesamt konnten nur in 2 % (2 von 104) der untersuchten Proben tumorspezifische Mutationen detektiert werden, die die Synthese eines unvollständigen WTX-Proteins zur Folge hatten.

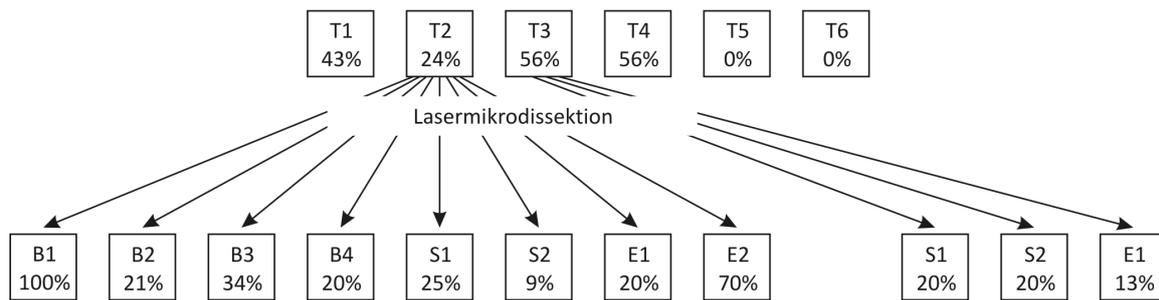
**Tabelle 10: Veränderungen der WTX-Sequenz in 104 untersuchten WT-Proben**

Tumor	Geschlecht	CTNNB1	WT1	WTX
ws104	m	wt	C892T (het), Gln298Stop	T477G (SNP)
ws133	m	wt	wt	T477G (SNP)
ws390	m	wt	wt	C135T, Ser45Ser
ws394	m	wt	wt	Ins1007AGGA, 378Stop
ws417	m	wt	wt	T477G (SNP)
ws536	m	wt	wt	T477G (SNP)
ws609	w	wt	wt	C1057T (het), Arg353Stop

m: männlich, w: weiblich, wt: Wildtyp

#### 4.1.5. Heterogenität von WTX-Mutationen

Während der LOH-Analyse der Tumoren weiblicher Patienten traten zum Teil partielle Allelverluste auf, die auf eine gemischte Tumorzellpopulation in Bezug auf die WTX-Veränderungen hindeuteten. Diese Heterogenität wurde im Tumor ws609 mit der Punktmutation C1057T → Arg353Stop näher untersucht. Für diesen Tumor waren sechs Proben aus verschiedenen Regionen vorhanden. Bei der Untersuchung der WTX-Mutation wurde eine deutliche Heterogenität sichtbar (siehe Abb. 7): Zwei Regionen (T5, T6) zeigten genau wie das Kontrollgewebe das Wildtyp-Allel, für drei Regionen (T1, T3, T4) konnte eine typische heterozygote Mutation nachgewiesen werden, während in einer Region (T2) der Anteil an mutiertem WTX bei nur ca. 25 % lag.

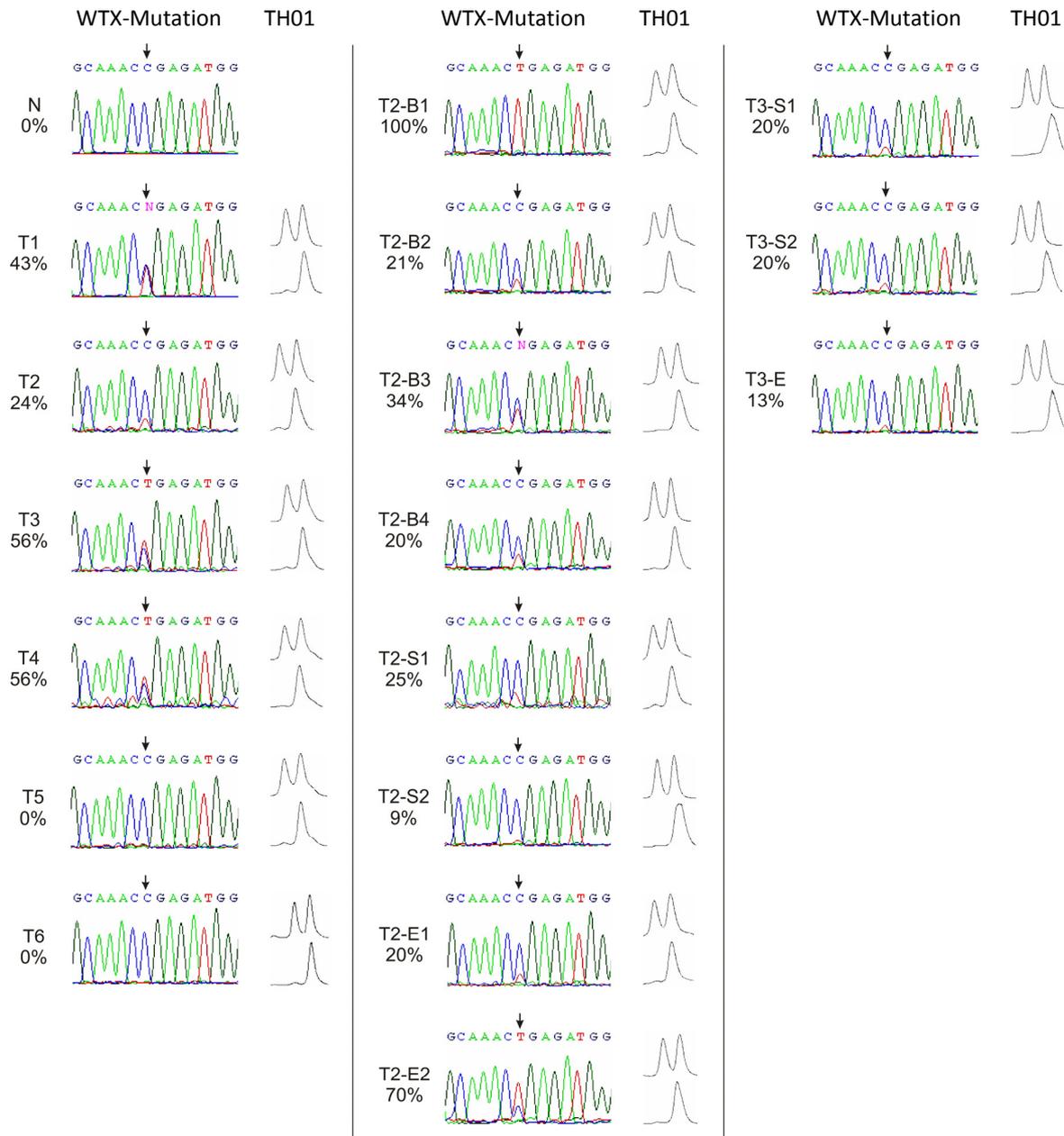


**Abbildung 7: Heterogenität der WTX-Punktmutationen im Tumor einer Patientin (ws609)**

Sechs Proben (T1-T6) aus verschiedenen Regionen eines WT zeigten eine sehr variable Penetranz der Punktmutation C1057T → Arg353Stop. Aus den Proben T2 und T3 wurden per LCM Blastem- (B), Stroma- (S) und Epithel- (E) Anteile isoliert, die ebenfalls sehr heterogen in Bezug auf den WTX-Mutationsstatus waren. Angegeben ist der Anteil an mutiertem WTX in %.

Um zu untersuchen, ob der Mutationsstatus von der histologischen Zusammensetzung des Tumors abhing, wurden die Regionen T2 und T3 einer lasergestützten Mikrodissektion unterzogen. T2 war vom typischen gemischten Typ, aus dem Blastem-, Epithel- und Stromabereiche separiert werden konnten. T3 bestand nur aus Stroma- und Epithelgewebe, die ebenfalls isoliert wurden. Nach Gewinnung und Amplifikation der gesamten genomischen DNA mit dem GenomiPhi Kit wurde der WTX-Mutationsstatus in allen Bereichen analysiert. Wiederum konnte eine große Heterogenität zwischen den Proben festgestellt werden, die vom Wildtypstatus (T2-S2, Stroma) bis zu homozygoter Mutation (T2-B1, Blastem) reichte. Dabei hing der Mutationsstatus nicht vom Zelltyp ab: in Blastemregionen wurden 20-100 %, in Epithel 13-70 % und in Stromabereichen 9-25 % mutiertes WTX gefunden. Die großen Schwankungen waren nicht durch Kontamination mit normalem Gewebe verursacht, da alle Proben einen vollständigen LOH im Bereich des Markers TH01 auf dem Chromosom 11 aufwiesen. In Abbildung 8 sind die Chromatogramme und LOH-Ergebnisse der einzelnen Regionen gegenübergestellt.

Von dem zweiten Tumor mit einem verkürzten WTX (ws394, Ins1007AGGA → 378Stop) waren drei verschiedene Tumorstücke vorhanden, die jedoch alle die gleiche hemizygoter Mutation zeigten.



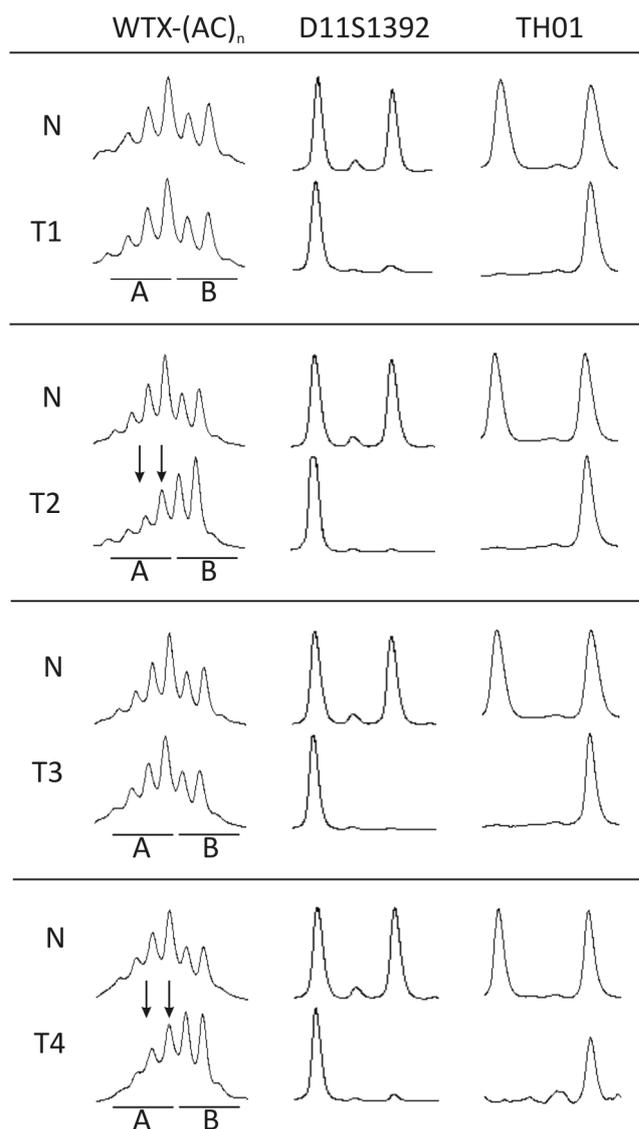
**Abbildung 8: Mosaik-Punktmutation im WT einer Patientin (ws609)**

Sechs Proben aus verschiedenen Tumorregionen (T1-T6) zeigten eine sehr variable Penetranz der Mutation C1057T → Arg353Stop (mit Pfeil markiert). Blastem- (B), Stroma- (S) und Epithel- (E) Komponenten wurden per LCM aus den Tumorregionen T2 (mittlere Spalte) und T3 (rechte Spalte) isoliert und auf den WTX-Status überprüft. Die WTX-Mutation war dabei nicht auf einzelne Gewebetypen beschränkt, alle zeigten eine große Heterogenität in Bezug auf den Anteil an mutiertem WTX (in % angegeben). Die Herkunft aller DNA-Proben aus Tumormaterial konnte durch den vollständigen LOH im Bereich des Markers TH01 gezeigt werden.

Eine uneinheitliche WTX-Veränderung wurde nicht nur für die Punktmutation im Tumor ws609 gefunden. 13 Tumoren von Patientinnen mit LOH der WTX-Region wurden genauer untersucht. Dabei zeigte einer (ws348) mit LOH im Intron 1 von WTX einen heterogenen Allelverlust: In zwei Tumorregionen (T1, T3) waren beide Allele vorhanden, während in zwei

anderen Regionen (T2, T4) ein nahezu kompletter Verlust eines Allels auftrat. Auch in diesem Fall konnte durch den kompletten LOH für die Marker D11S1392 und TH01 in allen Tumorregionen sichergestellt werden, dass die isolierte DNA von Tumor- und nicht von normalem Nierengewebe stammte (siehe Abb. 9).

Diese Ergebnisse legten nahe, dass es einige Wilms Tumoren gibt, in denen nur ein Teil der Tumorzellen von Mutation bzw. Deletion des WTX-Gens betroffen sind.



**Abbildung 9: Unvollständige WTX-Deletion im Tumor einer Patientin (ws348)**

Vier Proben (T1-T4) aus unterschiedlichen Tumorregionen wurden auf den Allelverlust im Bereich des Intron 1 (Marker WTX-(AC)<sub>n</sub>) untersucht. In zwei Proben (T1, T3) waren zwei Allele vorhanden, während in T2 ein vollständiger und in T4 ein partieller Verlust des Allels A auftrat (durch Pfeile markiert). Die Kontamination mit normalem Gewebe konnte durch den LOH auf Chromosom 11 (Marker D11S1392, TH01) ausgeschlossen werden.

N = DNA aus Kontrollgewebe,  
T = DNA aus Tumorgewebe

#### 4.1.6. WTX-, CTNNB1- und WT1-Mutationen

Um den Zusammenhang von WTX-Veränderungen und CTNNB1- bzw. WT1-Mutationen zu überprüfen, wurde die Gensequenzen von CTNNB1 und WT1 in einem Teil der Patienten untersucht. Für einige der Tumorproben lagen WT1-Sequenzierungen bereits aus früheren

Arbeiten vor [Zirn 2005b], von den verbleibenden 180 Tumorproben wurden entweder jedes Exon separat aus genomischer DNA oder mindestens acht Exons (1-4, 6-9) aus cDNA sequenziert. Für CTNNB1 wurde nur Exon 3 untersucht, in welchem die für WT typischen Mutationen auftreten.

Dabei stellte sich heraus, dass sich WTX-Veränderungen und CTNNB1/WT1-Mutationen nicht, wie ursprünglich vermutet, ausschließen. In 6,6 % (6/91) der Fälle traten sie gemeinsam mit CTNNB1-Mutationen auf. Auch wenn der Anteil etwas geringer ist als 10,9 % (37/338) bei Tumorproben mit Wildtyp-WTX, war der Unterschied statistisch nicht signifikant ( $p=0,218$ ). Das gleiche Bild ergab sich für WT1, wo Mutationen in 9,4 % (6/64) zusammen mit WTX-Verlust und in 10,0 % (25/250) in Tumoren mit normalem WTX vorlagen.

**Tabelle 11: Häufigkeit von CTNNB1- und WT1-Mutationen in WT mit WTX-Veränderung**

Geschlecht	WTX-Status	mutiertes CTNNB1		mutiertes WT1	
männlich	Deletion	2/35	5,7 %	1/22	4,5 %
	keine Expression	0/14	0,0 %	2/11	18,2 %
	normal	17/169	10,1 %	12/116	10,3 %
weiblich	Allelverlust	4/33	12,1 %	2/25	8,0 %
	keine Expression	0/9	0,0 %	1/6	16,6 %
	normal	20/169	11,8 %	13/134	9,7 %

#### 4.1.7. Korrelation von WTX-Veränderungen und klinischen Parametern

Obwohl die Heilungsraten für WT bereits hoch sind, besteht für die Therapieoptimierung weiterer Bedarf nach geeigneten Markern zur Stratifizierung der Tumoren und für eine prognostische Risikobewertung. Es wurden deswegen sowohl WTX-Deletionen als auch das Expressionsniveau auf einen Zusammenhang mit den klinischen Parametern histologischer Subtyp, Ansprechen auf Chemotherapie, Entstehung von Metastasen oder Rezidiv sowie krankheitsbedingter Tod des Patienten untersucht. Wie in Tabelle 12 zusammengefasst, konnte weder für WTX-Verlust noch für das Expressionsniveau eine Korrelation nachgewiesen werden ( $p>0,05$ ). Unter diesem Aspekt scheint der WTX-Status nicht zur Stratifizierung geeignet zu sein.

Tabelle 12: Zusammenhang von WTX-Verlust bzw. -Expression und klinischen Parametern der WT

	Histologischer Subtyp (geringes/mittleres – hohes Risiko)	Ansprechen auf Chemotherapie (schlecht – gut)	Auftreten von Metastasen (nein – ja)	Auftreten von Rezidiv (nein – ja)	Tod (nein – ja)
<b>WTX-Deletion/LOH</b> ( $\chi^2$ -Test)	76/242 – 7/43 p=0,265	18/47 – 19/74 p=0,142	71/299 – 13/72 p=0,300	74/316 – 10/50 p=0,593	80/344 – 4/23 0,517
<b>WTX-Expression</b> (Mann-Whitney-Test)	p=0,358	p=0,827	p=0,962	p=0,500	p=0,828

Angegeben sind die Häufigkeit eines WTX-Verlusts für die jeweiligen Gruppen sowie die entsprechenden p-Werte für die Korrelation von WTX-Verlust bzw. -Expressionslevel und den klinischen Parametern der WT.

## 4.2. Etablierung und Charakterisierung primärer Wilms Tumor-Kulturen

Repräsentative und aussagekräftige Zellkultur-Modelle sind eine wichtige Voraussetzung für *in vitro*-Versuche, die im Falle des Nephroblastoms jedoch nicht etabliert sind. Um der Heterogenität dieses Tumors Rechnung zu tragen, sollten aus einer Vielzahl verschiedener Wilms Tumoren primäre Zellkulturen angelegt und diese anschließend charakterisiert werden.

### 4.2.1. Kultivierung primärer Zellen

Frisches, vitales Tumormaterial stand von 56 Patienten, darunter drei mit bilateralem Wilms Tumor, zur Verfügung. Zum Teil waren Proben aus verschiedenen Tumorregionen vorhanden. Alle mit Ausnahme von zwei primäroperierten Patienten erhielten eine präoperative Chemotherapie nach dem SIOP/GPOH-2001 Protokoll. Die Klassifizierung des Tumorgewebes erfolgte zur Sicherung der Diagnose eines Wilms Tumors durch den Referenzpathologen.

Aus Proben von zwölf Patienten gelang keine Kultivierung vitaler Zellen. Sieben dieser Tumoren wurden histologisch als regressiv eingestuft, ein Tumor war komplett nekrotisch, zwei vom Mischtyp, einer blastemreich und einer wurde nachträglich als Nicht-Wilms Tumor klassifiziert. Aus 47 Tumorproben mit folgender histologischer Klassifizierung konnten vitale Zellen gewonnen werden: Mischtyp (12), stromareich (6), blastemreich (5), epithelial (3), diffuse Anaplasie (3), regressiv (13), nekrotisch (1), Mesoblastisches Nephrom (1), Nephroblastomatose (1) und aus Nicht-Wilms Tumoren (2). Der histologische Subtyp des jeweiligen Tumors lässt also keine Schlussfolgerung auf die Kultivierbarkeit des Materials zu, da aus allen Tumorklassen eine Kultivierung möglich war.

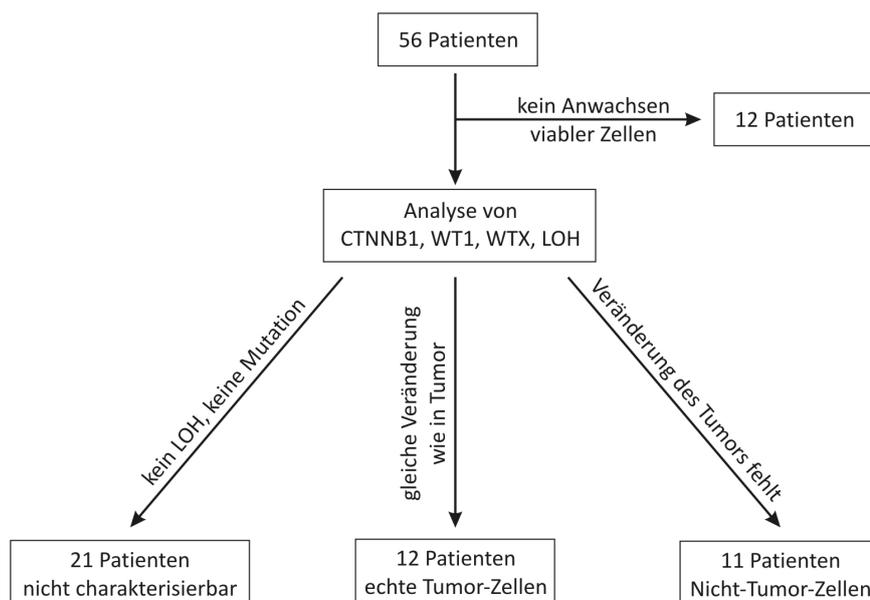
### 4.2.2. Molekulargenetische Charakterisierung der Primärkulturen

Für eine molekulargenetische Klassifizierung wurden DNA und RNA aus den Primärzellen nach der dritten Passage isoliert. Parallel dazu wurden die entsprechenden Tumorproben untersucht, um die Anzucht echter Tumorzellen sicher zu stellen.

Für die Charakterisierung wurden das Exon 3 von CTNNB1, die Exons 1 bis 10 von WT1 und die N-terminale Region von WTX sequenziert. Des Weiteren wurden LOH-Untersuchungen für die Regionen 7p, 9q, 11p, 11q, 14q und 16q herangezogen. Der Verlust einer Kopie des WTX-Gens wurde bei Patientinnen durch eine LOH-Analyse im Chromosomenbereich Xq11

sowie durch eine Deletions-PCR bei männlichen Patienten überprüft (siehe auch 4.1.1.). Eine Übereinstimmung der genetischen Veränderungen in kultivierten Zellen und in dem zugehörigen Tumor bestätigte die Anzucht von echten Tumorzellen. Dies war für Primärkulturen von 12 Patienten der Fall. In Zellkulturen aus Tumormaterial von elf Patienten fehlten die Mutationen bzw. LOHs des jeweiligen Tumors, was auf eine Kultivierung von Nicht-Tumorzellen, z. B. Fibroblasten, hindeutete. Für Tumorproben von 21 Patienten war die Klassifizierung als Tumor- oder Nicht-Tumorkultur nicht möglich, da im Tumor keine molekularen Veränderungen im Vergleich zum Normalgewebe gefunden wurden.

In ca. 50 % (12/23) der charakterisierbaren Primärkulturen war die Kultivierung echter Tumorzellen erfolgreich. Mutationen und LOHs der verifizierten WT-Primärkulturen sind in Tabelle 13 zusammengefasst.



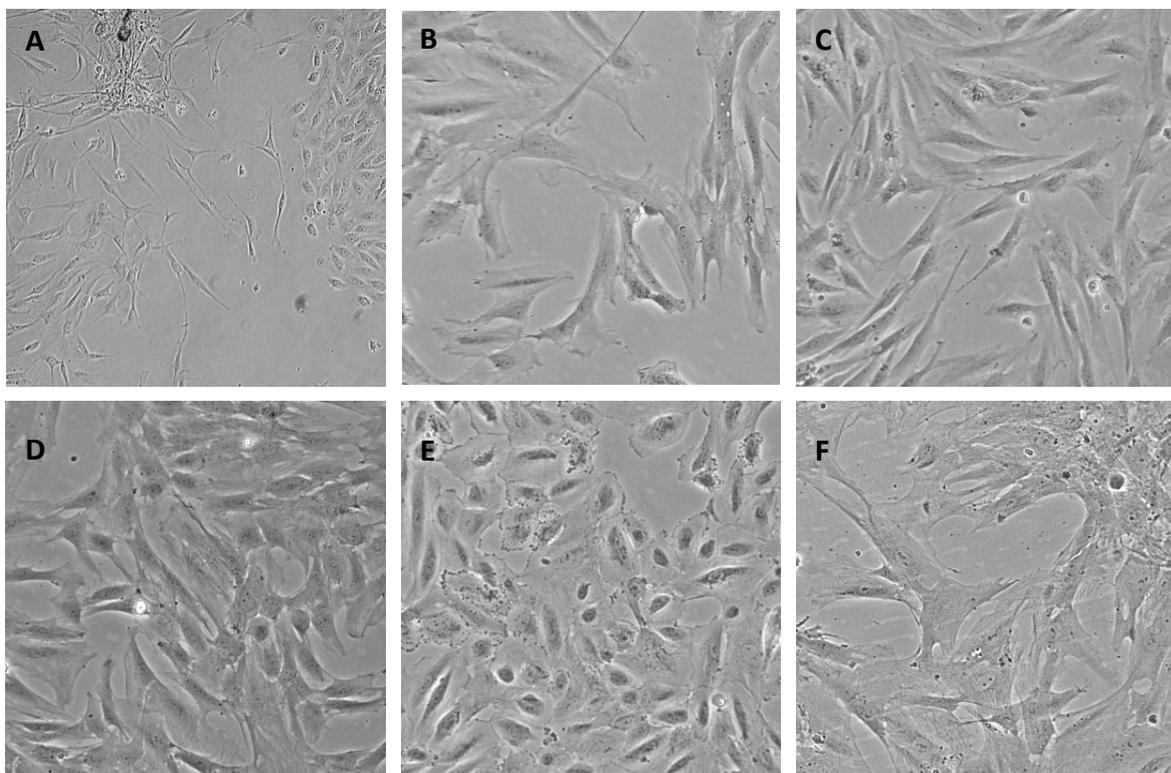
**Abbildung 10: Kultivierung und Charakterisierung von primären Zellen aus Wilms Tumor-Proben**

Primärkulturen wurden aus vitalem Tumorgewebe angelegt. Tumorproben und die entsprechenden Zellen wurden auf Mutationen in CTNNB1, WT1 und WTX sowie LOH untersucht. Für die Hälfte der Proben wurden keine tumorspezifischen Veränderungen gefunden. Zellkulturen von 12 Patienten konnten als echte Tumorzellen bestätigt werden, während Primärkulturen von 11 Patienten aus Nicht-Tumor-Zellen bestanden.

#### 4.2.3. Morphologie primärer WT-Zellen

Alle WT-Zellen bildeten adhärente Kulturen und konnten bei hoher Zelldichte auch in übereinander liegenden Zellschichten wachsen. Morphologisch zeigten die WT-Primärkulturen untereinander eine große Variabilität, während Zellen einer Kultur sich sehr ähnelten. Nachdem zu Beginn der Anzucht zum Teil eine Mischung aus verschiedenen

Zelltypen vorlag (Abb. 11A), wurde die Zellmorphologie im Laufe der Kultivierung schon nach wenigen Passagen relativ homogen (B). Es konnten runde (E) oder auch Zellen mit einem mehr oder weniger fibroblastenähnlichen Phänotyp dargestellt werden. Von Letzteren gab es verschiedene Ausprägungen: Während die Morphologie einiger Zellen sehr an Fibroblasten erinnerte (B, C), waren andere weniger gestreckt und bildeten eine Vielzahl an „Ausläufern“ (D, F), wobei es keine klare Trennung zwischen den Zellformen gab. Meist, jedoch nicht in allen Fällen, zeigten verschiedene Kulturen eines Tumors die gleiche Morphologie. Ausnahmen stellten hier ws507 und ws535 dar, bei denen einige Kulturen eine fibroblastenähnliche Morphologie aufwiesen (F), während andere aus runde Zellen bestanden (E). In Tabelle 13 ist die Morphologie der jeweiligen Primärkultur angegeben.



**Abbildung 11: Morphologische Heterogenität von WT-Primärkulturen**

(A) Anwachsen verschiedener Zelltypen zu Beginn der Kultivierung von ws591, (B) 3. Passage von ws591, (C) fibroblastenähnliche Zellen von ws568li, (D) ws539A1-2, Zellen mit vielen „Ausläufern“, (E) runde, kornförmige Zellen ws535 1-2tr und (F) Zellen ws535 1-1 aus der gleichen Tumorprobe.

Auch die Größe der Zellen war unterschiedlich. Die Länge der Zellen schwankte zwischen ca. 50 und mehr als 100  $\mu\text{m}$ .

Ein Zusammenhang zwischen der Morphologie der Zellen und dem histologischen Subtyp des ursprünglichen Tumors ließ sich nicht herstellen.

Tabelle 13: Etablierte Wilms Tumor-Primärkulturen

ws	Patient	Histologischer Subtyp	Mutationen, LOH	Wachstum, max. mögliche Passagen	Anzahl Kulturen	Morphologie
483	w, 3 J	Mischtyp	Δ WTX	langsam, 7 P	1	spindelförmig
489	m, 9 M, bilateral	li: stromareich re: Mischtyp	CTNNB1 T41A, WT1 R362X, LOH 11p CTNNB1 ΔS45, WT1 R362X, LOH 11p	schnell, 12 P schnell, 13 P	2 1	alle FA
507	m, 4 J 10 M	diffuse Anaplasie	LOH 9q, 14q	langsam, 5 P	2	507-1: FA 507-2tr: R
520	w, 8 J 6 M	stromareich	CTNNB1 ΔS45, LOH 11q	langsam, 5 P	2	alle F
535	w, 3 J	regressiv	LOH 11p	schnell, 7 P 535 1-2tr langsam, 5 P	4	535 1-1, 535 1-1B, 535 1-2: FA 535 1-2tr: R
539	w, 4 J 5 M	stromareich	LOH 7p, 11p, Δ WTX	schnell, 30 P	2	alle FA
565	m, 16 J 5M	Mischtyp	LOH 7p	schnell, 9 P	4	alle F
568	w, 8M, bilateral	li: stromareich re: Mischtyp	CTNNB1 S45F, WT1 Q184X, LOH 11p CTNNB1 ΔS45, WT1 Q184X, LOH 11p	schnell, 36 P schnell, 27 P	1 2	alle F
591	m, 5 J 2 M	stromareich	Δ WTX	schnell, 17 P	1	F
592	m, 2 M, primäre OP	Mesoblastisches Nephrom	LOH 11p	langsam, 10 P	1	R
609	w, 2 J 2 M	Mischtyp	LOH 11p	schnell, 15 P	3	alle F
613	w, 1 J	Mischtyp	LOH 11p	schnell, 13 P	2	alle R

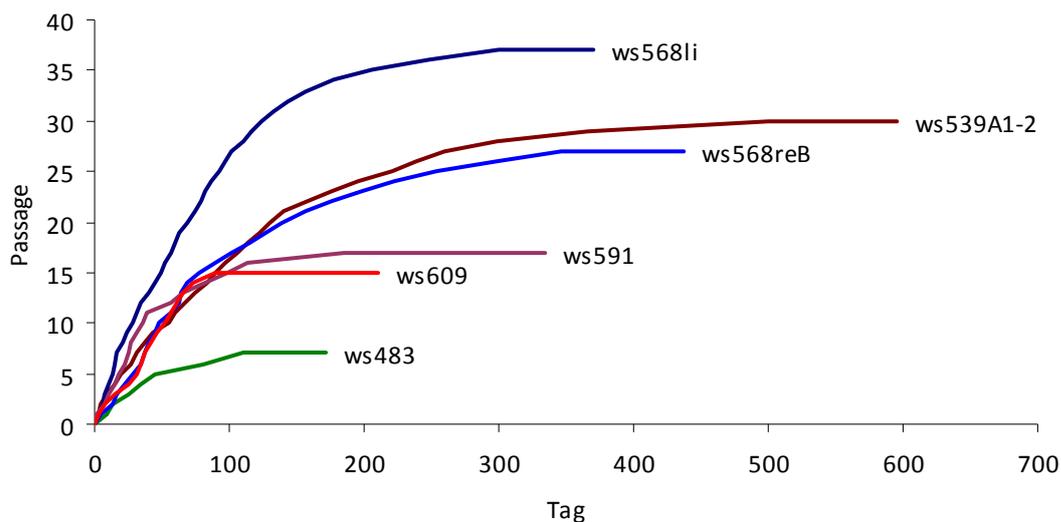
w: weiblich, m: männlich, J: Jahre, M: Monate,

li: links, re: rechts, P: Passage,

F: fibroblastenähnlich, FA: fibroblastenähnlich mit Ausläufern, R: rund, kornförmig

#### 4.2.4. Wachstumseigenschaften der Primärkulturen

Da es sich um primäre nicht-immortalisierte Zellen handelte, zeigten die Kulturen eine begrenzte, jedoch sehr unterschiedliche Lebensdauer. Während einige Kulturen, wie z. B. ws483 und ws507 nur wenige Male im Verhältnis 1:3 passagiert werden konnten, proliferierten andere Kulturen wie ws539 und ws568 lange Zeit gut. Allen Kulturen gemeinsam war eine Verlangsamung der Proliferation, die schlussendlich zum Wachstumsarrest führte. Abbildung 12 stellt Wachstumskurven einiger Kulturen beispielhaft dar und in Tabelle 13 sind die Anzahl der möglichen Passagen und die Wachstumsgeschwindigkeit der verschiedenen Primärzellen zusammengefasst. Kulturen, die mindestens einmal pro Woche passagiert werden konnten, wurden als schnell, Kulturen, die mehr als eine Woche dafür benötigten, als langsam wachsend eingestuft.



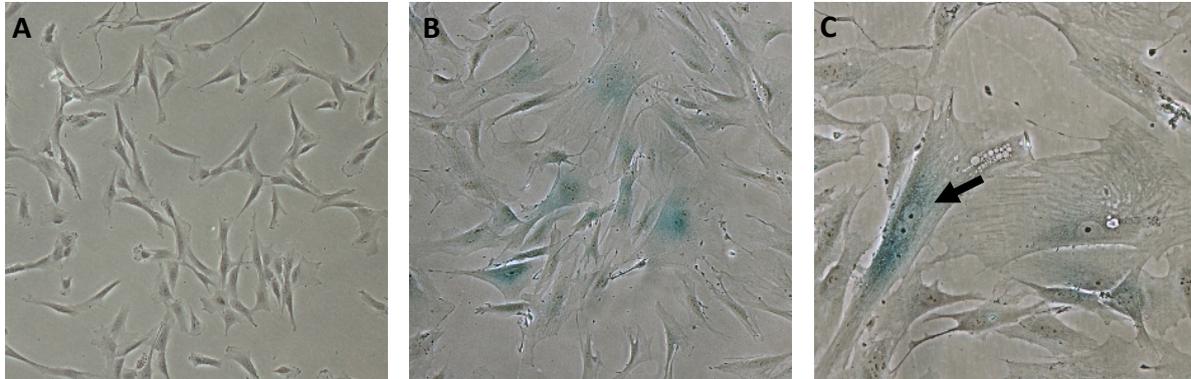
**Abbildung 12: Wachstum einiger primärer WT-Kulturen**

Die Primärkulturen wurden bei Erreichen von Konfluenz 1:3 passagiert. Während Kulturen wie ws483 eine sehr kurze Wachstumsphase aufwiesen, zeigten andere wie ws568 und ws539 eine hohe und lang anhaltende Proliferationsfähigkeit.

#### Wachstumsstopp durch Seneszenz in Primärkulturen

Um den zugrundeliegenden Mechanismus der Verlangsamung bzw. des Stopps der Proliferation ohne offensichtlichen Zelltod zu untersuchen, wurde eine Seneszenz-assoziierte  $\beta$ -Galactosidase-Färbung (SA- $\beta$ -Gal) durchgeführt. Für alle untersuchten Primärkulturen ergab sich das gleiche Bild (in Abbildung 13 beispielhaft für ws568li dargestellt): Während in frühen Passagen kaum gefärbte Zellen nachweisbar waren, stieg deren Anteil zum Ende der Wachstumsphase deutlich, bis nahezu alle Zellen die typische Blaufärbung aufwiesen. Einen

weiteren Hinweis auf Seneszenz gab die morphologische Veränderung, welche die Zellen im Laufe der Kultivierung erfuhren. Zum Ende der Wachstumsphase waren die Zellen deutlich vergrößert, abgeflacht und enthielten z. T. mehrere Zellkerne.



**Abbildung 13: Seneszenz am Ende der Proliferationsphase von primären WT-Zellen**

Junge Zellen (A, Passage 5, 100x Vergrößerung) und Zellen gegen Ende der Wachstumsphase (B, Passage 28, 100x) der Kultur ws568li wurden einer SA- $\beta$ -Gal-Färbung unterzogen. Während in frühen Passagen keine seneszenten Zellen auftraten, waren gegen Ende der Proliferationsfähigkeit alle Zellen SA- $\beta$ -Gal positiv. Außerdem zeigten sie einen Phänotyp, der typisch für gealterte Zellen ist (C, 200x): Große, abgeflachte Zellen, die z. T. mehrere Zellkerne enthalten (Pfeil).

#### 4.2.5. Immunhistochemische Charakterisierung

Um festzustellen, ob bestimmte histologische Komponenten der Wilms Tumoren Ursprung der Primärkulturen waren und um die kultivierten Zellen genauer zu charakterisieren, wurden am Institut für Pathologie der Universität Würzburg (Frau Dr. Geißinger, Frau Roth) immunhistochemische Färbungen durchgeführt. Dafür wurden sowohl Paraffinschnitte des Tumormaterials als auch Zellblöcke aller korrespondierenden Kulturen mit entsprechenden Antikörpern behandelt (siehe Tab. 14).

Alle Zellkulturen waren negativ für WT1 und PAX5, positiv für Vimentin und zeigten eine zytoplasmatische Lokalisation von  $\beta$ -Catenin. CD56 (NCAM1), welches in Testfärbungen spezifisch für Blastembereiche von WT war, konnte in keiner der untersuchten Primärkulturen nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu exprimierten alle Zellen CITED1, welches ebenfalls als blastemspezifisch beschrieben wurde. Die Endosialin-Färbung zeigte ein unklares Ergebnis. Die meisten Zellen waren Endosialin positiv, jedoch traten hier deutliche Unterschiede zwischen Kulturen eines Tumors auf, die sowohl molekulargenetisch als auch morphologisch übereinstimmten (ws565, ws568).

Tabelle 14: Immunhistochemische Charakterisierung der WT-Primärkulturen

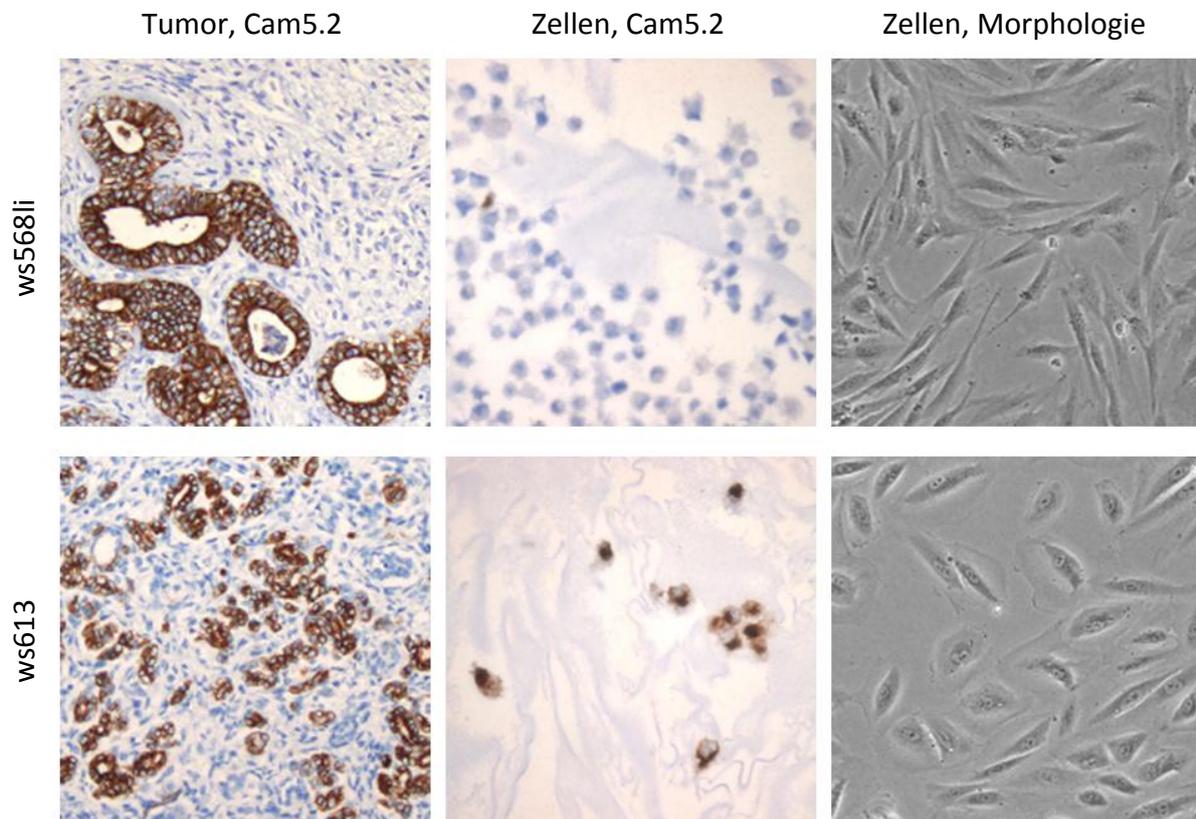
	CAM5.2	CD56	Vimentin	$\beta$ -Catenin	WT1	Endosialin	Ki67	CITED1	CD105	PAX5
<b>WS483</b>	90ER	0	100	100z0n	10	100	10	100	70	<1
<b>WS489li 1</b>	10-20	<1	100	100z0n	0	95	50	100	90	0
<b>WS489li 2</b>	10	0	100	100z0n	0	95	40	100	80	0
<b>WS489re</b>	0	0	100	100z0n	0	100	75	100	95	0
<b>WS507-1</b>	5	0	100	100z0n	0	100	90	100	90	0
<b>WS507-2tr</b>	80	1	100	100z0n	0	60	40	100	40	0
<b>WS520</b>	40	<1	100	100z0n	0	60	10	100	95	0
<b>WS520 tr</b>	70-80	<1	100	100z0n	<1	100	5	100	80	0
<b>WS535 1</b>	1	0	100	100z0n	0	100	40	100	95	0
<b>WS535 1-1B</b>	0	0	100	100z0n	0	90	20	100	0	0
<b>WS535 1-2</b>	0	0	100	100z0n	0	100	30	100	95	0
<b>WS535 1-2tr</b>	80-90	1?	100	100z0n	0	50	40	100	95	0
<b>WS539A1-2</b>	1	5	100	100z0n	2n	80	50	100	80	0
<b>WS539B1</b>	1	0	100	100z0n	2	100	40	100	90	<1
<b>WS565 1</b>	20	0	100	100z0n	10	90	50	100	95	<1
<b>WS565 3</b>	1	10	100	100z0n	0	<1	<5	100	60	1
<b>WS565 4</b>	10	10	100	100z0n	1	80	<5	100	70	1
<b>WS568li</b>	0	0	100	100z0n	1	100pG	90	100	95	0
<b>WS568reA</b>	0	0	100	100z0n	0	30-40G	90	100	95	0
<b>WS568reB</b>	1?	0	100	100z0n	0	100	30	100	90	0
<b>WS591</b>	<5	0	100	100z0n	0	90	80	100	90	0
<b>WS592</b>	100	0	100	80z0n	0	10pos90?	40	100	0	0
<b>WS609 1</b>	10	0	100	100z0n	0	80	15	100	60	<1
<b>WS609 2A</b>	0	<1	100	100z0n	0	95	80	100	90	0
<b>WS613</b>	95G	0	100	100z0n	<5	100	15	100	0	0
<b>WS613B</b>	90	0	100	100z0n	0	80	10	100	0	0

Angegeben ist der Anteil der positiven Zellen in %.

G Golgi-Apparat, z zytoplasmatisch, n nukleär, ER endoplasmatisches Retikulum

Ein differenziertes Bild ergab sich für die Cytokeratin-Expression (Cam5.2), welche in erster Linie typisch für die epitheliale Komponente in WT ist (siehe Abb. 14). Hier wiesen einige Kulturen eine nahezu vollständige Positivität auf (ws483, ws507-2tr, ws520-2tr, ws535 1-2tr, ws592 und ws613), während alle anderen Kulturen negativ für diesen Marker waren. Die meisten Cam5.2<sup>+</sup> Zellen ließen sich morphologisch gut von den anderen abgrenzen: Es waren runde Zellen, während die übrigen Kulturen aus langgestreckten, mehr oder weniger fibroblastenähnlichen Zellen bestanden. Ausnahmen bildeten hier ws483 und ws520-2tr, welche Cam5.2 positiv waren, morphologisch jedoch eher zum fibroblastenähnlichen Typ gehörten. Dabei zeigten allerdings ws483-Zellen nicht die kräftige membranständige Cytokeratinfärbung, sondern ein schwaches punktförmiges Muster, welches wahrscheinlich mit dem endoplasmatischen Retikulum assoziiert war. Aus einigen WT konnten also

epithelähnliche Zellen mit einer typischen Morphologie kultiviert werden, während andere Tumorproben mit einer triphasischen Zusammensetzung keine solchen Zellen lieferten. Auffällig waren hier die Tumorproben ws507 und ws535, die Ursprung sowohl cytokeratin-positiver als auch -negativer Primärkulturen waren.



**Abbildung 14: IHC-Untersuchung der Cytokeratin-Expression in WT-Gewebe und den daraus abgeleiteten Primärkulturen**

Die Cam5.2-Färbung ist spezifisch für die Epithelkomponente der WT. Diesen Epithelcharakter wiesen große, runde WT-Zellen wie ws613 auf, während fibroblastenähnliche Zellen wie ws568li Cam5.2 negativ waren.

Eine weitere Differenzierung zwischen den Primärkulturen ermöglichte Endoglin (CD105), welches als ein Marker für mesenchymale Stammzellen herangezogen wird. Die meisten Kulturen waren nahezu komplett CD105-positiv (80-90 % CD105-exprimierende Zellen). Ausnahmen bildeten hier die kornförmigen Cam5.2<sup>+</sup> Zellen, also ws535 1-2tr, ws507-2tr, ws592, ws613 und ws613B, in denen kein CD105 nachweisbar war. Die Primärkulturen ws483 und 520-2tr waren CD105<sup>+</sup> und Cam5.2<sup>+</sup>, unterschieden sich jedoch von den anderen cytokeratinexprimierenden Zellen auch in ihrer Morphologie (fibroblastenähnlich).

Die Ki67-Expression korrelierte gut mit den Wachstumseigenschaften der primären Zellen. Schnell wachsende Kulturen hatten einen hohen Anteil an Ki67<sup>+</sup> Zellen (ws568, ws591), während langsam wachsende Kulturen wie ws483 oder ws520 nur wenige Ki67<sup>+</sup> Zellen enthielten.

### 4.3. Retinsäure-Signalweg in Wilms Tumoren

In einer früheren Microarray-Analyse hatte sich gezeigt, dass in fortgeschrittenen Tumoren u. a. Gene, die Bestandteil des Retinsäure-Signalwegs sind, differentiell exprimiert sind [Zirn 2006]. Um diese Daten zu validieren, sollte in einem großen Tumorset das Expressionsniveau von elf Retinsäure (RA)-regulierten bzw. RA-Signalweg-Genen im Zusammenhang mit klinischen Daten untersucht werden. Es wurden Proben von 192 Patienten eingesetzt, von denen 162 eine präoperative Chemotherapie erhielten und 30 primär operiert wurden. Das Expressionsniveau folgender elf Gene wurde über quantitative Realtime-RT-PCR untersucht: CRABP2 (Cellular RA binding protein 2), CTGF/IGFBP8 (Connective tissue growth factor), ENPP2/ATX (Ectonucleotide pyrophosphatase/ phosphodiesterase 2), EZH2 (Enhancer of zeste homolog 2), NMYC (v-myc myelocytomatosis viral related oncogene, neuroblastoma derived), PRAME (Preferentially expressed antigen in melanoma), RAMP (Receptor activity-modifying protein), RARB (RA receptor  $\beta$ ), RARG (RA receptor  $\gamma$ ), RARRES1 und RARRES3 (RA receptor responder 1 und 3).

Es sollte analysiert werden, ob ein Zusammenhang zwischen der Expression dieser Gene und den klinischen Eigenschaften der Wilms Tumoren besteht. Von Interesse waren hier das Ansprechen auf Chemotherapie, der histologische Subtyp der Tumoren, das Auftreten von Rezidiven bzw. Metastasen und der eventuell tödliche Verlauf der Erkrankung. Als rezidiv- bzw. metastasenfrem galten dabei Patienten, die mindestens zwei Jahre nach Tumorthherapie rückfallfrei waren. Nahm das Tumolvolumen unter Chemotherapie um mindestens 50 % ab, wurde der Tumor als gut ansprechend eingestuft, ging das Tumolvolumen weniger stark zurück oder nahm zu, gehörte der WT zur Gruppe mit schlechtem Ansprechen auf Chemotherapie. Die Risikoklassifizierung anhand der Histologie wurde wie in 1.1.3. beschrieben durchgeführt.

Zur Bestimmung des Expressionsniveaus wurden mittels Realtime-RT-PCR ct-Werte für die einzelnen Gene bestimmt und anschließend auf das Haushaltsgen HPRT normiert. Der ct-Wert („cycle threshold“) entspricht der Zykluszahl, bei der das Fluoreszenz-Signal der Probe erstmals über dem Hintergrundsignal liegt. Hohe ct-Werte entsprechen einer geringen cDNA-Menge, niedrige ct-Werte entstehen bei Vorliegen von viel spezifischer cDNA. Für die statistische Auswertung wurden nur Tumorproben nach Chemotherapie einbezogen. Die Korrelation des Expressionslevels jedes einzelnen Gens mit den klinischen Daten wurde anhand des Mann-Whitney-U-Tests überprüft (univariate Analyse). Dabei erfolgte kein

Abgleich auf multiples Testen, um zunächst ein breites Spektrum an potentiell deregulierten Genen zu erhalten. Die Mittelwerte und Standardabweichungen der ct-Werte sind für die einzelnen Gene und Tumorgruppen zusammen mit den p-Werten (Teststatistik) und den Probenanzahlen in Tabelle 15 dargestellt.

Ein deutlicher Zusammenhang bestand zwischen einer NMYC-Überexpression und einem ungünstigen Krankheitsverlauf: Ein hohes Expressionsniveau korrelierte mit der Einordnung in die Hochrisiko-Gruppe ( $p < 0,001$ ), mit dem Auftreten von Rezidiven ( $p = 0,034$ ) und einem tödlichen Verlauf der Erkrankung ( $p = 0,017$ ).

Auffällig war, dass die meisten Deregulierungen in Bezug auf die Risikoklassifizierung – also die Tumorhistologie – auftraten, während für Tumoren mit Rezidiv- bzw. Metastasenentstehung oder einem tödlichen Krankheitsverlauf keine Korrelation mit einem geänderten Expressionsmuster gefunden wurde. WT vom Hochrisiko-Typ zeigten ein hohes Expressionsniveau für EZH2, CRABP2 und NMYC, während RARG, RARRES3, CTGF und ENPP2 geringer exprimiert wurden als in Tumoren mit niedriger oder mittlerer Malignität. Dieses Muster war unabhängig davon, zu welcher der beiden histologischen Hochrisikogruppen (blastemreicher WT oder diffuse Anaplasie) die Tumorproben gehörten. Unterschiede zeigten sich auch in der Expression von RARRES1 (niedriger in Hochrisiko-WT) und PRAME (höher in Hochrisiko-WT), wobei diese nicht signifikant waren. In Tumoren, die schlecht auf Chemotherapie ansprachen, waren RARRES1 und RARRES3 weniger exprimiert als in Tumoren, die gut auf die Therapie reagierten.

Sieben der elf untersuchten Gene zeigten in hochmalignen Tumoren im Vergleich zu solchen mit geringerem Risiko ein geändertes Expressionsniveau, was auf eine Deregulation des Retinsäure-Signalwegs in Tumoren mit hoher Malignität hindeutet.

Tabelle 15: Korrelation der Expressionslevel RA-regulierter Gene und der klinischen Daten der WT

	Ansprechen auf Chemotherapie gut - schlecht	Risiko niedrig/mittel - hoch	Rezidiv nein – ja	Metastasen nein – ja	Tod nein – ja
<b>RARB</b>	26,11 (1,46)/ 26,40 (1,18) p=0,183 n=54/35	26,26 (1,44)/ 26,31 (1,15) p=0,639 n=140/23	26,20 (1,38)/ 26,83 (1,56) p=0,144 n=144/14	26,19 (1,36)/ 26,77 (1,70) p=0,259 n=143/13	26,27 (1,41)/ 26,14 (1,05) p=0,815 n=153/9
<b>RARG</b>	31,01 (2,12)/ 31,02 (2,71) p=0,963 n=53/35	30,71 (2,29)/ 31,97 (2,06) p=0,016 n=139/23	30,79 (2,24)/ 31,56 (2,35) p=0,258 n=143/14	30,79 (2,23)/ 31,61 (2,51) p=0,358 n=142/13	30,90 (2,33)/ 31,40 (2,07) p=0,524 n=152/9
<b>RARRES1</b>	27,99 (2,76)/ 29,14 (2,70) p=0,04 n=54/35	28,21 (2,52)/ 29,62 (2,78) p=0,071 n=140/23	28,40 (2,64)/ 28,49 (2,40) p=0,954 n=144/14	28,45 (2,66)/ 28,02 (2,06) p=0,682 n=143/13	28,43 (2,68)/ 28,44 (1,56) p=0,65 n=153/9
<b>RARRES3</b>	30,56 (1,65)/ 31,54 (1,99) p=0,020 n=54/35	30,58 (1,75)/ 31,64 (2,23) p=0,021 n=140/23	30,70 (1,78)/ 30,89 (2,21) p=0,561 n=144/14	30,74 (1,83)/ 30,54 (1,73) p=0,82 n=143/13	30,77 (1,88)/ 30,49 (1,73) p=0,852 n=153/9
<b>PRAME</b>	31,52 (2,97)/ 31,46 (2,81) p=0,977 n=49/33	31,60 (2,95)/ 30,47 (2,14) p=0,063 n=131/20	31,44 (2,86)/ 30,99 (2,75) p=0,585 n=133/13	31,43 (2,77)/ 31,22 (3,85) p=0,553 n=132/12	31,52 (2,84)/ 30,20 (3,48) p=0,165 n=142/8
<b>EZH2</b>	33,59 (1,78)/ 33,14 (1,76) p=0,205 n=51/33	33,65 (1,76)/ 32,57 (1,65) p=0,005 n=131/22	33,47 (1,73)/ 33,46 (2,00) p=0,954 n=133/14	33,46 (1,67)/ 33,38 (2,62) p=0,793 n=133/12	33,52 (1,75)/ 32,92 (2,64) p=0,334 n=142/9
<b>RAMP</b>	27,24 (1,57)/ 27,56 (1,54) p=0,575 n=54/34	27,61 (1,67)/ 27,53 (1,25) p=0,646 n=136/22	27,56 (1,68)/ 27,87 (1,63) p=0,535 n=139/14	27,61 (1,63)/ 27,22 (1,42) p=0,334 n=138/13	27,62 (1,63)/ 27,30 (1,51) p=0,499 n=148/9
<b>CTGF</b>	29,55 (2,82)/ 30,12 (2,69) p=0,076 n=54/35	28,97 (2,49)/ 30,92 (3,39) p=0,006 n=140/23	29,32 (2,65)/ 28,86 (3,41) p=0,817 n=143/14	29,23 (2,71)/ 29,77 (2,96) p=0,330 n=142/13	29,32 (2,78)/ 29,13 (1,92) p=0,811 n=152/9
<b>CRABP2</b>	24,71 (2,34)/ 24,40 (2,16) p=0,456 n=53/35	24,84 (2,83)/ 23,10 (2,23) p=0,001 n=137/23	24,59 (2,40)/ 24,42 (2,96) p=0,727 n=141/14	24,59 (2,39)/ 24,23 (3,13) p=0,486 n=140/13	24,65 (2,44)/ 23,55 (2,78) p=0,193 n=150/9
<b>ENPP2</b>	26,30 (1,97)/ 26,29 (1,89) p=0,737 n=54/35	25,98 (1,76)/ 27,54 (1,43) p<0,001 n=140/23	26,14 (1,82)/ 26,91 (1,68) p=0,107 n=144/14	26,14 (1,83)/ 26,80 (1,76) p=0,208 n=143/13	26,21 (1,85)/ 26,67 (1,51) p=0,411 n=153/9
<b>NMYC</b>	29,97 (2,29)/ 29,79 (2,17) p=0,723 n=53/35	30,17 (2,23)/ 27,69 (1,62) p<0,001 n=138/23	29,88 (2,29)/ 28,63 (2,64) p=0,034 n=141/14	29,93 (2,23)/ 29,14 (3,21) p=0,263 n=140/13	29,93 (2,28)/ 28,08 (2,55) p=0,017 n=150/9

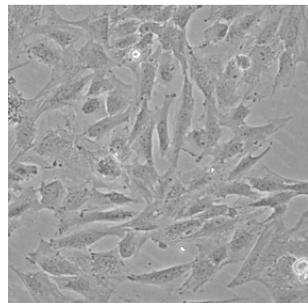
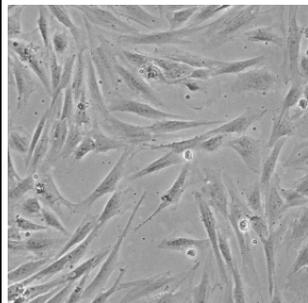
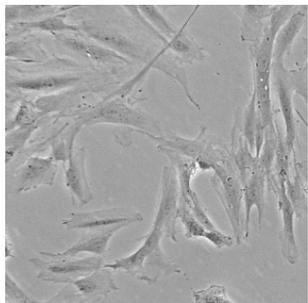
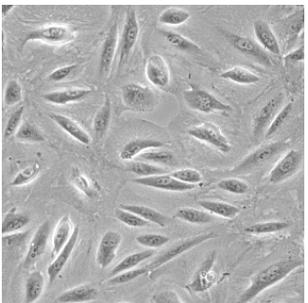
Angegeben sind Mittelwert und in Klammern die Standardabweichung der ct-Werte in den entsprechenden Gruppen, der Signifikanz-Wert (p) und die Probenanzahl (n) in den einzelnen Gruppen. Für ein  $p < 0,05$  sind die Mittelwerte der gegenüberstehenden Gruppen – ohne Berücksichtigung des mehrfachen Testens – signifikant verschieden. Rot unterlegt sind Felder mit einer geringeren Expression des entsprechenden Gens in der zweitgenannten Tumorgruppe, Grün markiert eine höhere Genexpression in der zweiten Gruppe im Vergleich zur ersten.

#### 4.4. Einfluss von Retinsäurebehandlung auf primäre Wilms Tumor-Kulturen

Um den Einfluss von Retinsäure und Retinsäurederivaten auf Wilms Tumoren im Modell zu untersuchen, wurden vier verschiedene Primärkulturen einer Retinsäurebehandlung unterzogen. Dafür wurden Kulturen mit einer niedrigen RA-Signalweg-Aktivität (geringe Expression von RAR und RARRES in den Primärzellen; ws568 und ws591) und Kulturen mit einer hohen RA-Signalweg-Aktivität (hohe Expression von RAR und RARRES in den Zellen, ws539 und ws591) ausgewählt. Die Eigenschaften der untersuchten primären Zellen sind in Tabelle 16 zusammengefasst.

Alle Zellkulturen erfuhren die gleiche Behandlung mit 10  $\mu$ M *all-trans* RA (ATRA), 10  $\mu$ M *9cis*RA, dem synthetischen Retinoid Fenretinid (10  $\mu$ M, 4HPR) oder den Kombinationen von 10  $\mu$ M ATRA und dem HDAC-Inhibitor SAHA (0,15  $\mu$ M) bzw. 10  $\mu$ M Fenretinid und 0,15  $\mu$ M SAHA. Diese Retinoid- bzw. Inhibitor-Konzentrationen wurden bereits erfolgreich für *in vitro*-Versuche eingesetzt [Hahn 2008; Zirn 2005a] und sie können relativ nebenwirkungsarm *in vivo* erreicht werden [Reynolds 2003].

**Tabelle 16: Für RA-Behandlung eingesetzte WT-Kulturen**

ws539	ws568	ws591	ws592
			
2 Kulturen: ws539A1-2, ws539B1	3 Kulturen: ws568li, ws568reA, ws568reB	1 Kultur	1 Kultur
nach Chemotherapie	nach Chemotherapie	nach Chemotherapie	nach primärer OP
stromareich	li: stromareich, re: Mischtyp	stromareich	mesoblastisches Nephrom
LOH 7p, 11p, $\Delta$ WTX	li: CTNNB1 S45F, WT1 Q184X, LOH 11p re: CTNNB1 $\Delta$ S45, WT1 Q184X, LOH 11p	$\Delta$ WTX	LOH 11p
RA-Signalweg $\uparrow$	RA-Signalweg $\downarrow$	RA-Signalweg $\uparrow$	RA-Signalweg $\downarrow$

#### 4.4.1. Genregulation durch Retinoidbehandlung

Nach 24stündiger Inkubation wurde die Expression RA-regulierbarer Gene per Realtime-RT-PCR untersucht, um das Ansprechen auf RA-Gabe zu überprüfen. Zusätzlich wurden weitere Gene betrachtet, welche in Hochrisikotumoren dereguliert waren. Für jedes Gen wurde die Änderung der Expression in den behandelten gegenüber den Kontrollzellen als Differenz der entsprechenden ct-Werte ( $\Delta$ ct-Wert) bestimmt.

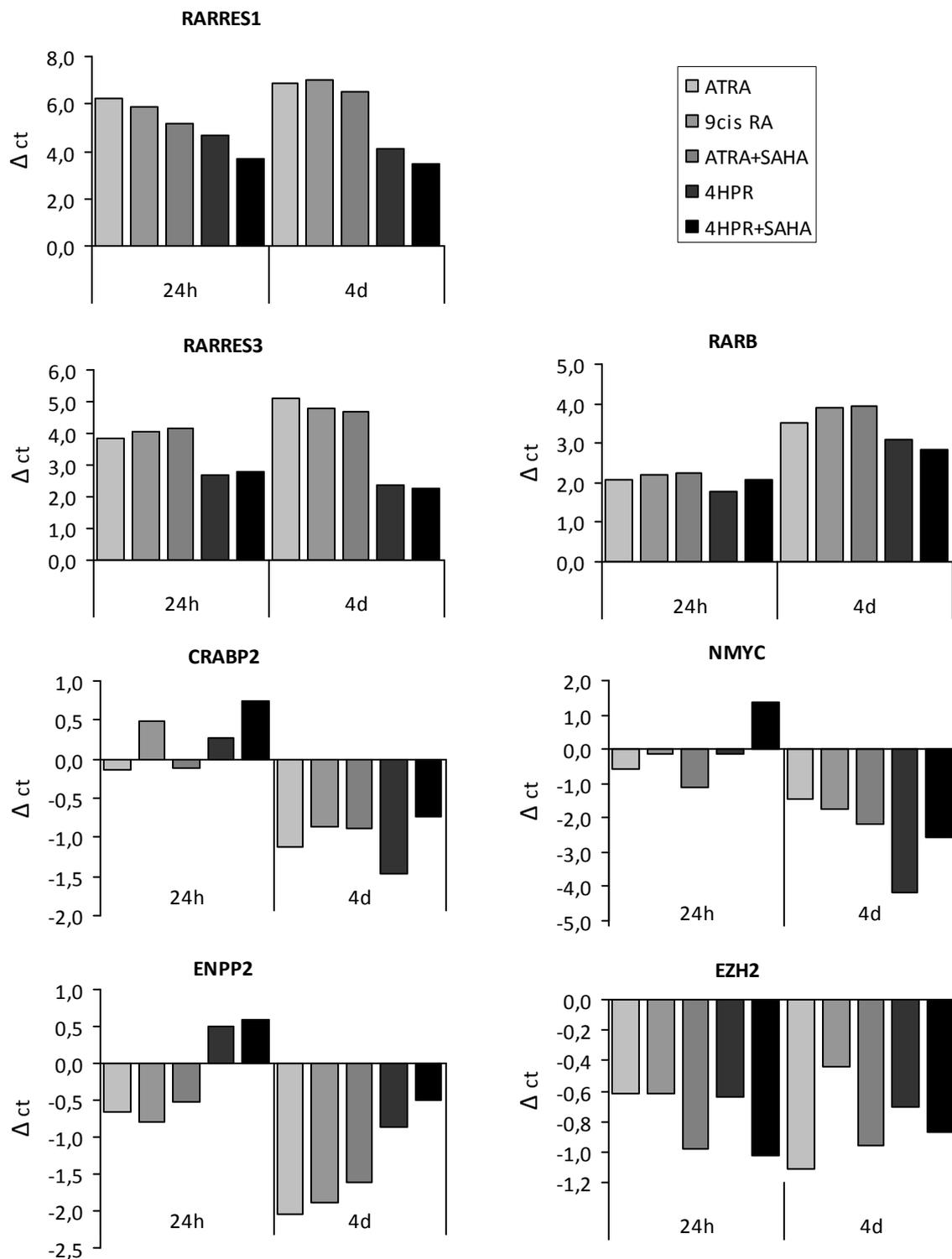
Die Primärkultur ws592 zeigte keine Veränderung der Expression der untersuchten Gene, sprach also nicht auf die Retinsäuregabe an. Alle anderen Kulturen zeigten ein übereinstimmendes Bild: Die meisten Gene, die in Wilms Tumoren der Hochrisikogruppe dereguliert waren, wiesen ein umgekehrtes Expressionsmuster nach Behandlung auf (siehe Tab. 17). So wurde die Expression von RARRES1, RARRES3 und RARB gesteigert, während die Menge an mRNA von ENPP2, EZH2, CRABP2 und NMYC durch die RA-Gabe sank. Zum Teil waren die Effekte erst nach einer viertägigen Behandlung deutlich darstellbar (CRABP2 und NMYC). Für CTGF ergab sich ein uneinheitliches Bild. Während in den ws539 Kulturen keine Änderung der Expression durch die Behandlung statt fand ( $\Delta$ ct < 0,5), wurde CTGF in behandelten Kulturen von ws568 überexprimiert (bis  $\Delta$ ct = 1,4) und in ws591 (bis  $\Delta$ ct = -1,1) leicht reprimiert. Die Expression von RARG blieb weitgehend unverändert.

**Tabelle 17: Expression von RA-Genen in Tumoren mit hohem vs. mittlerem Risiko und in behandelten vs. unbehandelten WT-Zellen**

Gen	WT vom Hochrisikotyp	behandelte Primärkulturen
RARB	kein Unterschied	Hoch
RARG	niedrig	Unverändert
RARRES1	niedrig	Hoch
RARRES3	niedrig	Hoch
CTGF	niedrig	Variabel
CRABP2	hoch	niedrig (nach 4 d Behandlung)
ENPP2	niedrig	Niedrig
EZH2	hoch	Niedrig
NMYC	hoch	Niedrig

Die verschiedenen Kulturen eines Tumors reagierten stets in gleicher Weise auf die Retinoidgabe und auch die unterschiedliche RA-Signalwegaktivität in unbehandelten ws539 und ws591 (hoch) bzw. ws568 (niedrig) spielte für die Regulation der meisten untersuchten

Gene keine Rolle. Beispielhaft sind die Änderungen der Genexpression für die RA-Behandlung der Zellkultur ws568li in Abbildung 15 dargestellt.



**Abbildung 15: Genexpression nach RA-Behandlung von WT-Zellen (ws568li)**

Nach 24 h bzw. 4 Tagen RA-Behandlung wurde die Genexpression per Realtime-RT-PCR analysiert. Dargestellt sind die Unterschiede der ct-Werte zwischen RA-behandelten und Kontrollzellen. Die Expression von RARRES1, RARRES3 und RARB wird durch RA-Gabe gesteigert, während CRABP2, NMYC, EZH2 und ENPP2 weniger exprimiert werden. Die Genregulation für RARG (nicht beeinflusst) und CTGF (bei ws568li durch RA überexprimiert) ist nicht abgebildet.

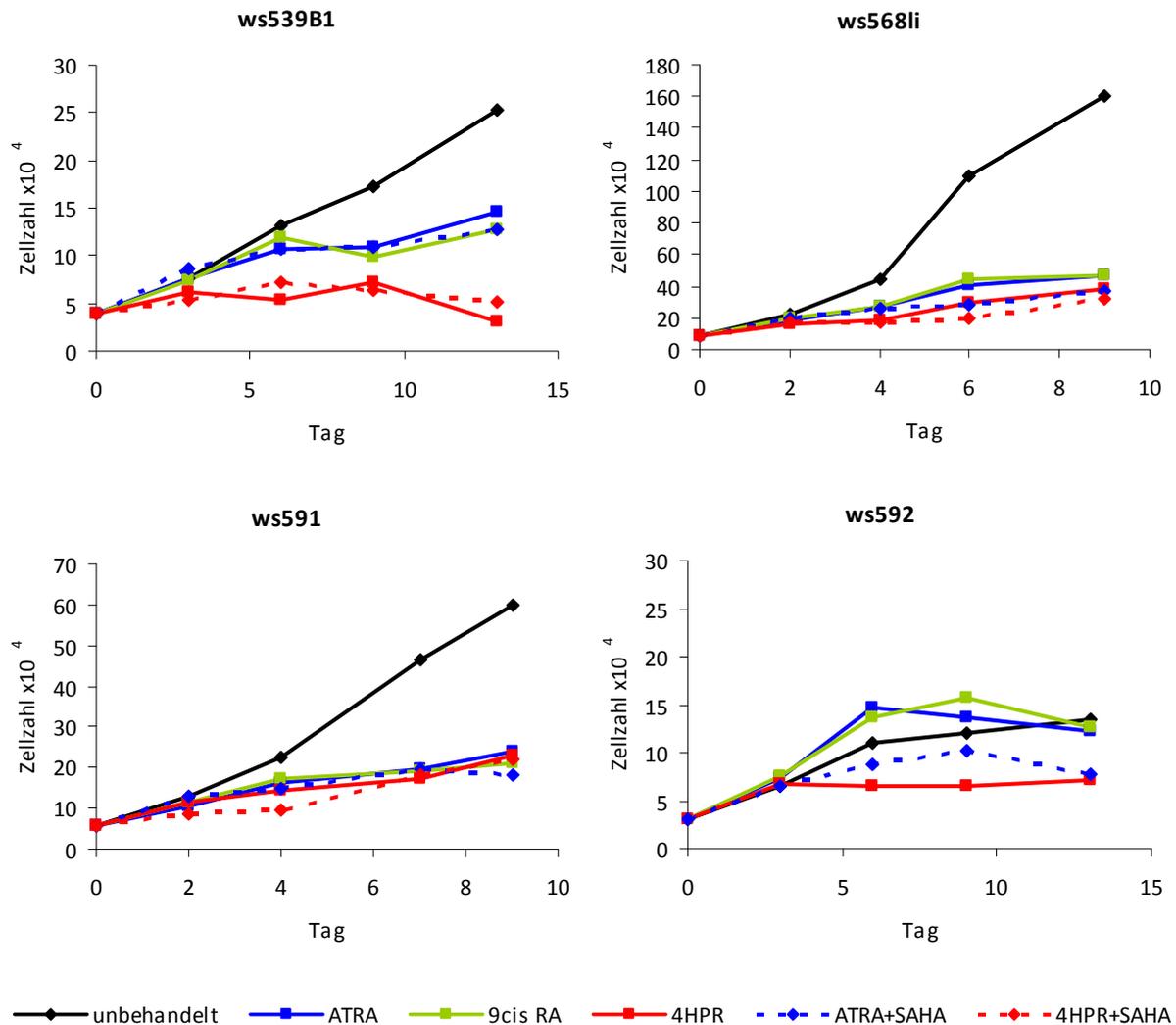
Insgesamt gab es keine grundlegenden Unterschiede zwischen den Retinoiden – ATRA und 9cisRA verursachten die gleichen Änderungen im Expressionsmuster, ebenso wie die Kombination ATRA+SAHA. Geringe Abweichungen gab es beim Einsatz von Fenretinid. So waren die Expressionsunterschiede für RARRES1, RARRES3 und ENPP2 nicht so deutlich wie mit ATRA und auf die Expression von CTGF hatte 4HPR keinen Einfluss.

#### **4.4.2. Zellproliferation unter kurzzeitiger Retinsäurebehandlung**

Neben dem Einfluss der Retinoide auf die Genexpression sollte auch die Auswirkung der Behandlung auf die Proliferation der WT-Zellen untersucht werden. Dafür wurden die Primärkulturen wiederum in Gegenwart von ATRA, 9cisRA, 4HPR und den Kombinationen ATRA + SAHA und 4HPR + SAHA (letzteres nicht für ws568reA, ws568reB, ws592) kultiviert und die Gesamtzellzahl zu den in Abbildung 16 angegebenen Zeitpunkten bestimmt.

Die Kultur ws592 wurde, wie schon bei der vorangegangenen Untersuchung der Expression von RA-Genen, nicht durch die RA-Behandlung beeinflusst. Es kam zu einer nur geringen Veränderung der Proliferationsgeschwindigkeit, lediglich Fenretinid verursachte eine leichte Wachstumsreduktion. Allerdings wuchsen schon die unbehandelten Zellen sehr langsam, so dass Unterschiede schlecht feststellbar waren. Auf die Proliferation der Zelllinien der Tumoren ws539, ws568 und ws591 hatten Retinoide einen hemmenden Effekt. ATRA, 9cisRA und 4HPR reduzierten das Wachstum deutlich, wobei die zusätzliche Gabe des HDAC-Inhibitors keinen weiteren Einfluss auf das Zellwachstum hatte. Auf die beiden ws539 Kulturen hatte Fenretinid stärkere Auswirkungen als ATRA oder 9cisRA, es gab nahezu keine Zunahme der Zellzahl. Für die Zellen ws568 und ws591 war dieser Unterschied nicht feststellbar.

Die verschiedenen Kulturen eines Tumors (ws568li, reA, reB bzw. ws539A1-2, B1) reagierten stets in gleicher Weise auf die Behandlung. Beispielhaft sind die Wachstumskurven je einer Primärkultur in Abbildung 16 dargestellt.



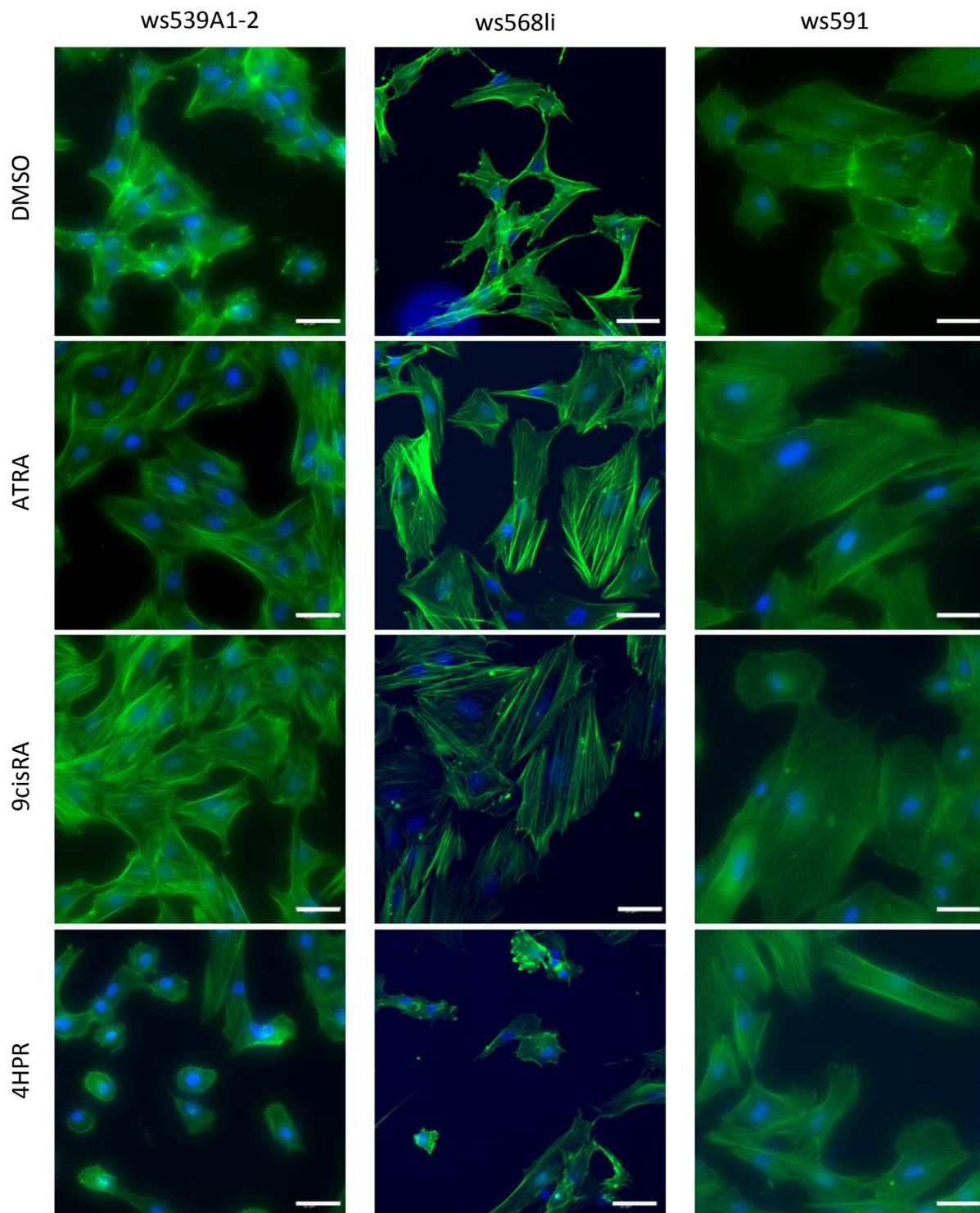
**Abbildung 16: Verminderte Proliferation von primären WT-Kulturen durch RA-Behandlung**

WT-Kulturen wurden mit je 10  $\mu\text{M}$  ATRA, 9cisRA, 4HPR oder einer Kombination aus 10  $\mu\text{M}$  ATRA + 0,15  $\mu\text{M}$  SAHA bzw. 10  $\mu\text{M}$  4HPR + 0,15  $\mu\text{M}$  SAHA behandelt, die Kontrollzellen erhielten nur DMSO. Die Zellzahl wurde zu den angegebenen Zeitpunkten bestimmt. Das Wachstum der Kulturen ws539, ws568 und ws591 wurde durch die Behandlung deutlich reduziert. Die Zellkultur des Tumors ws592 zeigte keine Veränderung der Proliferationsrate bei Gabe von ATRA oder 9cisRA, lediglich 4HPR erzielte eine leichte Wachstumshemmung.

#### 4.4.3. Morphologische Veränderungen unter Retinsäurebehandlung

Das Aussehen der primären WT-Zellen wurde fortlaufend unter Retinoidgabe beobachtet. Während die Morphologie der Kultur ws592 gleich blieb, zeigten die ATRA- und 9cisRA-behandelten Kulturen ws539, ws568 und ws591 bereits nach vier Tagen einen stark veränderten Phänotyp. Es kam zur Zellvergrößerung und es entwickelte sich ein deutlich sichtbares Zytoskelett. Fenretinid verursachte keine solchen morphologischen Unterschiede. Die Folgen einer 4HPR-Gabe werden in Abschnitt 4.4.5. näher erläutert.

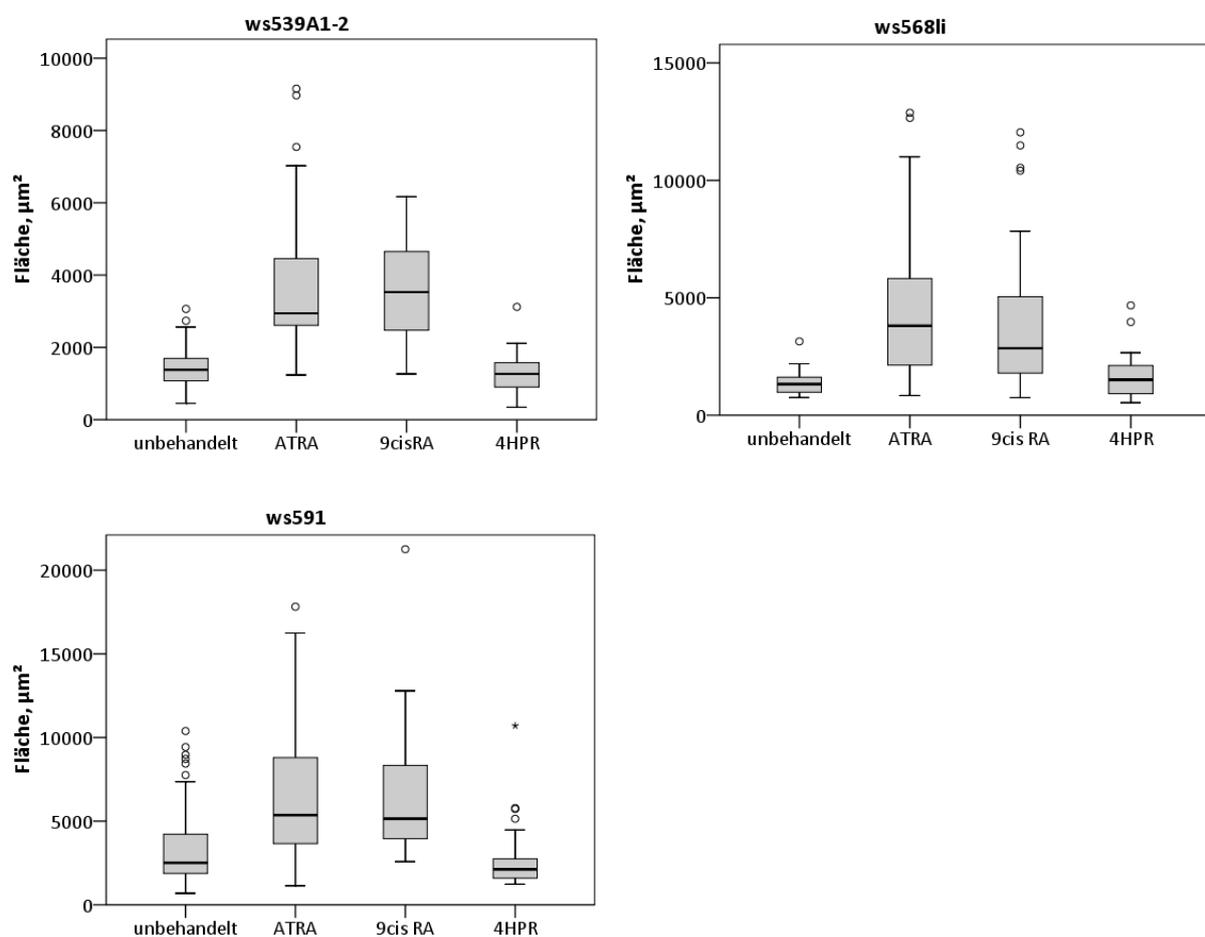
Zur besseren Darstellung der Phänotypänderung wurde eine Färbung des Aktin-Zytoskeletts mit Phalloidin-FITC nach viertägiger Retinoidgabe durchgeführt (siehe Abb. 17).



**Abbildung 17: Phalloidin-FITC-Färbung von RA-behandelten WT-Primärkulturen**

Die Zellen wurden für vier Tage mit je 10  $\mu\text{M}$  ATRA, 9cisRA oder 4HPR behandelt bzw. erhielten als Kontrolle nur DMSO. Anschließend wurden das Aktin-Zytoskelett mit Phalloidin-FITC (grün) und die Zellkerne mit Hoechst 33342 (blau) gefärbt. Der Balken entspricht einer Länge von 50  $\mu\text{m}$ . ATRA und 9cisRA verursachten eine deutliche Zellvergrößerung, während diese bei 4HPR-Gabe ausblieb.

Zur Größenbestimmung wurden Länge und Breite der Zellen vermessen und die Fläche der Zellen über den Flächeninhalt einer Ellipse angenähert. Die Größenunterschiede zwischen Kontroll- und retinoidbehandelten Zellen wurden mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests überprüft. Für alle Zellkulturen ergab sich hier das gleiche Bild (siehe Abb. 18): Eine signifikante Vergrößerung der Zellen durch ATRA (ws539A1-2: 2,6fach  $p=5,5 \times 10^{-10}$ , ws568li: 3,5fach  $p=2,8 \times 10^{-8}$ , ws591: 2fach  $p=4,9 \times 10^{-9}$ ) und 9cisRA (ws539A1-2: 2,5fach  $p=4,7 \times 10^{-9}$ , ws568li: 2,9fach  $p=8,6 \times 10^{-7}$ , ws591: 2,2fach  $p=5,7 \times 10^{-10}$ ), während 4HPR-behandelte Zellen keine Größenzunahme aufwiesen.



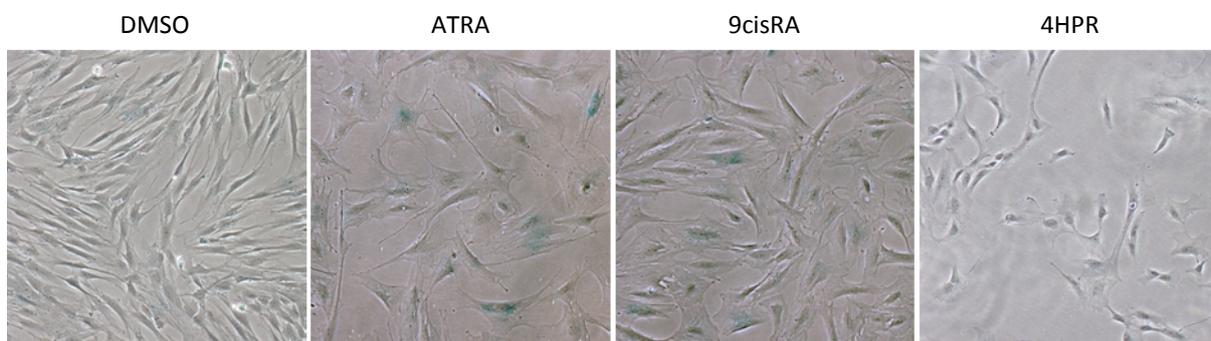
**Abbildung 18: Vergrößerung der Zellen durch Retinsäurebehandlung**

WT-Zellen wurden für vier Tage in Gegenwart von je 10 µM ATRA, 9cisRA oder 4HPR kultiviert und anschließend das Aktin-Zytoskelett mit Phalloidin-FITC gefärbt. Die Bestimmung der Zell-Länge und -Breite erfolgte mit der Mikroskop-Software (Leica Application Suite 1.7.0), der Flächeninhalt der Zellen wurde über den einer Ellipse angenähert. In den Boxplots sind Werte zwischen dem 25%- und dem 75%-Perzentil (Box) und die entsprechenden Mediane dargestellt, Ausreißer sind als Punkte angegeben. Eine Behandlung mit ATRA oder 9cisRA verursachte eine signifikante Vergrößerung der Zellen in allen getesteten Kulturen. Die Gabe von Fenretinid hatte keinen Einfluss auf die Zellgröße.

#### 4.4.4. RA-induzierte Seneszenz

ATRA- und 9cisRA-behandelte Zellen wiesen eine morphologische Ähnlichkeit mit gealterten, seneszenten Wilms-Kulturen auf. Um diesen Aspekt näher zu betrachten, wurde eine SA- $\beta$ -Gal-Färbung nach viertägiger Behandlung mit je 10  $\mu$ M ATRA, 9cisRA oder 4HPR durchgeführt. Dabei zeigten nur einige ATRA- oder 9cisRA-behandelte Zellen eine Blaufärbung, wie in Abbildung 19 am Beispiel von ws568li gezeigt. Nach Fenretinid-Gabe konnten keine SA- $\beta$ -Gal positiven Zellen dargestellt werden.

Der geringe Anteil an seneszenten Zellen in allen behandelten Kulturen deutet darauf hin, dass Seneszenz nicht die Ursache für das reduzierte Zellwachstum war.

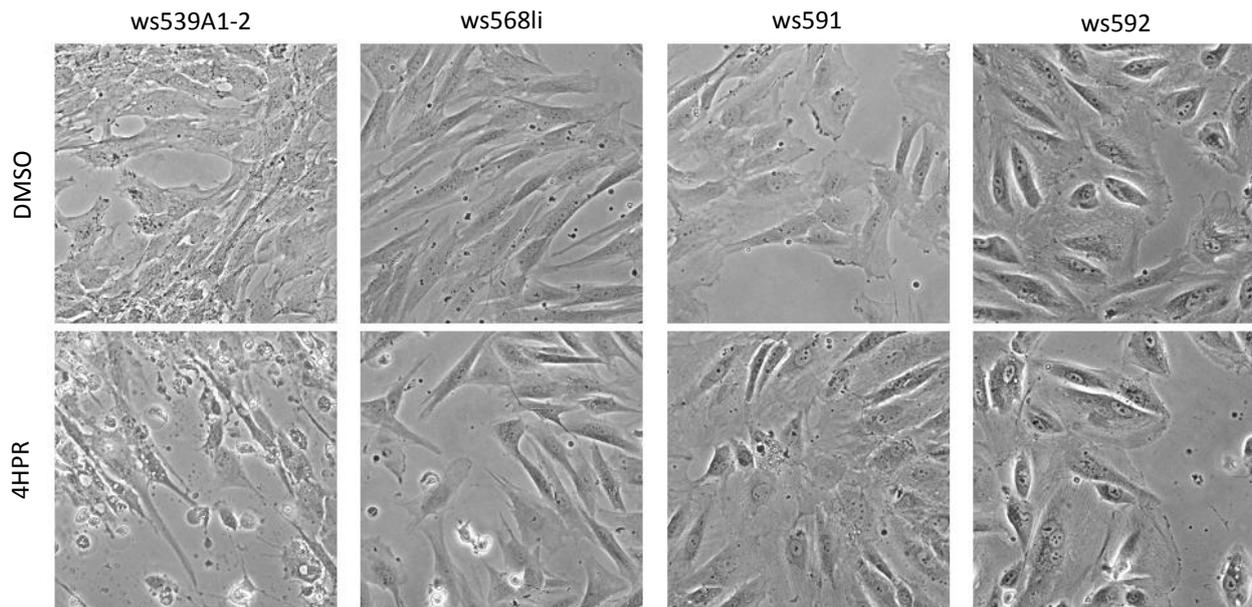


**Abbildung 19: SA- $\beta$ -Gal-Färbung nach Retinoidbehandlung von ws568li**

ATRA und 9cisRA induzierten in einem Teil der behandelten Zellen Seneszenz, während Fenretinid diesen Effekt nicht zeigte.

#### 4.4.5. Apoptose-Induktion durch Fenretinid

Während ATRA und 9cisRA in WT-Zellen eine Morphologieänderung und eventuell Differenzierung induzierten, führte eine Fenretinid-Behandlung in einigen Kulturen zu verstärktem Zelltod, wie in Abbildung 20 dargestellt. Viele der Zellen waren abgelöst oder wiesen vermehrt Vakuolen auf. Besonders deutlich wurde dies bei den Kulturen des Tumors ws539. Eine große Zahl abgelöster Zellen trat auch bei den drei ws568 Kulturen auf, während bei ws591 und ws592 kaum tote Zellen zu erkennen waren.

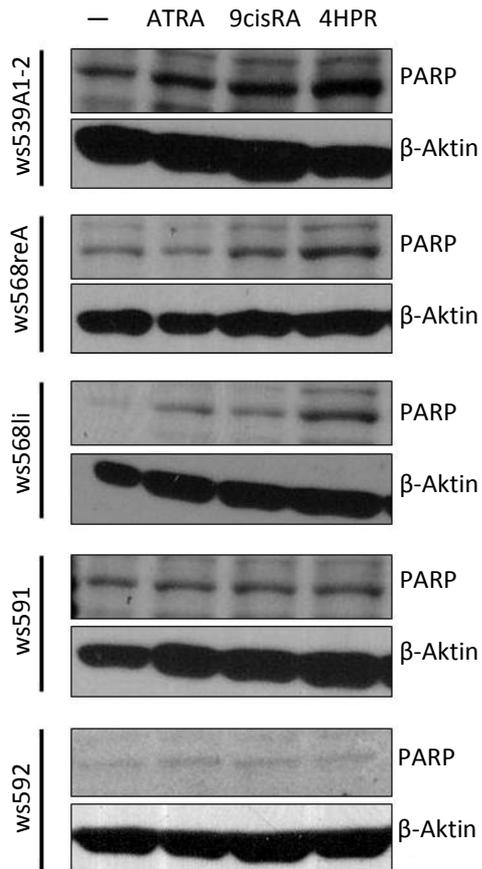


**Abbildung 20: Zelltod durch Fenretinid-Gabe**

Nach viertägiger Behandlung der primären Zellkulturen mit 10  $\mu$ M 4HPR trat bei den Kulturen ws539 ein starker Zelltod ein. Ein ähnlicher, wenn auch weniger stark ausgeprägter Effekt wurde für die ws568 Zellen beobachtet, während er bei den Primärkulturen ws591 und ws592 fehlte.

Um den phänotypisch begründeten Verdacht einer Apoptose-Induktion durch Fenretinid bzw. Retinsäure zu überprüfen, wurden nach viertägiger Behandlung Zelllysate hergestellt und per Western-Blot auf das Vorhandensein von gespaltenem PARP (einem späten Apoptosemarker) untersucht (siehe Abb. 21). Als Ladekontrolle wurde ein Antikörper gegen  $\beta$ -Aktin verwendet.

In unbehandelten sowie in ATRA- und 9cisRA-behandelten ws539 Zellen wurde ein schwaches Signal für gespaltenes PARP detektiert, während bei 4HPR-Behandlung deutlich größere Mengen davon nachweisbar waren. Auch beide verwendeten ws568 Kulturen zeigten bei Gabe von 4HPR eine deutliche Zunahme an gespaltenem PARP, während für ws591 und ws592 keine Unterschiede feststellbar waren. Diese Untersuchung zeigte, dass es unter Fenretinid-Bedingungen in einigen der untersuchten Primärkulturen zu verstärkter Apoptose kam, während ATRA und 9cisRA diese nicht oder nur sehr schwach induzierten.



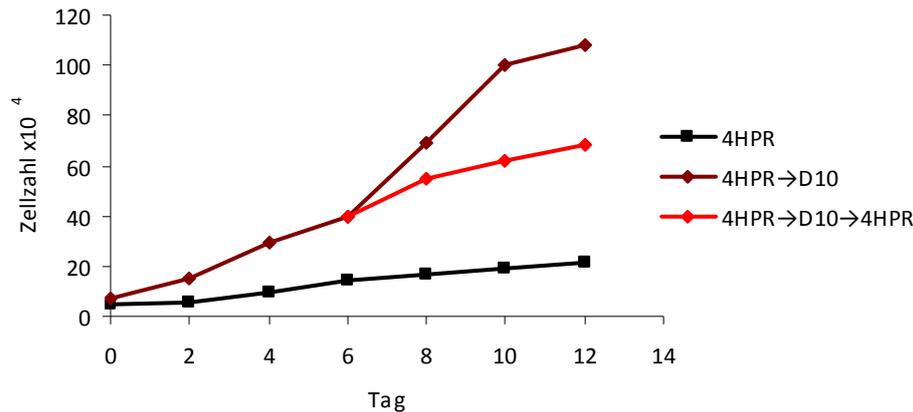
**Abbildung 21: Apoptose-Induktion durch Fenretinid:**

Nach viertägiger Behandlung primärer WT-Zellen mit je 10  $\mu$ M ATRA, 9cisRA oder Fenretinid wurden Zelllysate hergestellt und mittels Western-Blot auf das Vorhandensein des PARP-Spaltproduktes (Apoptosemarker) untersucht. Als Ladekontrolle diente  $\beta$ -Aktin. Während ws591 und ws592 Zellen keine gesteigerte Apoptoserate zeigten, war in ws539A1-2, ws568reA und ws568li nach 4HPR-Gabe deutlich mehr gespaltenes PARP nachweisbar als in unbehandelten Zellen. In geringem Maß induzierten auch ATRA und 9cisRA in diesen drei WT-Kulturen Apoptose.

#### 4.4.6. Langzeitbehandlung mit Fenretinid

Um die langfristigen Auswirkungen einer Fenretinid-Behandlung zu überprüfen, wurden Zellen der Kultur ws568li zwei Monate lang mit 10  $\mu$ M 4HPR behandelt und anschließend ein Teil der Zellen fünf Tage in normalem DMEM10 kultiviert. Wachstumskurven wurden bei kontinuierlicher 4HPR-Behandlung und unter DMEM-Bedingungen nach zweimonatiger Vorbehandlung aufgenommen, wie in Abbildung 22 dargestellt.

Nach Entfernung des Fenretinids zeigten die Zellen eine deutlich stärkere Proliferation als die dauerhaft behandelten Zellen. Nach sechs Tagen wurde zu einem Teil der Zellen unter DMEM10 wieder 10  $\mu$ M 4HPR gegeben, was zu einer erneuten Reduktion des Wachstums führte. Der wachstumshemmende Effekt von Fenretinid trat also nur bei kontinuierlicher Behandlung auf und auch durch Langzeitgabe wurde keine dauerhafte Verringerung der Proliferationsgeschwindigkeit in WT-Kulturen induziert.



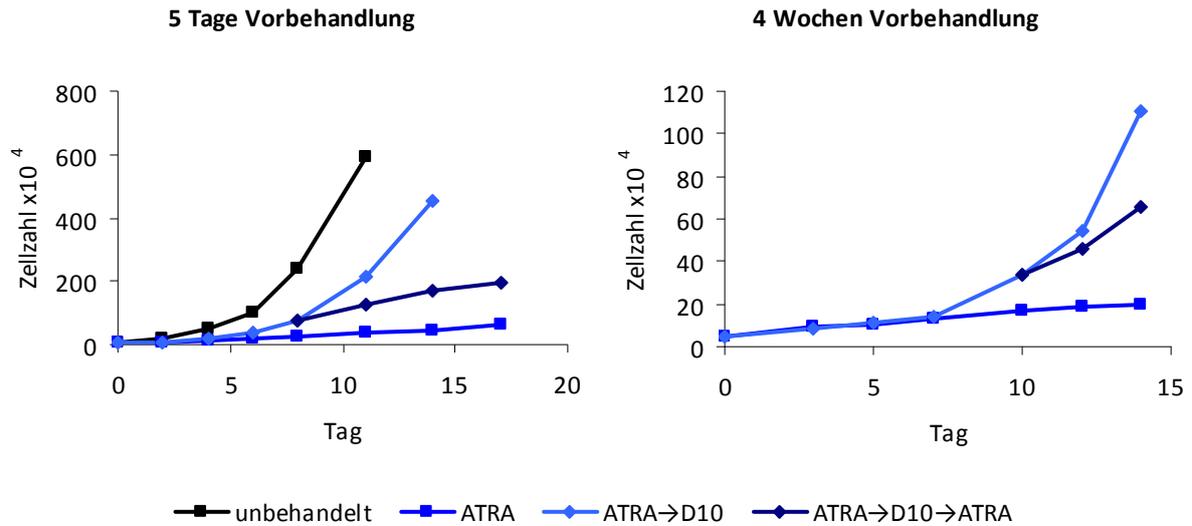
**Abbildung 22: Zellwachstum unter Langzeitbehandlung mit Fenretinid**

ws568li Zellen wurden für zwei Monate mit 10  $\mu$ M 4HPR behandelt und anschließend ein Teil der Zellen für fünf Tage in normalem DMEM10 kultiviert. Eine Bestimmung der Gesamtzellzahl erfolgte zu den angegebenen Zeitpunkten sowohl für Zellen, die kontinuierlich 4HPR erhielten (4HPR), als auch für Zellen die danach mit DMEM10 kultiviert wurden (4HPR→D10). Letztere proliferierten deutlich besser als Zellen unter Fenretinid-Gabe. Wurden 4HPR→D10 Zellen nach sechs Tagen erneut unter 4HPR gesetzt (4HPR→D10→4HPR), nahm das Zellwachstum wieder ab.

#### 4.4.7. Langfristige Effekte einer ATRA-Behandlung

In einem nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob ATRA dauerhaft verändernd auf WT-Zellen wirkt. Dazu wurde nach fünftägiger Vorbehandlung mit 10  $\mu$ M ATRA das Wachstum von ws568li Zellen bei fortgesetzter ATRA-Gabe (ATRA), bei anschließender Inkubation in normalem DMEM10 (ATRA→D10) und ganz ohne ATRA (unbehandelt) bestimmt (siehe Abb. 23).

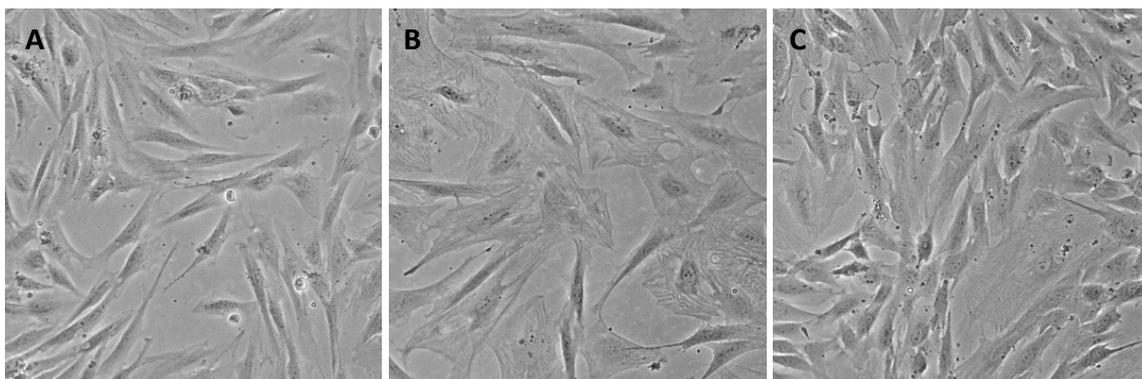
Unbehandelte Zellen proliferierten stets deutlich schneller (exponentielles Wachstum) als ATRA oder ATRA→D10 Zellen. Bis zum Tag 4 waren keine Unterschiede im Wachstumsverhalten zwischen ATRA und ATRA→D10 feststellbar. Ab Tag 6 nahm die Zellzahl der ATRA→D10 Zellen stärker zu als bei fortlaufender ATRA-Behandlung. Am Tag 8 wurde ein Teil der ATRA→D10 Zellen erneut unter ATRA gesetzt (ATRA→D10→ATRA). Dabei trat wiederum der proliferationshemmende Effekt von ATRA auf.



**Abbildung 23: Wachstum von ws568li Zellen mit ATRA-Vorbehandlung**

Die Kultur ws568li wurde fünf Tage bzw. vier Wochen mit 10  $\mu\text{M}$  ATRA behandelt und anschließend wurden die Wachstumsraten unter fortgesetzter ATRA-Gabe (ATRA) oder nach Absetzen der Retinsäure (ATRA→D10) bestimmt. Zur Kontrolle dienten Zellen, die nie mit ATRA behandelt wurden. ATRA verminderte das Zellwachstum, jedoch ging dieser Effekt einige Tage nach Beendigung der Behandlung verloren. Durch erneute ATRA-Gabe (ATRA→D10→ATRA) wurde das Zellwachstum wieder eingeschränkt.

Auch die Zellmorphologie änderte sich unter den verschiedenen Kulturbedingungen. Die ATRA-vorbehandelten Zellen zeigten für einige Tage noch die typische Vergrößerung, wurden aber nach längerer ATRA-freier Kultivierung kleiner und nahmen nach ca. einer Woche wieder den Phänotyp unbehauelter Zellen an (Abb. 24).



**Abbildung 24: Morphologie von ws568li nach Absetzen der ATRA-Behandlung**

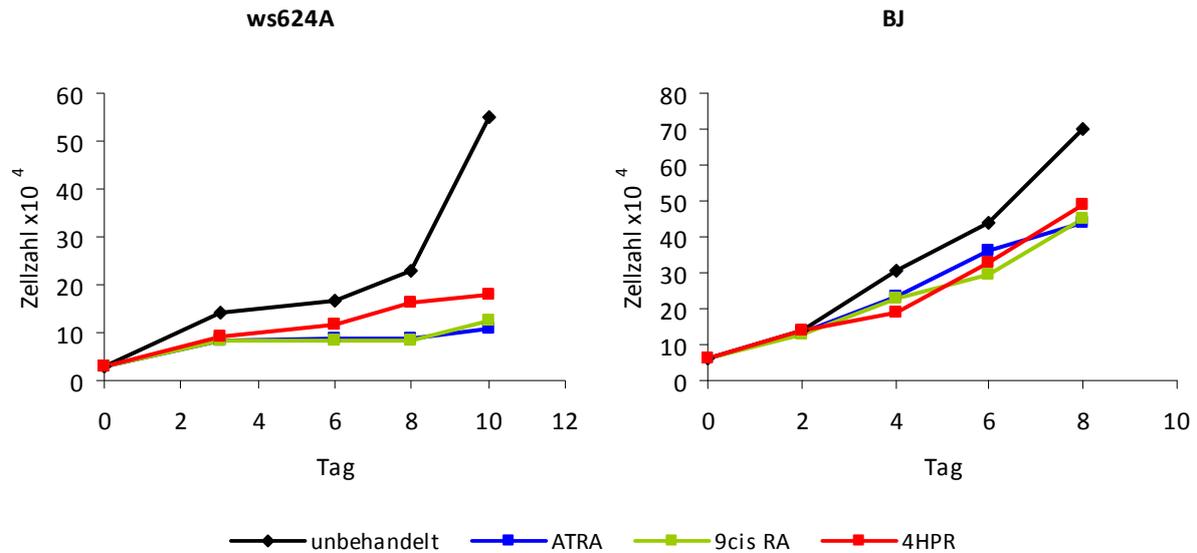
A: Unbehandelte Zellen B: Kontinuierliche ATRA-Behandlung über 12 Tage führte zur typischen Vergrößerung der Zellen. C: ws568li wurden 5 Tage mit 10  $\mu\text{M}$  ATRA vorbehandelt und anschließend 7 Tage in DMEM10 kultiviert. Dabei nahmen sie wieder den Phänotyp der normalen ws568li Zellen an. Nur einige wenige Zellen zeigten noch die ATRA-typischen Veränderungen.

Die Rückgewinnung des Proliferationspotentials und der ursprünglichen Morphologie nach Absetzen von ATRA sprachen dafür, dass eine fünftägige ATRA-Behandlung nicht ausreichte, um die Zellen endgültig zu differenzieren. Auch eine vierwöchige ATRA-Gabe hatte keine bleibenden Auswirkungen auf die ws568li Zellen (siehe Abb. 23). Hier zeigte sich nach 10 Tagen ATRA-freier Kultivierung ebenfalls wieder eine gesteigerte Proliferation im Vergleich zu permanenter ATRA-Behandlung.

#### **4.4.8. Retinoidbehandlung von Nicht-WT-Zellen**

Es konnte gezeigt werden, dass die Retinoide *all-trans*-, *9cis*-Retinsäure und Fenretinid einen differenzierenden und wachstumshemmenden Einfluss auf primäre Wilms Tumor-Zellen ausüben. Um die Spezifität dieses Effektes zu überprüfen, sollten auch Nicht-Tumorzellen analysiert werden. Hierzu wurden ws624A Zellen verwendet, die aus einem Wilms Tumor kultiviert wurden, jedoch nicht den LOH im Bereich des Markers TH01 (11p) aufwiesen, der für das Tumorgewebe festgestellt wurde. Da diese Zellen in Kultur genommen werden konnten und weiterhin proliferierten, war es jedoch unklar, inwieweit sie normale, gesunde Zellen darstellten. Um diesen Aspekt auszuschließen, wurden zusätzlich mit Telomerase immortalisierte BJ-Zellen (humane Fibroblasten) als Modell eingesetzt.

Beide Zelllinien wurden wie die echten WT-Kulturen mit je 10 µM ATRA, 9cisRA oder 4HPR behandelt. Nachdem der HDAC-Inhibitor SAHA keinen zusätzlichen Effekt auf die primären WT-Kulturen zeigte, wurde er in dieser Untersuchung nicht verwendet.



#### Abbildung 25: Behandlung von Nicht-WT-Kulturen und humanen Fibroblasten mit Retinoiden

Die primäre Nicht-Tumor-Kultur ws624A und BJ-Zellen (humane Fibroblasten) wurden in Gegenwart von je 10  $\mu$ M ATRA, 9cisRA oder 4HPR kultiviert. Während alle eingesetzten Retinoide einen hemmenden Effekt auf das Wachstum der primären, aus einem WT kultivierten, ws624A Zellen hatten, wurde das Wachstum der BJs kaum beeinträchtigt.

Die Primärkultur ws624A reagierte in gleicher Weise auf die Retinoidgabe wie die echten Wilms Tumor-Kulturen. Das Genexpressionsmuster veränderte sich entsprechend: RARB, RARRES1 und RARRES3 wurden hoch reguliert, während ENPP2 weniger stark exprimiert wurde als in den unbehandelten Kontrollen. Auch die Wachstumsreduktion durch ATRA, 9cisRA und Fenretinid trat auf, wie in Abbildung 25 dargestellt.

Für humane Fibroblasten (BJ) ergab sich ein anderes Bild. Obwohl auch hier die Expressionssteigerung für RARB, RARRES1 und RARRES3 sowie die Verringerung der ENPP2-Transkription auftraten, hatten die eingesetzten Retinoide nahezu keinen hemmenden Effekt auf das Zellwachstum und keine Auswirkungen auf die Morphologie der Zellen.

#### 4.4.9. Microarray-Analyse von ATRA-induzierter Differenzierung

Um einen Einblick zu gewinnen, inwieweit ATRA die Differenzierung von WT-Zellen induzierte, wurde die globale Genexpression der Primärkultur ws568li nach viertägiger ATRA-Gabe mit der von unbehandelten Zellen (vier Tage DMSO) über eine Microarray-Analyse (HG U133 Plus 2.0, Affymetrix) verglichen.

Insgesamt waren 552 Gene in ATRA-behandelten im Vergleich zu unbehandelten Zellen mindestens zweifach hoch reguliert (davon 119 mindestens vierfach) und 417 Gene mindestens zweifach herunter reguliert (davon 67 mehr als vierfach).

Die funktionelle Gruppierung aller mindestens vierfach regulierten Gene mit DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) ergab eine Vielzahl an beteiligten biologischen Prozessen. Zum einen waren Gene mit Funktion im RA-Metabolismus bzw. in RA-Signalwegen in ATRA-behandelten Zellen überexprimiert, die in Tabelle 18 zusammengefasst sind. Zum anderen sind viele der differenziell regulierten Gene in die Ausbildung einer extrazellulären Matrix (ECM) involviert (siehe Tab. 19). Weitere Cluster an differenziell exprimierten Genen betrafen die Entwicklung von neuronalen oder muskulären Geweben sowie die Bildung von Knochen oder Knorpeln (Tab. 20).

Anhand des Genmusters ließen sich jedoch keine eindeutigen Rückschlüsse auf die Entwicklung der Zellen unter ATRA-Behandlung ziehen, da sowohl hemmende als auch fördernde Effekte für jede Differenzierungsrichtung auftraten.

**Tabelle 18: Gene mit mindestens 4facher Regulation, die an RA-Signalweg bzw. -Metabolismus beteiligt sind**

<b>Genname</b>	<b>Symbol</b>	<b>Expressionsänderung</b>
cytochrome P450, family 26, subfamily B, polypeptide 1	CYP26B1	102,2871
retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 1	<b>RARRES1</b>	63,3247
dehydrogenase/reductase (SDR family) member 3	DHRS3	20,1865
aldehyde dehydrogenase 1 family, member A1	<b>ALDH1A1</b>	15,1277
retinoic acid receptor, beta	<b>RARB</b>	9,6912
retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 3	<b>RARRES3</b>	8,6912
cytochrome P450, family 26, subfamily A, polypeptide 1	CYP26A1	5,2358
retinol binding protein 1, cellular	RBP1	4,8857
retinol dehydrogenase 10 (all-trans)	RDH10	4,6369

**Tabelle 19: Gene mit mindestens 4facher Regulation, die an Bildung einer ECM beteiligt sind**

<b>Genname</b>	<b>Symbol</b>	<b>Expressionsänderung</b>
matrix Gla protein	<b>MGP</b>	116,31
asporin	<b>ASPN</b>	-43,31
natriuretic peptide precursor B	NPPB	36,13
secreted frizzled-related protein 4	<b>SFRP4</b>	28,47
clusterin-like 1 (retinal)	CLUL1	26,77
wingless-type MMTV integration site family, member 2B	<b>WNT2B</b>	20,96
collagen, type XXI, alpha 1	COL21A1	-17,41
C-type lectin domain family 3, member B =Tetranectin	CLEC3B	-16,40
EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1	EFEMP1	14,08
glutathione peroxidase 3 (plasma)	GPX3	13,79
glypican 6	GPC6	11,70
calsyntenin 2	<b>CLSTN2</b>	11,11
intercellular adhesion molecule 1	ICAM	9,87
hedgehog interacting protein	HHIP	-9,07
tenascin C	<b>TNC</b>	-8,78
osteomodulin	<b>OMD</b>	-8,72
RGM domain family, member B	RGMB	-7,93
matrix metalloproteinase 11 (stromelysin 3)	MMP11	7,71
ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 15	ADAMTS15	7,55
tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b	TNFRSF11B	-7,49
C1q and tumor necrosis factor related protein 3	C1QTNF3	7,16
dermatopontin	<b>DPT</b>	-7,07
oxidized low density lipoprotein (lectin-like) receptor 1	OLR1	6,63
selenoprotein P, plasma, 1	SEPP1	6,61
fibroblast growth factor 5	FGF5	-6,40
sulfatase 1	<b>SULF1</b>	6,18
cadherin 8, type 2	CDH8	6,09
myocilin, trabecular meshwork inducible glucocorticoid response	MYOC	6,08
collagen, type VII, alpha 1	COL7A1	-6,05
serglycin	<b>SRGN</b>	5,96
neuropilin 2	NP2	5,75
tumor necrosis factor, alpha-induced protein 6	TNFAIP6	-5,70
L1 cell adhesion molecule	L1CAM	-5,50
adenylate cyclase activating polypeptide 1 (pituitary)	ADCYAP1	5,30
alpha-2-macroglobulin	A2M	5,28
carboxypeptidase Z	<b>CPZ</b>	5,26
ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2	<b>ENPP2</b>	-5,22
neuregulin 1	<b>NRG1</b>	-5,03
inhibin, beta B	INHBB	-4,49
dickkopf homolog 1 ( <i>Xenopus laevis</i> )	<b>DKK1</b>	-4,42
serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin), member 2	SERPINE2	-4,32
contactin 4	CNTN4	4,26
osteoglycin	OGN	-4,24

Tabelle 20: Gene mit mindestens 4facher Regulation, die an Differenzierungsprozessen beteiligt sind

Differenzierung	Genname	Symbol	Expressions- änderung
Neuronal	EPH receptor A4	<b>EPHA4</b>	13,65
	neurofilament, light polypeptide	<b>NEFL</b>	-11,55
	calsyntenin 2	<b>CLSTN2</b>	11,11
	hedgehog interacting protein	HHIP	-9,07
	tenascin C	<b>TNC</b>	-8,78
	fibroblast growth factor 5	FGF5	-6,40
	cadherin 8, type 2	CDH8	6,09
	neuropilin 2	NP2	5,75
	L1 cell adhesion molecule	L1CAM	-5,50
	adenylate cyclase activating polypeptide 1 (pituitary)	ADCYAP1	5,30
	neuregulin 1	<b>NRG1</b>	-5,03
	plasticity related gene 1 =PRG1	LPPR4	-4,70
	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2B	HTR2B	4,72
	gamma-aminobutyric acid (GABA) B receptor, 2	GABBR2	-4,58
	serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin), member 2	SERPINE2	-4,32
	neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2	NTRK2	-4,28
	S100 calcium binding protein A10	S100A10	-4,28
	contactin 4	CNTN4	4,26
	stathmin-like 2	STMN2	-4,10
	Knochen, Knorpel	matrix Gla protein	<b>MGP</b>
asporin		<b>ASPN</b>	-43,31
wingless-type MMTV integration site family, member 2B		<b>WNT2B</b>	20,96
C-type lectin domain family 3, member B		CLEC3B	-16,40
prostaglandin E receptor 4 (subtype EP4)		PTGER4	-9,90
osteomodulin		<b>OMD</b>	-8,72
RGM domain family, member B		RGMB	-7,93
tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b		TNFRSF11B	-7,49
sulfatase 1		<b>SULF1</b>	6,18
potassium channel, subfamily K, member 2		KCNK2	-6,11
collagen, type VII, alpha 1		COL7A1	-6,05
serglycin		<b>SRGN</b>	5,96
chondroitin sulfate proteoglycan 4		CSPG4	-5,43
carboxypeptidase Z		<b>CPZ</b>	5,26
phospholipase A2, group IVA (cytosolic, calcium-dependent)		PLA2G4A	5,06
forkhead box C2 (MFH-1, mesenchyme forkhead 1)		FOXC2	-4,57
dickkopf homolog 1 ( <i>Xenopus laevis</i> )		<b>DKK1</b>	-4,42
osteoglycin		OGN	-4,24
homeobox D1		HOXD1	-4,12
cytochrome P450, family 24, subfamily A, polypeptide 1		CYP24A1	4,05
Muskel	capping protein (actin filament) muscle Z-line, alpha 1	<b>CAPZA1</b>	65,30
	phospholamban	<b>PLN</b>	12,81
	calsyntenin 2	<b>CLSTN2</b>	11,11
	tenascin C	<b>TNC</b>	-8,78
	GATA binding protein 6	GATA6	8,52
	dystrophin	DMD	7,84
	sulfatase 1	<b>SULF1</b>	6,18
	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 6	TNFAIP6	-5,70
	neuregulin 1	<b>NRG1</b>	-5,03
	forkhead box C2 (MFH-1, mesenchyme forkhead 1)	FOXC2	-4,57
	sarcoglycan, gamma (35kDa dystrophin-associated glycoprotein)	SGCG	4,94
	SMAD family member 3	SMAD3	4,47

#### 4.4.10. Validierung der Microarray-Daten

Um die Microarray-Daten zu validieren, wurde die durch ATRA-Gabe verursachte Expressionsänderung einiger differenziell regulierter Gene (in Tabellen 18-20 fett gedruckt) per Realtime-RT-PCR analysiert. Um zu überprüfen, ob auch das Expressionsmuster anderer WT-Primärzellen in ähnlicher Weise beeinflusst wird, kamen neben den Zellen ws568li und ws568reA auch Proben der Kulturen ws539A1-2, ws591, ws489li und ws489re nach viertägiger Behandlung mit DMSO bzw. ATRA zum Einsatz.

Tabelle 21: Validierung der Microarray-Daten mit Realtime-RT-PCR

Gen	Regulation	ws568li	ws568reA	ws539A1-2	ws591	ws489li	ws489re
<b>ALDH1A1</b>	↑	+	+	+	+	+	+
<b>ASPN</b>	↓	+	+	+	+	+	+
CAPZA1	↑	+	+	-	-	-	+
<b>CLSTN2</b>	↑	+	+	+	+	+	+
CPZ	↑	+	+	-	+	-	+
<b>DKK1</b>	↓	+	+	-	+	+	+
<b>DPT</b>	↓	+	+	-	+	+	+
<b>ENPP2</b>	↓	+	+	+	+	+	-
EPHA4	↑	+	+	-	+	-	+
<b>MGP</b>	↑	+	+	+	+	+	+
<b>NEFL</b>	↓	+	+	+	+	-	+
<b>NRG1</b>	↓	+	+	+	+	+	-
<b>OMD</b>	↓	+	+	+	+	+	+
<b>PLN</b>	↑	+	+	+	+	+	+
<b>RARB</b>	↑	+	+	+	+	+	+
<b>RARRES1</b>	↑	+	+	+	+	+	+
<b>RARRES3</b>	↑	+	+	+	+	+	+
<b>SFRP4</b>	↑	+	+	+	+	+	+
SRGN1	↑	+	+	+	-	-	+
<b>SULF1</b>	↑	+	+	+	+	+	+
<b>TNC</b>	↓	+	+	-	+	+	+
<b>WNT2B</b>	↑	+	+	-	+	+	+

+ konnte bestätigt werden

- konnte nicht bestätigt werden

↑ Expressionssteigerung unter ATRA-Behandlung

↓ Repression unter ATRA-Behandlung

In Tabelle 21 sind die Ergebnisse dieser Untersuchung zusammenfassend dargestellt. Hervorgehoben sind Gene, die in mindestens fünf der sechs betrachteten Zellkulturen die gleiche Regulationsrichtung bei ATRA-Behandlung aufwiesen. Für die Primärzellen ws568li konnten die Microarray-Daten bestätigt werden und auch die Zelllinie ws568reA, die aus dem WT der kontralateralen Niere desselben Patienten gewonnen wurde, zeigte diese Veränderungen der Genexpression. Für die weiteren Primärkulturen konnte die Überexpression von RA-Genen (ALDH1A1, RARRES1, RARRES3 und RARB) ebenfalls nachgewiesen werden. Von den Genen, die eine Rolle in der Differenzierung bzw. Bildung der ECM spielen, zeigten CAPZA1, CPZ, EPHA4 und SRGN1 in mehr als einer der untersuchten Zellkulturen eine abweichende Regulation. Eine eindeutige Bestimmung der ATRA-induzierten Differenzierungsrichtung war auch bei Betrachtung der Gene, die in mindestens fünf der sechs untersuchten WT-Kulturen in gleicher Weise reguliert wurden, nicht möglich, da eine einheitliche Expressionsänderung unter ATRA-Behandlung für Gene verschiedener Differenzierungsrichtungen nachweisbar war.

## 5. Diskussion

### 5.1. Analyse von WTX-Veränderungen in Wilms Tumoren

In verschiedenen bisherigen Studien wurden WTX-Veränderungen in Wilms Tumoren mit einer Häufigkeit, die von 30 % (51 untersuchte Fälle) [Rivera 2007], 22 % (59 Fälle) [Fukuzawa 2009], 18,4 % (125 Fälle) [Ruteshouser 2008] bis zu 15 % (95 Fälle) [Perotti 2008] reicht, beschrieben. Da dieses uneinheitliche Bild in der zum Teil geringen Fallzahl begründet sein könnte, wurde in dieser Arbeit ein großer Satz von ca. 400 Wilms Tumor-Proben auf WTX-Deletion und -Mutation untersucht.

Betrachtet man nur genomische Deletionen bzw. Allelverluste in der WTX-Region, so traten diese in der vorliegenden Arbeit in 17 % der Fälle auf. Die Häufigkeit liegt damit unter einigen früheren publizierten Werten von 21,6 % [Rivera 2007] oder 20,3 % [Fukuzawa 2009], aber über 11,8 % [Ruteshouser 2008] bzw. 14,7 % [Perotti 2008], die ebenfalls berichtet wurden. In der Zusammenschau aller bisher publizierten Daten liegt in 15,2 % (58/382) der Fälle eine WTX-Deletion vor. Werden die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit einbezogen, sind 16,1 % (126/781) aller untersuchten Wilms Tumoren von einem WTX-Verlust betroffen. In dieser Arbeit wurden LOH-Untersuchungen für WT von Patientinnen und semi-quantitative PCR für WT männlicher Patienten genutzt. Dabei zeigte sich, dass WTX-Veränderungen mit 16,4 % Deletionen und 18,3 % LOH zwischen den Geschlechtern sehr ähnlich verteilt waren. Im Gegensatz dazu waren in einer früheren Studie, bei Einsatz gleicher Methoden – qPCR für männliche, LOH für weibliche Patienten – Jungen mit 11 % seltener betroffen als Mädchen mit 18 % [Perotti 2008]. Die Literatur liefert jedoch uneinheitliche Daten. So gibt es auch gegenteilige Berichte, in denen Tumoren von Patientinnen mit 6,9 % weniger WTX-Deletionen aufweisen als WT von männlichen Patienten mit 17,9 % [Ruteshouser 2008].

Die beobachtete Punktmutationsrate in den 104 untersuchten WT-Proben ist mit 2 % deutlich geringer als die in der Erstpublikation gefundene von 7,8 % [Rivera 2007], liegt aber im Bereich der von Perotti beschriebenen (1/97) [Perotti 2008]. Dieses seltene Auftreten von Punktmutationen stimmt mit Daten überein, die aus Untersuchungen anderer maligner Erkrankungen gewonnen wurden: 1/60 Fällen mit Akuter Myeloischer Leukämie [Owen 2008], 0/47 Fällen mit Magen-, 1/47 Fällen mit Darmkrebs und 0/47 Fällen mit Hepatoblastom [Yoo 2009] waren betroffen. Über eine der in dieser Arbeit gefundenen

Mutationen (C1072T), welche zum Abbruch der WTX-Translation bei der AS 353 führt, wurde bereits mehrfach berichtet [Jenkins 2009; Ruteshouser 2009]. Sie stellt möglicherweise einen Mutations-Hotspot dar.

Im Gegensatz zu den meisten bisherigen Studien wurden nicht nur WTX-Veränderungen auf DNA- sondern auch auf RNA-Ebene betrachtet. Die WTX-Expression konnte in 243 Tumorproben untersucht werden, von denen 63 keine oder nur eine sehr geringe Menge an WTX-mRNA aufwiesen. Für 13,1 % (14/107) der untersuchten Tumoren männlicher Patienten und 9,7 % (9/93) der Proben von Patientinnen wurde das Fehlen von WTX-Expression gezeigt, obwohl keine Deletion bzw. LOH in der genomischen DNA vorlagen. Dies deutet auf zusätzliche Mechanismen zur WTX-Inaktivierung hin, die durch epigenetische Prozesse oder bisher unbekannte Veränderungen im WTX-Promotor bzw. weiteren regulatorischen Elementen gesteuert werden könnten. Unterstützt wird diese Vermutung durch Ergebnisse von Ruteshouser et al. (2008), wo in 2 von 22 WT ohne WTX-Deletion auf DNA-Ebene ebenfalls keine WTX-mRNA nachweisbar war.

Interessanterweise zeigten jedoch einige der Tumoren mit WTX-Deletion bzw. Allelverlust eine mRNA-Expression. Für 17 von 35 Tumoren männlicher Patienten mit WTX-Verlust auf DNA-Ebene stand RNA für eine Analyse zur Verfügung. In drei dieser Tumoren wurde überraschend ein normales Maß an WTX-Expression nachgewiesen. In einem dieser Fälle ist die Kontamination mit gesundem Gewebe (Nierengewebe oder Immunzellen) oder die unvollständige WTX-Deletion innerhalb des Tumors denkbar, da ein schwaches WTX-Signal auf DNA-Ebene detektiert wurde. Im zweiten Fall konnte WTX in einer Tumorregion nachgewiesen werden, während es in einer anderen fehlte – was ebenfalls für einen unvollständigen WTX-Verlust innerhalb des Tumors spricht. Im dritten Fall wurde eine stark verkürzte WTX-Form exprimiert, was einem funktionellen WTX-Verlust entspricht.

Ein ähnliches Bild ergab die Untersuchung von Proben weiblicher Patienten, für die 17 der 33 Proben mit LOH in der WTX-Region zur Verfügung standen. In sechs Fällen mit partiellem Allelverlust trat keine Verringerung der WTX-Expression auf, während alle anderen Proben mit komplettem oder partiellem LOH den Verlust oder zumindest eine starke Reduktion der Expression zeigten. Für Patientinnen gibt es neben der unvollständigen, mosaikartigen DNA-Veränderung oder der Kontamination durch normale, gesunde Zellen eine weitere mögliche Erklärung: Der Allelverlust kann das inaktive X-Chromosom betreffen und damit ohne

Auswirkung auf die WTX-Expression bleiben. Dabei ist jedoch fraglich, ob dies einen Selektionsvorteil für die Tumorzellen bietet und relevant für die Tumorentstehung ist. Insgesamt betrachtet, zeigt ein großer Anteil der Wilms Tumoren den Verlust einer WTX-Expression, sei es nun durch genetische Veränderungen oder weitere, bisher nicht aufgeklärte Mechanismen.

Wird der Anteil der Fälle mit WTX-Deletion bzw. Allelverlust und der Fälle ohne WTX-Expression zusammengefasst, sind in dem analysierten Tumorsatz 28 % der WT von WTX-Verlust betroffen. Dabei tritt ein WTX-Verlust auf DNA-Ebene mit 17 % etwas häufiger auf als das Fehlen der WTX-Expression ohne genomische Veränderungen mit 11 %.

Obwohl ursprünglich angenommen wurde, dass WTX- und CTNNB1/WT1-Mutationen sich gegenseitig ausschließen, gab es in dem hier untersuchten Tumorsatz einige Proben, die sowohl WTX- als auch CTNNB1- bzw. WT1-Veränderungen zeigten. In Tumoren mit WTX-Veränderung war die  $\beta$ -Catenin-Mutationsrate mit 6,6 % etwas geringer als in Tumoren mit Wildtyp-WTX (10,9 %), allerdings war dieser Unterschied nicht signifikant. WT1-Mutationen traten in Tumoren mit WTX-Veränderung (9,4 %) genau so häufig auf wie in WT mit normalem WTX (10 %). Zusammen mit weiteren Untersuchungen, in denen – wenn auch selten – kombinierte WTX- und CTNNB1/WT1-Mutationen gefunden wurden [Fukuzawa 2009; Rivera 2007; Ruteshouser 2008], sprechen diese Ergebnisse gegen eine redundante Funktion von  $\beta$ -Catenin und WTX in Wilms Tumoren. Diese Vorstellung wird durch Daten unterstützt, die unterschiedliche WTX-Funktionen in Abhängigkeit von der Entstehungslinie des WT wahrscheinlich erscheinen lassen [Fukuzawa 2009]. Die Autoren dieser Studie schlagen einen Mechanismus vor, in dem WTX in Tumoren mesenchymaler Abstammung als Bestandteil des kanonischen WNT-Signalweges agiert, während die Interaktion von WTX mit APC in Tumoren epithelialer Herkunft von Bedeutung ist.

Im Gegensatz zu allen bisher bekannten genetischen Veränderungen in WT, die stets das gesamte Tumorgewebe betreffen, traten inhomogene WTX-Veränderungen in einigen der untersuchten Fälle auf. Diese Auffälligkeit wurde an einem Fall mit uneinheitlicher Verteilung einer WTX-Punktmutation und an einem weiteren Tumor mit unvollständigem Allelverlust innerhalb des WTX-Gens genauer betrachtet. In beiden Fällen konnte die tumorspezifische Herkunft aller verwendeten DNA-Proben durch einen vollständigen LOH auf dem Chromosom 11 belegt werden. Die Untersuchung verschiedener Tumorregionen, die durch

Mikrodissektion einzelner Gefrierschnitte in epitheliale, Blastem- und Stroma-Komponenten getrennt wurden, ergab eine große Variabilität des Anteils an mutiertem WTX. Dabei war das Auftreten von verändertem WTX nicht auf einzelne histologische Kompartimente beschränkt und der Mutationsstatus stand nicht mit der Tumorhistologie im Zusammenhang. Das gleiche Bild zeigte sich in dem Tumor einer Patientin, der sehr variable Anteile an WTX-Allelverlust in verschiedenen Tumorregionen aufwies, wobei in allen Bereichen ein kompletter LOH in der Region 11p vorlag.

Die hier beschriebenen unvollständigen WTX-Verluste und -Mutationen wiesen darauf hin, dass diese Veränderungen keine notwendigen und frühen Ereignisse in der Entstehung eines WT sind. Ähnliche Beobachtungen wurden auch von Fukuzawa et al. (2009) beschrieben, die eine unvollständige WTX-Deletion im Tumor eines männlichen Patienten fanden. Als mögliche Ursachen wurden dabei die Kontamination mit normalem Gewebe oder eine Mosaikmutation diskutiert. Die Beobachtung, dass WTX-Veränderungen in variablem Ausmaß auftreten können, während andere gut untersuchte und lange bekannte genetische Veränderungen einheitlich innerhalb der untersuchten Tumorprobe vorliegen, deuten darauf hin, dass WTX-Mutationen als spätes Ereignis in der WT-Entwicklung entstehen. Dadurch kann es zu der beschriebenen Mosaik-Verteilung kommen, die im Gegensatz zu den bisher bekannten einheitlichen Veränderungen steht. Die Vorstellung, dass WTX-Veränderungen nicht ursächlich für die Entstehung eines WT sind und erst spät auftreten, steht mit einer Publikation von Jenkins et al. (2009) in Einklang. Darin wurden keine Hinweise auf eine Prädisposition für Krebserkrankungen in Patienten mit Sklerosierender Skelett Dysplasie gefunden, die WTX-Keimbahnmutationen aufweisen, welche einen Verlust der WTX-Funktion zur Folge haben. Dies unterstreicht, dass ein WTX-Verlust wahrscheinlich nicht die initiale Veränderung ist, welche zur Ausbildung eines Wilms Tumors führt und stellt die Funktion als Tumorsuppressorgen im klassischen Sinne in Frage.

Trotz der großen Zahl an betroffenen Wilms Tumoren bleiben der Einfluss von WTX-Veränderungen auf das Verhalten der Tumorzellen und damit das klinische Erscheinungsbild und die Prognose fraglich. Um die klinische Relevanz von WTX-Mutationen zu bewerten, konnte auf klinische Daten eines großen Tumorsets zurückgegriffen werden. Unerwarteterweise bestand keine Korrelation zwischen WTX-Veränderungen und irgendeinem der untersuchten klinischen Parameter (Ansprechen auf Chemotherapie, histologischer Subtyp, Auftreten von Rezidiv bzw. Metastase oder tödlicher Krankheitsverlauf). Diese Beobachtung

deutet darauf hin, dass WTX-Mutationen scheinbar keinen direkten Einfluss auf das Verhalten und das Erscheinungsbild des Wilms Tumors haben. Somit bleibt die Rolle von WTX-Mutationen im Nephroblastom trotz deren relativer Häufigkeit ungeklärt.

## 5.2. Etablierung primärer Wilms Tumor-Kulturen

Um die molekularen Grundlagen von Wilms Tumoren zu untersuchen und gegebenenfalls Therapieansätze zu entwickeln und zu überprüfen, sind gute *in vivo*- und *in vitro*-Modellsysteme notwendig. Obwohl einige wenige WT-Zelllinien beschrieben sind, können diese nur begrenzt die Eigenschaften eines WT repräsentieren. Eine Schwierigkeit besteht hier in der Heterogenität und Plastizität des Nephroblastoms, welche sich nicht anhand einer einzigen Zelllinie nachbilden lässt. Dafür ist die Etablierung verschiedener Zelllinien nötig, um ein breites Spektrum an Wilms Tumoren abzudecken. Deshalb wurde für die vorliegende Arbeit der Ansatz gewählt, aus nativem Gewebe möglichst vieler WT-Typen Primärkulturen anzulegen. Um die Kultivierung echter WT-Zellen zu verifizieren und eine Charakterisierung der Zellen und des entsprechenden Tumors zu ermöglichen, wurde sowohl auf molekulargenetischer als auch auf immunhistologischer Ebene ein Vergleich von Tumorgewebe und kultivierten Zellen durchgeführt.

Trotz der in den meisten Fällen vorangegangenen Chemotherapie konnten in knapp 80 % (44/56) proliferierende Zellen aus dem Tumormaterial gewonnen werden. Dabei war der histologische Subtyp des Tumors nicht ausschlaggebend für eine erfolgreiche Kultivierung: Zellkulturen mit gesicherter Tumorabstammung liegen aus stromareichen, anaplastischen und triphasischen WT vor, und auch aus Tumorproben, die nach Chemotherapie zum großen Teil regressiv waren, konnten Zellen in Kultur genommen werden. Die Art der kultivierten Zellen war unabhängig von der histologischen Zusammensetzung des Tumors, was in erster Linie damit begründet werden kann, dass die Tumorstücke nie aus genau einem Zelltyp bestehen, sondern stets, wenn auch geringe, Anteile histologisch verschiedener Kompartimente enthalten. Bereits frühere Berichte deuten darauf hin, dass eher eine zufällige Kultivierung der Komponenten erfolgt. So konnten aus 18 WT, die zum Teil überwiegend aus epithelalem Gewebe bestanden, nur in zwei Fällen epitheliale Zellen in Kultur genommen werden [Hazen-Martin 1993].

Anhand molekulargenetischer Analysen wurde sichergestellt, dass die kultivierten Zellen von Tumorgewebe und nicht normalem Nierengewebe abstammten. Aus informativen Tumorproben (d. h. solchen mit Mutationen und/oder LOH) konnten in 50 % der Fälle echte WT-Zellen in Kultur genommen werden, die durch eine Übereinstimmung der Veränderungen in Tumorgewebe und Zellkultur charakterisiert waren. In keinem Fall trat ein zusätzlicher Allelverlust während der Kultivierung auf, wie er von Faussillon et al. (2008) für eine primäre WT-Kultur beschrieben wurde. Diese spontan immortalisierte Zelllinie WT-Pe.1 wies einen hypotetraploiden Karyotyp auf und zeigte neben LOH des Ausgangstumors weitere DNA-Verluste in den Chromosomenregionen 3p, 6q, 9q, 11q und 18q. Zwar konnten bisher Zellkulturen von 21 Patienten aufgrund fehlender tumorspezifischer Mutationen nicht charakterisiert werden, jedoch ist davon auszugehen, dass auch ein Teil dieser bei geeigneter Markerauswahl als WT-Zellen bestätigt werden kann.

Unter genetischen Gesichtspunkten bietet das Set an etablierten Primärkulturen ein breites Spektrum: Einige der Kulturen zeigen WT-typische Veränderungen wie CTNNB1- und WT1-Mutationen oder LOH auf dem Chromosom 11. Es sind aber auch Zellen enthalten, in denen nur WTX deletiert ist oder LOH für weniger häufig betroffene Regionen wie 7p, 9q oder 14q auftreten.

Zwischen den WT-Primärkulturen bestand eine große morphologische Heterogenität, innerhalb einer Kultur ähnelten sich die Zellen jedoch stark. Obwohl anfangs zum Teil eine Mischung verschiedener Zellen vorlag, setzte sich nach kurzer Kultivierung meist eine Zellpopulation durch. In der Regel ähnelten sich alle Zelllinien, die aus einem Tumor abgeleitet wurden; aus zwei Tumorproben konnten jedoch morphologisch verschiedene Zellkulturen angelegt werden.

Anhand ihres Phänotyps lassen sich die etablierten Primärzellen in zwei große Gruppen einteilen, die sich auch in der IHC-Charakterisierung widerspiegeln: Zum einen die Cam5.2<sup>+</sup> CD105<sup>-</sup> Kulturen mit Epithelcharakter, welche aus runden, relativ großen Zellen bestehen und zum anderen die Cam5.2<sup>-</sup> CD105<sup>+</sup> Zellen mit mehr oder weniger fibroblastenähnlicher Morphologie. Die Etablierung entsprechender Zelltypen wurde bei methodisch ähnlichem Vorgehen auch in einer früheren Publikation beschrieben [Brown 1989]. Die epithelspezifische Cytokeratin-Expression wurde bereits früher für Wilms Tumoren beschrieben [Droz 1990] und konnte in den Paraffinschnitten der verwendeten

Tumorgewebe bestätigt werden. Die epithelialen Zellen zeigten in Kultur stets eine sehr beschränkte Proliferationsfähigkeit über maximal zehn Passagen. Die Cam5.2<sup>-</sup> CD105<sup>+</sup> Zellen sind phänotypisch weniger homogen. Das Spektrum reicht von spindelförmigen bis zu polygonalen Zellen mit einer Vielzahl an Fortsätzen. CD105 ist ein Marker für mesenchymale Stammzellen, dessen Expression bei gleichzeitigem Fehlen des Epithelmarkers auf einen relativ undifferenzierten Status der Zellen hinweist. Ausnahmen bildeten zwei Zellkulturen (ws483 und ws520-2tr), welche bei fibroblastenähnlichem Phänotyp sowohl Cam5.2 als auch CD105 exprimierten. Allerdings zeigte zumindest ws483 nicht die typische kräftige membranständige Cytokeratinfärbung, sondern ein schwaches punktförmiges – wahrscheinlich mit dem endoplasmatischen Retikulum assoziiertes – Muster.

Die Möglichkeit der Kultivierung relativ wenig differenzierter Zellen mit Eigenschaften von mesenchymalen Stammzellen (MSCs) liegt unter dem Gesichtspunkt nahe, dass Nephroblastome aus embryonalem, undifferenziertem Gewebe (metanephrischem Blastem) entstehen. Kürzlich konnte auch gezeigt werden, dass WT-Zellen in ihrem Chromatin-Profil Nieren-Stammzellen ähneln [Aiden 2010]. Im Gegensatz zu einer Publikation von Royer-Pokora et al. (2010) erforderte die Kultivierung von CD105<sup>+</sup> Zellen keinen Einsatz von speziellem MSC-Medium. Diese war auch mit normalem Zellkultur-Medium (DMEM + 10 % FCS) möglich, ohne dass die Anzucht normaler Nierenzellen begünstigt wurde. Auch WT1-Mutationen waren keine Voraussetzung für die Etablierung langlebiger Zellen. Ob es sich bei den im Rahmen dieser Arbeit etablierten Cam5.2<sup>-</sup> CD105<sup>+</sup> Zellen wirklich um Zellen mit Differenzierungspotential handelt, ließe sich anhand induzierter Differenzierung überprüfen. Dabei ist jedoch davon auszugehen, dass nicht alle Entwicklungsrichtungen eingeschlagen werden können. So gelang in der oben genannten Studie die Generierung von Adipozyten und Chondrozyten nur in einem Teil der getesteten Zelllinien und die osteogene bzw. Muskeldifferenzierung war kaum/nicht möglich [Royer-Pokora 2010].

Einige weitere der beobachteten IHC-Reaktionen wie die einheitliche Vimentin- und fehlende WT1-Expression wurden bereits für andere WT-Zellen beschrieben. IHC-Untersuchungen an WT-Gewebe zeigten, dass Vimentin in erster Linie in Blastembereichen exprimiert wird, während es in tubulären Strukturen nicht nachweisbar ist [Denk 1985; Droz 1990]. Im Gegensatz dazu wurde eine einheitliche Vimentin-Expression nicht nur in den hier etablierten WT-Primärkulturen, sondern auch an anderer Stelle beobachtet [Brown 1989; Faussillon 2008; Garvin 1987; Hazen-Martin 1993; Talts 1993]. Sie entsteht wahrscheinlich

durch die artifiziellen Kulturbedingungen, wie die Publikation von Garvin et al. (1987) nahelegt. Aus einem triphasischen WT wurden von diesen Autoren Zellkulturen nach mehreren Zyklen von Heterotransplantation angelegt. Während sowohl der Ausgangstumor als auch die Heterotransplantate nahezu Vimentin-negativ waren, zeigten die Zellen in Kultur eine starke Vimentin-Expression. Das Fehlen einer nachweisbaren Menge des WT1-Proteins in den Primärkulturen wurde ebenfalls bereits in früheren Publikationen berichtet [Faussillon 2008; Hazen-Martin 1994; Royer-Pokora 2010].

Mit dem Nachweis einer meist kompletten Expression der epithelialen bzw. mesenchymalen Marker Cam5.2 und CD105 stellte sich die Frage nach dem Vorhandensein der Blastemkomponente in den WT-Kulturen. Hierzu wurden CITED1 und NCAM (CD56) als Blastemmarker eingesetzt. Die blastemspezifische Expression von CITED1 wurde für das Nephroblastom beschrieben [Lovvorn 2007] und konnte in dem untersuchten Tumorgewebe bestätigt werden. In Testfärbungen zeigten Blastembereiche von WT-Gewebe auch NCAM-Expression, jedoch scheint diese nicht ausschließlich auf Blastemregionen beschränkt zu sein. So stellten einige Untersuchungen eine NCAM-Expression nicht exklusiv in Blastem, sondern in schwächerem Ausmaß auch in anderen Komponenten dar [Brown 1989; Kapur 2010; Roth 1988]. Keine der in dieser Arbeit etablierten Zellkulturen exprimierte einen der beiden Blastemmarker. Die Kultivierung von Zellen aus der Blastemkomponente scheint schwierig zu sein, wie bereits an anderer Stelle beschrieben wurde [Brown 1989; Hard 1984]. Bei Versuchen, undifferenzierte Zellen aus dem isolierten Blastemanteil von WT-Heterotransplantaten zu gewinnen, deutete die Cytokeratin-Expression in den dort etablierten Zellen auf eine beginnende epitheliale Differenzierung hin [Garvin 1987]. Auch in der vorliegenden Arbeit konnten trotz des Einsatzes einer Vielzahl verschiedener WT-Proben keine undifferenzierten Blastemzellen etabliert werden. Möglicherweise liegt die Ursache hierfür in den *in vitro*-Kulturbedingungen, die sich deutlich von der *in vivo*-Tumorsituation unterscheiden.

Die Lebensdauer und Wachstumsgeschwindigkeit der etablierten WT-Zellen waren sehr unterschiedlich. Während einige Kulturen langsam proliferierten und nur kurze Zeit in Kultur überlebten, wuchsen andere sehr schnell und konnten mehr als 30mal passagiert werden. Die Proliferationsgeschwindigkeit der WT-Kulturen korrelierte mit der Ki67-Expression, welche spezifisch für Zellen außerhalb der G<sub>0</sub>-Phase des Zellzyklus ist. Langsam wachsende

WT-Kulturen hatten einen sehr geringen Anteil an Ki67<sup>+</sup> Zellen, während schnell wachsende Kulturen einen hohen Anteil an Ki67<sup>+</sup> Zellen aufwiesen. Letztendlich gingen alle Primärzellen in Seneszenz über, was die Verwendbarkeit der Kulturen einschränkt, da nur in begrenztem Umfang Material für *in vitro*-Untersuchungen zur Verfügung steht. Außerdem sollten nur frühe Passagen für Versuche eingesetzt werden, um unerwünschte Effekte des Alterns auszuschließen. Durch Immortalisierung der Zellen – zum Beispiel mittels Überexpression von Telomerase – könnte der Übergang in die Seneszenz verzögert oder gar verhindert werden. Da die Telomerase-Expression allein keine Transformation der Zellen bewirkt, sollten auch diese immortalisierten Zellen ein gutes WT-Modell darstellen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte ein Set an Wilms Tumor-Primärkulturen etabliert werden, welche verschiedene typische genetische Veränderungen des Nephroblastoms repräsentieren. Morphologisch und immunhistochemisch sind zwei große Gruppen unterscheidbar: Zum einen epitheliale Zellen und zum anderen fibroblastenähnliche Zellen, die wahrscheinlich stromalen Ursprungs sind und zum Teil MSC-Eigenschaften zeigen. Diese Sammlung primärer WT-Kulturen eröffnet weitere Möglichkeiten, Mechanismen der WT-Entstehung und -Progression *in vitro* in Abhängigkeit von unterschiedlichen genetischen Faktoren zu untersuchen. Des Weiteren steht damit ein Modell zur Verfügung, an dem neue Therapieansätze einer ersten Testung unterzogen werden können.

Neben Primärkulturen stellen Heterotransplantationen in Mäuse eine weitere Methode dar, vitales Nephroblastomgewebe für Experimente zugänglich zu machen. Diese vermehren gegebenenfalls das gesamte Tumormaterial und bieten gegenüber den Primärkulturen den Vorteil, in der Regel die histologische Heterogenität innerhalb eines Tumors zu erhalten und damit die physiologische Situation besser darzustellen. Es sollte versucht werden, aus möglichst vielen verschiedenen Tumorproben sowohl Xenografts als auch Zellkulturen anzulegen – in diesem System ließe sich überprüfen, inwieweit Zellkulturen die Bedingungen innerhalb eines WT widerspiegeln können.

### **5.3. Retinsäure-Signalweg in Wilms Tumoren**

Eine frühere Microarray-Expressionsstudie von Wilms Tumoren nach präoperativer Chemotherapie führte zur Identifizierung von Genen, die mit der Tumorprogression assoziiert sind und eine Rolle im Retinsäure-Signalweg spielen [Zirn 2006]. Um diesen

Zusammenhang von dereguliertem RA-Signalweg und fortgeschrittenem Tumorstadium näher zu beleuchten, wurde in einem großen Set von 162 WT-Proben nach Chemotherapie die Expression von RA-Genen per Realtime-RT-PCR untersucht. Zu beachten ist, dass bei der statistischen Auswertung der Daten kein Abgleich auf das multiple Testen erfolgte, um ein möglichst breites Spektrum an differentiell exprimierten Genen zu erhalten. Dies birgt jedoch die Gefahr, dass bei der Untersuchung mehrerer Gene im Zusammenhang mit verschiedenen klinischen Parametern falsch positive Zusammenhänge gefunden werden.

In der Analyse zeigte sich, dass in erster Linie bei Betrachtung der Risikogruppen (also der histologischen Klassifizierung) Unterschiede im Expressionsmuster zu finden waren. In Tumoren der Hochrisikogruppe waren NMYC, CRABP2 und EZH2 überexprimiert, während RARG, RARRES3, CTGF und ENPP2 geringer exprimiert wurden als in der Vergleichsgruppe mit niedrigem bis mittlerem Risiko. Damit konnte die Korrelation von hochmalignem Erscheinungsbild und Deregulation des RA-Signalweges bestätigt werden, während der früher beschriebene Zusammenhang von dereguliertem RA-Weg und Rezidivbildung nicht nachweisbar war. Die veränderte Expression von RA-Genen wurde nicht nur wie in dieser Arbeit in hochmalignen WT gefunden, sondern auch in primär operierten Wilms Tumoren im Vergleich zu fetaler Niere beschrieben [Li 2005]. Dass unabhängig von der Therapieform eine Fehlregulation des RA-Signalweges gefunden wird, spricht dafür, dass diese eine weitreichende Rolle in der Tumorprogression spielen kann. Für viele andere maligne Erkrankungen wurde ein Einfluss von RA-Genen schon beschrieben. So wurde das Auftreten reduzierter Mengen von RARB/G und RARRES1/3, welche als Rezeptoren bzw. Response-Gene direkt in den RA-Signalweg involviert sind, bereits für eine Reihe anderer Tumoren (z. B. Brustkrebs, Nasopharynx- und Kolorektalkarzinom) gezeigt [Freemantle 2003; Shyu 2003; Sriuranpong 2004]. Das Expressionsniveau von RARB und RARRES3 hat außerdem prognostische Bedeutung beim Neuroblastom [Cheung 1998] und B-Zell-Lymphom [Casanova 2001]. Neben diesen direkt am RA-Signalweg beteiligten Genen ist auch CTGF (=IGFBP8) ein bekanntes RA-Zielgen mit antiproliferativer Wirkung, welches im Zusammenhang mit dem Nephroblastom von Interesse ist. So wurde in einer kleinen Studie gezeigt, dass in acht von zehn untersuchten WT weniger CTGF exprimiert wird als in gesundem Nierengewebe desselben Patienten [Li 2008]. An gleicher Stelle wurde in der Wilms Tumor-Zelllinie WiT-49 die Wachstumshemmung durch CTGF-Überexpression *in vitro* bestätigt.

Während Gene, die in Hochrisiko-WT reprimiert waren, aktivierend im RA-Signalweg wirken, ist das überexprimierte EZH2 ein negativer Regulator dieser Signalkaskade. EZH2 ist an der Steuerung der Embryonalentwicklung und an Onkogenese beteiligt. Große Proteinmengen sind mit einem ungünstigen Krankheitsverlauf in einigen malignen Erkrankungen assoziiert, wie z. B. Prostata- und Mamma-Karzinom [Tonini 2008]. Beim Nephroblastom wurde eine EZH2-Überexpression nicht nur in WT mit hohem vs. geringem/ mittlerem Risiko wie in der vorliegenden Arbeit, sondern auch in Tumorgewebe im Vergleich zu fetaler Niere bzw. gesundem Nierengewebe nachgewiesen [Li 2005; Takahashi 2002]. Im Gegensatz zu EZH2 wirkt das RA-bindende Protein CRABP2 als Co-Aktivator des RA-Signalwegs. Es spielt wahrscheinlich in der RA-Speicherung in der Zelle sowie im Transport vom Zytoplasma in den Nukleus eine Rolle. Es ist nicht nur ein RA-induzierbares Gen, sondern wird in Neuroblastomzellen auch direkt durch NMYC reguliert [Gupta 2006]. Dieser Einfluss konnte auch im Kontext des Nephroblastoms gezeigt werden: So führte eine siRNA-vermittelte Verringerung von NMYC in WiT-49 Zellen zu einem Rückgang der CRABP2-Proteinmenge [Gupta 2008].

NMYC ist ein Onkogen, welches als Transkriptionsfaktor u. a. an Proliferations- und Differenzierungsvorgängen sowie an der Transformation und Apoptose von Zellen beteiligt ist [Adhikary 2005]. Eine wichtige Rolle ist auch in der Progression von WT denkbar. So ergab sich in den untersuchten WT für die NMYC-Überexpression nicht nur eine starke Korrelation mit hoher Malignität des Tumors, sondern auch mit dem Auftreten von Rezidiven und einem tödlichen Krankheitsverlauf. Für das Neuroblastom wurde die NMYC-Überexpression bereits mit einer erhöhten Aggressivität des Tumors und einer schlechten Prognose in Verbindung gebracht und sie wird als Marker für die klinische Stratifizierung dieses Tumors verwendet [Cohn 2004]. Da in dem hier untersuchten Tumorsatz, wie schon in früheren Analysen [Wittmann 2008; Zirn 2006], die NMYC-Überexpression eine sehr starke Assoziation mit ungünstiger Prognose (Auftreten von Rezidiven bzw. Tod) zeigt, könnte NMYC auch im Nephroblastom zur Stratifizierung geeignet sein. In zwei Studien konnte anhand von CGH-Profilen gezeigt werden, dass in einigen WT – besonders in denen mit hoher Malignität – mehr als zwei Kopien des NMYC-Gens vorliegen [Schaub 2007; Williams 2010]. Auch in weiteren pädiatrischen Tumorerkrankungen wie dem Rhabdomyosarkom [Williamson 2005] und dem Medulloblastom [Pfister 2009] steht die Erhöhung der NMYC-Kopienzahl mit einer

schlechten Prognose in Verbindung. Ein solcher Zugewinn an NMYC-codierender DNA könnte die Ursache für die in dieser Arbeit gefundene Überexpression sein.

Mit den durchgeführten Expressionsuntersuchungen in einem großen Tumorsatz konnten Microarray-Daten, die früher anhand einer kleineren Probenanzahl (n=63) gewonnen wurden, zum großen Teil bestätigt werden [Zirn 2006]. Die Korrelation von dereguliertem RA-Signalweg mit hoher Malignität des Tumors wurde deutlich, wobei kein statistisch signifikanter Zusammenhang mit Rezidiventstehung nachgewiesen werden konnte.

#### **5.4. Einfluss von Retinsäurebehandlung auf primäre Wilms Tumor-Kulturen**

Nachdem eine Deregulation von RA-Genen in hochmalignen Wilms Tumoren gefunden wurde, stellte sich die Frage, ob Patienten mit Tumoren ungünstiger Histologie vom Einsatz von Retinoiden in der Therapie profitieren könnten. Unterstützt wird diese Idee von der Tatsache, dass RA eine entscheidende Rolle während der primären Musterbildung in der normalen Nierenentwicklung spielt [Burrow 2000] und Wilms Tumoren aus undifferenzierten Nierenvorläuferzellen entstehen. Die RA-vermittelte Induktion von Differenzierung wäre von Vorteil, da ausdifferenzierte Zellen ein deutlich verringertes Proliferationspotential zeigen. Auf klinischer Seite gibt es bereits gute Kenntnisse über den Einsatz von Retinsäure in der Tumorbehandlung. So wird ATRA in der Standardtherapie von APL verwendet [Fenaux 2001] und klinische Tests bei Neuroblastompatienten verliefen erfolgsversprechend [Reynolds 2003]. Es liegen also bereits Erfahrungen zum Einsatz in der pädiatrischen Onkologie vor.

Für einen *in vitro*-Test der RA-Behandlung wurden vier primäre WT-Kulturen eingesetzt, die im unbehandelten Zustand eine unterschiedliche Aktivität des RA-Signalwegs aufwiesen. Die Behandlung erfolgte mit *all-trans*-RA, *9cis*-RA sowie dem synthetischen Retinoid Fenretinid (4HPR). ATRA und *9cis*RA unterscheiden sich in ihren Rezeptorbindungseigenschaften: Während ATRA nur an RARs bindet, interagiert *9cis*RA sowohl mit Retinsäure- als auch Retinoid-X-Rezeptoren. *13cis*-RA wird in der Klinik zwar häufig eingesetzt, fand jedoch keinen Eingang in die hier beschriebene Untersuchung, da diese Isoform wohl nur eine Vorstufe (Prodrug) ist und im Körper zu ATRA umgebaut wird. *13cis*RA selbst hat eine sehr geringe Bindungsaffinität zu RARs und RXRs und wirkt wahrscheinlich erst nach Isomerisierung zu

ATRA [Armstrong 2005]. Das synthetische 4HPR greift sowohl in rezeptorabhängiger Weise wie ATRA und 9cisRA als auch über RA-Rezeptor-unabhängige Mechanismen ein und induziert in erster Linie Apoptose/Nekrose und nicht Differenzierung. Dabei sind je nach Zelltyp unterschiedliche Wege beschrieben: Nachgewiesen sind die Induktion von reaktiven Sauerstoffspezies und Ceramiden, aber auch die RAR-abhängige Apoptose-Induktion [Clifford 1999; Maurer 1999; Sun 1999].

In einem ersten Schritt wurde die Expression von Genen, die in Hochrisiko-Tumoren dereguliert waren, nach Retinoidbehandlung analysiert. Für die meisten dieser Gene zeigte sich eine umgekehrte Regulationsrichtung – Gene, deren Überexpression mit hoher Malignität korrelierte, waren weniger exprimiert (CRABP2, EZH2 und NMYC) und die deutliche Expressionssteigerung von RARRES1/3 bzw. RARB wies auf eine verstärkte RA-Signalweg-Aktivität hin. Diese Aktivierung trat dabei unabhängig vom ursprünglichen Status der Zellen (geringe oder hohe RA-Signalwegaktivität) ein. Die inverse Genregulation spricht für einen positiven Effekt der RA-Gabe auf die WT-Zellen und bestätigt Befunde, die aus der Behandlung von zwei weiteren WT-Primärkulturen gewonnen wurden [Zirn 2005a].

Neben der Veränderung der Genexpression verursachten die eingesetzten Retinoide bereits nach kurzer Behandlungsdauer eine Hemmung des Zellwachstums in sechs der sieben untersuchten WT-Primärkulturen. Wahrscheinlich spielt die Überexpression von RARB eine wichtige Rolle für die Proliferationsreduktion [Sun 2000] und auch für RARRES3 wurde bereits ein antiproliferativer Effekt auf eine Reihe von Tumorzelllinien beschrieben [DiSepio 1998]. Sowohl auf molekularer Ebene (Genexpression) als auch bei der Wachstumshemmung hatten ATRA- und 9cisRA-Behandlung die gleichen Folgen, unabhängig von den unterschiedlichen Rezeptorbindungseigenschaften der Retinoide. Für eine RA-induzierte Differenzierung in WT-Zellen spricht, dass sowohl bei ATRA- als auch 9cisRA-Gabe eine deutliche Morphologieänderung auftrat: Die Zellen wurden deutlich größer und entwickelten ein gut sichtbares Zytoskelett. Allerdings war diese Umwandlung reversibel und selbst bei einer mehrwöchigen Behandlung blieb der Phänotyp nach Absetzen der Therapie nicht erhalten. Eventuell erreichten ATRA und 9cisRA keine endgültige Differenzierung der WT-Zellen. Dafür spricht auch die Rückgewinnung des Proliferationspotentials sowohl nach kurzzeitiger als auch langfristiger ATRA-Gabe. Ein Teil der Zellen zeigte nach viertägiger Behandlung zwar geringe Anzeichen von Seneszenz, jedoch ist nicht klar, ob direkt Seneszenz induziert wurde oder diese erst in Folge von Differenzierungsvorgängen auftrat.

Um die Hintergründe der ATRA-induzierten Differenzierung näher zu beleuchten, sollten in einer Microarray-Analyse Änderungen des Expressionsmusters unter ATRA-Gabe beobachtet werden. Dabei wurde deutlich, dass ATRA weitreichenden Einfluss auf das Expressionsprofil der untersuchten Primärzellen hatte und eine große Anzahl von Genen beeinflusste. Eine wichtige funktionelle Gruppe bilden dabei Gene, deren Produkte eine Rolle im Retinsäure-Signalweg und -Metabolismus spielen, wie z. B. RARB, RARRES1/3, ALDH1A1, DHRS3 oder CYP26A1/B1. Durch die Untersuchung konnte jedoch nicht eindeutig geklärt werden, welche Differenzierungsrichtung die Zellen einschlagen. Auch die Validierung der differentiellen Genexpression mittels Realtime-RT-PCR in anderen WT-Kulturen erlaubte keine weitere Eingrenzung. Während in Neuroblastomzellen durch ATRA eine klare neurale Ausrichtung erfolgt [Reynolds 1991], zeigte das Expressionsprofil in Nephroblastomzellen keinen eindeutigen Trend. Auffällig war, dass die Expression vieler Gene geändert wurde, die einen Einfluss auf die Bildung einer extrazellulären Matrix haben. So wurde die Transkription zahlreicher Gene gesteigert, die wichtig für Calciumtransport und -ablagerung sind. Diese Daten sprechen für eine Reorganisation der extrazellulären Matrix unter ATRA-Gabe. Neben den ECM-Genen waren solche betroffen, die in unterschiedliche Differenzierungsprozesse involviert sind. Eine funktionelle Clusteranalyse mit DAVID ergab Gen-Gruppen, die an neuronaler Entwicklung, Muskeldifferenzierung sowie Knochen- und Knorpelbildung beteiligt sind. Dass sich WT-Zellen in eine Vielzahl verschiedener Gewebe differenzieren können, belegen Befunde, nach denen in stromareichen WT neben häufig auftretender quergestreifter Muskulatur auch Knochen, Knorpel oder neurale Elemente gefunden werden. Ein Vergleich mit Microarray-Analysen verschiedener Zelltypen könnte hilfreich sein, um mehr Klarheit über die ATRA-induzierte Differenzierungsrichtung zu erhalten. Es ist jedoch nicht zwingend davon auszugehen, dass eine klare Zuordnung der ATRA-behandelten WT-Zellen zu einem bestimmten Zelltyp möglich ist. Nicht nur im Falle der WT-Primärkulturen liegt wahrscheinlich eine unvollständige Differenzierung durch ATRA vor. So zeigten Rhabdomyosarkom-Zelllinien bei ATRA-Behandlung zwar eine Differenzierungstendenz, jedoch verlief diese nicht vollständig bis zur Formation von Myotuben [Barlow 2006]. Ein weiterer Hinweis auf eine unvollständige Differenzierung von WT-Zellen unter ATRA-Gabe war die Rückgewinnung des Proliferationspotentials und die Rückkehr zur ursprünglichen Zellmorphologie einige Tage nach Absetzen der Therapie. Obwohl für einige Neuroblastom-Zelllinien eine kurzzeitige ATRA-Gabe als ausreichend beschrieben ist, um

eine dauerhafte Wachstumsreduktion zu induzieren, gibt es auch dort Zelllinien, deren Proliferationsrate nach ATRA-Entzug wieder zunimmt [Reynolds 1991]. Ebenso wie für die WT-Primärkulturen lässt sich durch eine wiederholte ATRA-Behandlung das Zellwachstum abermals verringern. Eine Pulstherapie mit ATRA könnte entsprechend ausreichend für eine nachhaltige Begrenzung des WT-Wachstums sein. Ein weiterer zu beachtender Punkt ist die *in vivo*-Situation im Patienten, die sich z. T. deutlich von den *in vitro*-Gegebenheiten unterscheidet. So kann im speziellen Tumorumfeld (der Tumornische) ein Zusammenwirken von endogenen Faktoren mit RA-vermittelter Wachstumsreduktion und Differenzierungsinduktion möglicherweise einen dauerhaften Stopp des Tumorwachstums erzielen.

Die Gabe des künstlichen Retinoids Fenretinid führte ebenfalls zu Wachstumshemmung und einer Änderung der Genexpression in WT-Zellen. Auch wenn die 4HPR-Wirkung nicht in erster Linie über den RA-Signalweg vermittelt wird, wurde die Regulation wichtiger Gene dieses Signalwegs (z. B. RARB und RARRES1/3) in ähnlicher Weise wie durch ATRA und 9cisRA beeinflusst. Das Ausbleiben morphologischer Veränderungen unter 4HPR-Gabe und die in einigen WT-Kulturen nachgewiesene Apoptose-Induktion unterstreichen jedoch Befunde, dass Fenretinid im Gegensatz zu klassischen Retinoiden keine Zelldifferenzierung bewirkt, sondern seinen wachstumshemmenden Effekt durch Apoptose erzielt. Ähnliche Ergebnisse gab es bereits früh für Neuroblastomzellen [Ponzoni 1995] und auch in einer ganzen Reihe weiterer Tumorzellen konnte die Apoptose-Induktion durch 4HPR nachgewiesen werden [zusammengefasst in Hail 2006]. Da dieses synthetische Retinoid nicht primär über den RA-Signalweg wirkt, stellt es eventuell eine Alternative in der Therapie ATRA-resistenter Tumoren dar. Dabei ist jedoch zu bedenken, dass auch Fenretinid möglicherweise keinen dauerhaften Effekt zeigt, da die untersuchten WT-Zellen nach Beendigung der Behandlung erneut proliferierten. Eine Puls-Therapie könnte auch hier eine Option sein.

Eine weitere Variante im Umgang mit ATRA-resistenten Tumoren ist die Durchführung einer Kombinationstherapie. So konnte eine synergistische Wirkung von HDAC-Inhibitoren beim gleichzeitigen Einsatz von Retinoiden u. a. in der Behandlung von APL gezeigt werden, die sogar RA-resistente Zelllinien einschloss [Lin 1998]. Für die getesteten WT-Kulturen brachte die Gabe des HDAC-Inhibitors SAHA zusammen mit ATRA oder Fenretinid jedoch keinen zusätzlichen Erfolg. Im Gegensatz dazu wurde in Neuroblastom-Zelllinien und -Xenografts

durch die Kombination von HDAC-Inhibitoren und ATRA eine Verstärkung des differenzierenden Effekts von ATRA erzielt [Hahn 2008]. Die dort eingesetzte Konzentration von 150 nM SAHA wurde auch für die WT-Primärzellen genutzt, ist aber möglicherweise in diesem System zu niedrig, um einen synergistischen Effekt zu erreichen.

Eine Ausnahme bildete bei allen Untersuchungen – sowohl in Bezug auf die Genexpression als auch das Wachstumsverhalten – die Primärkultur ws592, welche weitgehend unbeeinflusst von der Retinoidbehandlung blieb. Sie zeigte weder Veränderungen in der Expression der untersuchten RA-Zielgene noch wurde ihre Morphologie oder Wachstumsgeschwindigkeit durch ATRA oder 9cisRA verändert. Diese Primärkultur besteht überwiegend aus CD105<sup>-</sup> Cam5.2<sup>+</sup> Zellen, was auf eine epitheliale Differenzierung hindeutet. Möglicherweise sind diese Primärzellen bereits soweit „ausdifferenziert“, dass sie der ATRA- bzw. 9cisRA-vermittelten Differenzierungsinduktion nicht mehr zugänglich sind. Gestützt wird diese Vorstellung von der Beobachtung, dass im Gegensatz zu den „klassischen“ Retinoiden Fenretinid eine Proliferationsreduktion erreichte, auch wenn diese aufgrund des insgesamt sehr langsamen Wachstums der Zellkultur ws592 schwach ausfiel. Zu beachten ist bei der Betrachtung dieser Primärkultur, dass sie von einem mesoblastischen Nephrom (MN) abgeleitet wurde. Dieser (benigne) Tumor zeigt große Ähnlichkeit mit dem WT und wurde ursprünglich auch als solcher klassifiziert, stellt wahrscheinlich aber eine davon abgegrenzte Erkrankung dar. Das Expressionsprofil des mesoblastischen Nephroms gleicht sehr dem WT-Profil, während große Unterschiede zu anderen Nierentumoren des Kindesalters bestehen [Sugimura 2004]. Allerdings wurde eine CRABP1-Überexpression in MN im Vergleich zu WT gefunden. Diese könnte eine Ursache für eine abweichende Reaktion auf die RA-Behandlung sein, da CRABP1 hemmend auf den Retinsäure-Signalweg wirkt.

Da in dieser und vorangegangenen Arbeiten gezeigt wurde, dass eine Deregulation des Retinsäure-Signalwegs in WT mit einem hohen Risiko korreliert, erscheint der Einsatz von Retinoiden als interessante Behandlungsstrategie für das Nephroblastom. In *in vitro*-Versuchen mit verschiedenen primären WT-Zellen konnten eine inverse Regulation der RA-Gene durch eine Behandlung mit Retinoiden erreicht und ein positiver wachstumshemmender Effekt von RA nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass Retinoide eine nützliche Ergänzung zu derzeitigen Therapieansätzen des

Nephroblastoms bieten können. Eventuell stellt die Retinoidgabe sogar eine Möglichkeit zur Behandlung chemotherapieresistenter Wilms Tumoren dar. Einen weiteren Einsatzbereich könnte die Therapie von Nephroblastomatosen darstellen. Die Nephroblastomatose ist eine prämaligne Läsion und kann als Vorstufe des Wilms Tumors auftreten. Sie zeichnet sich histologisch durch das Auftreten von undifferenziertem embryonalem Nierengewebe jenseits der normalen Embryonalentwicklung aus. Patienten könnten von einer RA-induzierten Differenzierung dieses Gewebes profitieren. Beim ersten klinischen Einsatz von 13cisRA zur Nephroblastomatose-Therapie zeigte sich ein gutes Ansprechen auf die Retinoidgabe [Witt 2009].

Weitere Untersuchungen auf diesem Gebiet sind jedoch nötig. So wäre eine Reduktion der Retinoidkonzentration wünschenswert, da die hier eingesetzte ( $10 \mu\text{M}$ ) zwar als Serumspiegel in Patienten erreicht werden kann [Reynolds 2003], jedoch die Einnahme großer Medikamentenmengen erfordert und mit einigen Nebenwirkungen verbunden ist. Des Weiteren ist zu klären, ob mit einer Pulstherapie die gleichen Erfolge erzielt werden können wie mit kontinuierlicher RA-Gabe. Auch eine bessere Charakterisierung der Fenretinid-Wirkung ist lohnenswert, da diese Substanz einige Vorteile gegenüber ATRA bietet: 4HPR zeigt eine geringere Systemtoxizität, es können höhere Serumkonzentrationen erreicht werden und es bietet eine Alternative bei der Behandlung RA-resistenter Tumorzellen. Vor einem therapeutischen Retinoid-Einsatz sind *in vivo*-Versuche jedoch unerlässlich, da ein Zellkulturmodell stets nur erste Hinweise auf eine erfolgversprechende Methode liefern kann. Für ein solches Vorhaben ist zunächst die Etablierung eines WT-Xenograft-Modells notwendig, um Tests unter möglichst physiologischen Bedingungen durchführen zu können.

## 6. Literatur

- Adhikary S, Eilers M. 2005. Transcriptional regulation and transformation by Myc proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6(8):635-45.
- Aiden AP, Rivera MN, Rheinbay E, Ku M, Coffman EJ, Truong TT, Vargas SO, Lander ES, Haber DA, Bernstein BE. 2010. Wilms tumor chromatin profiles highlight stem cell properties and a renal developmental network. *Cell Stem Cell* 6(6):591-602.
- Armstrong JF, Kaufman MH, van Heyningen V, Bard JB. 1993. Embryonic kidney rudiments grown in adult mice fail to mimic the Wilms' phenotype, but show strain-specific morphogenesis. *Exp Nephrol* 1(3):168-74.
- Armstrong JL, Redfern CP, Veal GJ. 2005. 13-cis retinoic acid and isomerisation in paediatric oncology--is changing shape the key to success? *Biochem Pharmacol* 69(9):1299-306.
- Babyn P, Owens C, Gyepes M, D'Angio GJ. 1995. Imaging patients with Wilms tumor. *Hematol Oncol Clin North Am* 9(6):1217-52.
- Barlow JW, Wiley JC, Mous M, Narendran A, Gee MF, Goldberg M, Sexsmith E, Malkin D. 2006. Differentiation of rhabdomyosarcoma cell lines using retinoic acid. *Pediatr Blood Cancer* 47(6):773-84.
- Birch JM, Breslow N. 1995. Epidemiologic features of Wilms tumor. *Hematol Oncol Clin North Am* 9(6):1157-78.
- Breslow N, Olshan A, Beckwith JB, Green DM. 1993. Epidemiology of Wilms tumor. *Med Pediatr Oncol* 21(3):172-81.
- Breslow NE, Olson J, Moksness J, Beckwith JB, Grundy P. 1996. Familial Wilms' tumor: a descriptive study. *Med Pediatr Oncol* 27(5):398-403.
- Brown KW, Shaw AP, Poirier V, Tyler SJ, Berry PJ, Mott MG, Maitland NJ. 1989. Loss of chromosome 11p alleles in cultured cells derived from Wilms' tumours. *Br J Cancer* 60(1):25-9.
- Burrow CR. 2000. Retinoids and renal development. *Exp Nephrol* 8(4-5):219-25.
- Call KM, Glaser T, Ito CY, Buckler AJ, Pelletier J, Haber DA, Rose EA, Kral A, Yeger H, Lewis WH and others. 1990. Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus. *Cell* 60(3):509-20.
- Casanova B, de la Fuente MT, Garcia-Gila M, Sanz L, Silva A, Garcia-Marco JA, Garcia-Pardo A. 2001. The class II tumor-suppressor gene RARRES3 is expressed in B cell lymphocytic leukemias and down-regulated with disease progression. *Leukemia* 15(10):1521-6.
- Cheung B, Hocker JE, Smith SA, Norris MD, Haber M, Marshall GM. 1998. Favorable prognostic significance of high-level retinoic acid receptor beta expression in neuroblastoma mediated by effects on cell cycle regulation. *Oncogene* 17(6):751-9.
- Christian S, Winkler R, Helfrich I, Boos AM, Besemfelder E, Schadendorf D, Augustin HG. 2008. Endosialin (Tem1) is a marker of tumor-associated myofibroblasts and tumor vessel-associated mural cells. *Am J Pathol* 172(2):486-94.

- Clifford JL, Menter DG, Wang M, Lotan R, Lippman SM. 1999. Retinoid receptor-dependent and -independent effects of N-(4-hydroxyphenyl)retinamide in F9 embryonal carcinoma cells. *Cancer Res* 59(1):14-8.
- Cohn SL, Tweddle DA. 2004. MYCN amplification remains prognostically strong 20 years after its "clinical debut". *Eur J Cancer* 40(18):2639-42.
- Coppes-Zantinga AR, Coppes MJ. 1999. The eponym "Wilms": a reminder of a surgeon's lifelong contributions to medicine. *Med Pediatr Oncol* 32(6):438-9.
- Davies JA, Lodomery M, Hohenstein P, Michael L, Shafe A, Spraggon L, Hastie N. 2004. Development of an siRNA-based method for repressing specific genes in renal organ culture and its use to show that the Wt1 tumour suppressor is required for nephron differentiation. *Hum Mol Genet* 13(2):235-46.
- Denk H, Weybora W, Ratschek M, Sohar R, Franke WW. 1985. Distribution of vimentin, cytokeratins, and desmosomal-plaque proteins in human nephroblastoma as revealed by specific antibodies: co-existence of cell groups of different degrees of epithelial differentiation. *Differentiation* 29(1):88-97.
- DiSepio D, Ghosn C, Eckert RL, Deucher A, Robinson N, Duvic M, Chandraratna RA, Nagpal S. 1998. Identification and characterization of a retinoid-induced class II tumor suppressor/growth regulatory gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(25):14811-5.
- Droz D, Rousseau-Merck MF, Jaubert F, Diebold N, Nezelof C, Adafer E, Mouly H. 1990. Cell differentiation in Wilms' tumor (nephroblastoma): an immunohistochemical study. *Hum Pathol* 21(5):536-44.
- Faussillon M, Murakami I, Bichat M, Telvi L, Jeanpierre C, Nezelof C, Jaubert F, Gogusev J. 2008. Molecular cytogenetic anomalies and phenotype alterations in a newly established cell line from Wilms tumor with diffuse anaplasia. *Cancer Genet Cytogenet* 184(1):22-30.
- Fenaux P, Chomienne C, Degos L. 2001. All-trans retinoic acid and chemotherapy in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Semin Hematol* 38(1):13-25.
- Freemantle SJ, Spinella MJ, Dmitrovsky E. 2003. Retinoids in cancer therapy and chemoprevention: promise meets resistance. *Oncogene* 22(47):7305-15.
- Fukuzawa R, Anaka MR, Weeks RJ, Morison IM, Reeve AE. 2009. Canonical WNT signalling determines lineage specificity in Wilms tumour. *Oncogene* 28(8):1063-75.
- Furtwängler R, Schenk JP, Alkasser M, Leuschner I, Rube C, von Schweinitz D, Gessler M, Graf N. 2008. Das Nephroblastom und andere pädiatrische Nierentumoren. *Pädiatrische Praxis* 72(1):59-77.
- Furtwängler R, Schenk JP, Reinhard H, Leuschner I, Rube C, von Schweinitz D, Graf N. 2005. Nephroblastom - Wilms Tumor. *Der Onkologe* 11:1077-1089.
- Garvin AJ, Re GG, Tarnowski BI, Hazen-Martin DJ, Sens DA. 1993. The G401 cell line, utilized for studies of chromosomal changes in Wilms' tumor, is derived from a rhabdoid tumor of the kidney. *Am J Pathol* 142(2):375-80.

- Garvin AJ, Sullivan JL, Bennett DD, Stanley WS, Inabnett T, Sens DA. 1987. The in vitro growth, heterotransplantation, and immunohistochemical characterization of the blastemal component of Wilms' tumor. *Am J Pathol* 129(2):353-63.
- Gessler M, König A, Arden K, Grundy P, Orkin S, Sallan S, Peters C, Ruyle S, Mandell J, Li F and others. 1994. Infrequent mutation of the WT1 gene in 77 Wilms' Tumors. *Hum Mutat* 3(3):212-22.
- Gessler M, Poustka A, Cavenee W, Neve RL, Orkin SH, Bruns GA. 1990. Homozygous deletion in Wilms tumours of a zinc-finger gene identified by chromosome jumping. *Nature* 343(6260):774-8.
- Glass CK, Rosenfeld MG. 2000. The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev* 14(2):121-41.
- Graf N, Reinhard H. 2003. [Wilms tumors. Diagnosis and therapy]. *Urologe A* 42(3):W391-407; quiz W408-9.
- Grohmann A, Tanneberger K, Alzner A, Schneikert J, Behrens J. 2007. AMER1 regulates the distribution of the tumor suppressor APC between microtubules and the plasma membrane. *J Cell Sci* 120(Pt 21):3738-47.
- Grundy PE, Telzerow PE, Breslow N, Moksness J, Huff V, Paterson MC. 1994. Loss of heterozygosity for chromosomes 16q and 1p in Wilms' tumors predicts an adverse outcome. *Cancer Res* 54(9):2331-3.
- Grundy RG, Pritchard J, Scambler P, Cowell JK. 1998. Loss of heterozygosity for the short arm of chromosome 7 in sporadic Wilms tumour. *Oncogene* 17(3):395-400.
- Gupta A, Williams BR, Hanash SM, Rawwas J. 2006. Cellular retinoic acid-binding protein II is a direct transcriptional target of MycN in neuroblastoma. *Cancer Res* 66(16):8100-8.
- Hahn CK, Ross KN, Warrington IM, Mazitschek R, Kanegai CM, Wright RD, Kung AL, Golub TR, Stegmaier K. 2008. Expression-based screening identifies the combination of histone deacetylase inhibitors and retinoids for neuroblastoma differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(28):9751-6.
- Hail N, Jr., Kim HJ, Lotan R. 2006. Mechanisms of fenretinide-induced apoptosis. *Apoptosis* 11(10):1677-94.
- Hard GC. 1984. In vitro culture and transplantation models of Wilms' tumor. In: Pochedly C, Baum E, editors. *Wilms' tumor clinical and biological manifestations*. New York: Elsevier Scientific Publishing Co Inc.
- Hard GC. 1985. Differential renal tumor response to N-ethylnitrosourea and dimethylnitrosamine in the Nb rat: basis for a new rodent model of nephroblastoma. *Carcinogenesis* 6(11):1551-8.
- Hazen-Martin DJ, Garvin AJ, Gansler T, Tarnowski BI, Sens DA. 1993. Morphology and growth characteristics of epithelial cells from classic Wilms' tumors. *Am J Pathol* 142(3):893-905.
- Hazen-Martin DJ, Re GG, Garvin AJ, Sens DA. 1994. Distinctive properties of an anaplastic Wilms' tumor and its associated epithelial cell line. *Am J Pathol* 144(5):1023-34.

- Hohenstein P, Hastie ND. 2006. The many facets of the Wilms' tumour gene, WT1. *Hum Mol Genet* 15 Spec No 2:R196-201.
- Houghton PJ, Morton CL, Tucker C, Payne D, Favours E, Cole C, Gorlick R, Kolb EA, Zhang W, Lock R and others. 2007. The pediatric preclinical testing program: description of models and early testing results. *Pediatr Blood Cancer* 49(7):928-40.
- Huff V. 1998. Wilms tumor genetics. *Am J Med Genet* 79(4):260-7.
- Huff V, Amos CI, Douglass EC, Fisher R, Geiser CF, Krill CE, Li FP, Strong LC, McDonald JM. 1997. Evidence for genetic heterogeneity in familial Wilms' tumor. *Cancer Res* 57(10):1859-62.
- Jenkins ZA, van Kogelenberg M, Morgan T, Jeffs A, Fukuzawa R, Pearl E, Thaller C, Hing AV, Porteous ME, Garcia-Minaur S and others. 2009. Germline mutations in WTX cause a sclerosing skeletal dysplasia but do not predispose to tumorigenesis. *Nat Genet* 41(1):95-100.
- Kapur P, Rakheja D. 2010. Immunohistochemical expression of NCAM in Wilms tumors, nephrogenic rests, and fetal and postnatal renal cortices. *Pediatr Dev Pathol*.
- Kastner P, Mark M, Chambon P. 1995. Nonsteroid nuclear receptors: what are genetic studies telling us about their role in real life? *Cell* 83(6):859-69.
- Klamt B, Schulze M, Thate C, Mares J, Goetz P, Kodet R, Scheulen W, Weirich A, Graf N, 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.
- Koesters R, Ridder R, Kopp-Schneider A, Betts D, Adams V, Niggli F, Briner J, von Knebel Doeberitz M. 1999. Mutational activation of the beta-catenin proto-oncogene is a common event in the development of Wilms' tumors. *Cancer Res* 59(16):3880-2.
- Li MH, Sanchez T, Pappalardo A, Lynch KR, Hla T, Ferrer F. 2008. Induction of antiproliferative connective tissue growth factor expression in Wilms' tumor cells by sphingosine-1-phosphate receptor 2. *Mol Cancer Res* 6(10):1649-56.
- Li W, Kessler P, Williams BR. 2005. Transcript profiling of Wilms tumors reveals connections to kidney morphogenesis and expression patterns associated with anaplasia. *Oncogene* 24(3):457-68.
- Lin RJ, Nagy L, Inoue S, Shao W, Miller WH, Jr., Evans RM. 1998. Role of the histone deacetylase complex in acute promyelocytic leukaemia. *Nature* 391(6669):811-4.
- Lovorn HN, Westrup J, Opperman S, Boyle S, Shi G, Anderson J, Perlman EJ, Perantoni AO, Wills M, de Caestecker M. 2007. CITED1 expression in Wilms' tumor and embryonic kidney. *Neoplasia* 9(7):589-600.
- Maiti S, Alam R, Amos CI, Huff V. 2000. Frequent association of beta-catenin and WT1 mutations in Wilms tumors. *Cancer Res* 60(22):6288-92.
- Major MB, Camp ND, Berndt JD, Yi X, Goldenberg SJ, Hubbert C, Biechele TL, Gingras AC, Zheng N, Maccoss MJ and others. 2007. Wilms tumor suppressor WTX negatively regulates WNT/beta-catenin signaling. *Science* 316(5827):1043-6.

- Martinez-Estrada OM, Lettice LA, Essafi A, Guadix JA, Slight J, Velecela V, Hall E, Reichmann J, Devenney PS, Hohenstein P and others. 2010. Wt1 is required for cardiovascular progenitor cell formation through transcriptional control of Snail and E-cadherin. *Nat Genet* 42(1):89-93.
- Matsunaga E. 1981. Genetics of Wilms' tumor. *Hum Genet* 57(3):231-46.
- Maurer BJ, Metelitsa LS, Seeger RC, Cabot MC, Reynolds CP. 1999. Increase of ceramide and induction of mixed apoptosis/necrosis by N-(4-hydroxyphenyl)-retinamide in neuroblastoma cell lines. *J Natl Cancer Inst* 91(13):1138-46.
- Maw MA, Grundy PE, Millow LJ, Eccles MR, Dunn RS, Smith PJ, Feinberg AP, Law DJ, Paterson MC, Telzerow PE and others. 1992. A third Wilms' tumor locus on chromosome 16q. *Cancer Res* 52(11):3094-8.
- McDonald JM, Douglass EC, Fisher R, Geiser CF, Krill CE, Strong LC, Virshup D, Huff V. 1998. Linkage of familial Wilms' tumor predisposition to chromosome 19 and a two-locus model for the etiology of familial tumors. *Cancer Res* 58(7):1387-90.
- Metzger ML, Dome JS. 2005. Current therapy for Wilms' tumor. *Oncologist* 10(10):815-26.
- Moore AW, McInnes L, Kreidberg J, Hastie ND, Schedl A. 1999. YAC complementation shows a requirement for Wt1 in the development of epicardium, adrenal gland and throughout nephrogenesis. *Development* 126(9):1845-57.
- Niederreither K, Subbarayan V, Dolle P, Chambon P. 1999. Embryonic retinoic acid synthesis is essential for early mouse post-implantation development. *Nat Genet* 21(4):444-8.
- Ogawa O, Eccles MR, Szeto J, McNoe LA, Yun K, Maw MA, Smith PJ, Reeve AE. 1993. Relaxation of insulin-like growth factor II gene imprinting implicated in Wilms' tumour. *Nature* 362(6422):749-51.
- Owen C, Virappane P, Alikian M, Stasevich I, Summers K, Lillington D, Bonnet D, Burnett A, Mills K, Lister TA and others. 2008. WTX is rarely mutated in acute myeloid leukemia. *Haematologica* 93(6):947-8.
- Park JS, Valerius MT, McMahon AP. 2007. Wnt/beta-catenin signaling regulates nephron induction during mouse kidney development. *Development* 134(13):2533-9.
- Perotti D, Gamba B, Sardella M, Spreafico F, Terenziani M, Collini P, Pession A, Nantron M, Fossati-Bellani F, Radice P. 2008. Functional inactivation of the WTX gene is not a frequent event in Wilms' tumors. *Oncogene* 27(33):4625-32.
- Pfister S, Remke M, Benner A, Mendrzyk F, Toedt G, Felsberg J, Wittmann A, Devens F, Gerber NU, Joos S and others. 2009. Outcome prediction in pediatric medulloblastoma based on DNA copy-number aberrations of chromosomes 6q and 17q and the MYC and MYCN loci. *J Clin Oncol* 27(10):1627-36.
- Ping AJ, Reeve AE, Law DJ, Young MR, Boehnke M, Feinberg AP. 1989. Genetic linkage of Beckwith-Wiedemann syndrome to 11p15. *Am J Hum Genet* 44(5):720-3.
- Polakis P. 2000. Wnt signaling and cancer. *Genes Dev* 14(15):1837-51.

- Ponzoni M, Bocca P, Chiesa V, Decensi A, Pistoia V, Raffaghello L, Rozzo C, Montaldo PG. 1995. Differential effects of N-(4-hydroxyphenyl)retinamide and retinoic acid on neuroblastoma cells: apoptosis versus differentiation. *Cancer Res* 55(4):853-61.
- Radice P, Perotti D, De Benedetti V, Mondini P, Radice MT, Pilotti S, Luksch R, Fossati Bellani F, Pierotti MA. 1995. Allelotyping in Wilms tumors identifies a putative third tumor suppressor gene on chromosome 11. *Genomics* 27(3):497-501.
- Rahman N, Arbour L, Tonin P, Renshaw J, Pelletier J, Baruchel S, Pritchard-Jones K, Stratton MR, Narod SA. 1996. Evidence for a familial Wilms' tumour gene (FWT1) on chromosome 17q12-q21. *Nat Genet* 13(4):461-3.
- Rainier S, Johnson LA, Dobry CJ, Ping AJ, Grundy PE, Feinberg AP. 1993. Relaxation of imprinted genes in human cancer. *Nature* 362(6422):747-9.
- Reeve AE, Sih SA, Raizis AM, Feinberg AP. 1989. Loss of allelic heterozygosity at a second locus on chromosome 11 in sporadic Wilms' tumor cells. *Mol Cell Biol* 9(4):1799-803.
- Reynolds CP, Kane DJ, Einhorn PA, Matthay KK, Crouse VL, Wilbur JR, Shurin SB, Seeger RC. 1991. Response of neuroblastoma to retinoic acid in vitro and in vivo. *Prog Clin Biol Res* 366:203-11.
- Reynolds CP, Matthay KK, Villablanca JG, Maurer BJ. 2003. Retinoid therapy of high-risk neuroblastoma. *Cancer Lett* 197(1-2):185-92.
- Rivera MN, Kim WJ, Wells J, Driscoll DR, Brannigan BW, Han M, Kim JC, Feinberg AP, Gerald WL, Vargas SO and others. 2007. An X chromosome gene, WTX, is commonly inactivated in Wilms tumor. *Science* 315(5812):642-5.
- Rivera MN, Kim WJ, Wells J, Stone A, Burger A, Coffman EJ, Zhang J, Haber DA. 2009. The tumor suppressor WTX shuttles to the nucleus and modulates WT1 activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Ross SA, McCaffery PJ, Drager UC, De Luca LM. 2000. Retinoids in embryonal development. *Physiol Rev* 80(3):1021-54.
- Roth J, Blaha I, Bitter-Suermann D, Heitz PU. 1988. Blastemal cells of nephroblastomatosis complex share an onco-developmental antigen with embryonic kidney and Wilms' tumor. An immunohistochemical study on polysialic acid distribution. *Am J Pathol* 133(3):596-608.
- Royer-Pokora B, Busch M, Beier M, Duhme C, de Torres C, Mora J, Brandt A, Royer HD. 2010. Wilms tumor cells with WT1 mutations have characteristic features of mesenchymal stem cells and express molecular markers of paraxial mesoderm. *Hum Mol Genet* 19(9):1651-68.
- Ruteshouser E. 2009. FAM123B (family with sequence similarity 123B). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol*.
- Ruteshouser EC, Hendrickson BW, Colella S, Krahe R, Pinto L, 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.

- Ruteshouser EC, Robinson SM, Huff V. 2008. Wilms tumor genetics: mutations in WT1, WTX, and CTNNB1 account for only about one-third of tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 47(6):461-70.
- Schaub R, Burger A, Bausch D, Niggli FK, Schafer BW, Betts DR. 2007. Array comparative genomic hybridization reveals unbalanced gain of the MYCN region in Wilms tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 172(1):61-5.
- Schmidt-Ott KM, Barasch J. 2008. WNT/beta-catenin signaling in nephron progenitors and their epithelial progeny. *Kidney Int* 74(8):1004-8.
- Shyu RY, Jiang SY, Chou JM, Shih YL, Lee MS, Yu JC, Chao PC, Hsu YJ, Jao SW. 2003. RARRES3 expression positively correlated to tumour differentiation in tissues of colorectal adenocarcinoma. *Br J Cancer* 89(1):146-51.
- Smith MA, Morton CL, Phelps D, Girtman K, Neale G, Houghton PJ. 2008. SK-NEP-1 and Rh1 are Ewing family tumor lines. *Pediatr Blood Cancer* 50(3):703-6.
- Sonn G, Shortliffe LM. 2008. Management of Wilms tumor: current standard of care. *Nat Clin Pract Urol* 5(10):551-60.
- Sriuranpong V, Mutirangura A, Gillespie JW, Patel V, Amornphimoltham P, Molinolo AA, Kerekhanjanarong V, Supanakorn S, Supiyaphun P, Rangdaeng S and others. 2004. Global gene expression profile of nasopharyngeal carcinoma by laser capture microdissection and complementary DNA microarrays. *Clin Cancer Res* 10(15):4944-58.
- Sugimura J, Yang XJ, Tretiakova MS, Takahashi M, Kort EJ, Fulton B, Fujioka T, Vogelzang NJ, Teh BT. 2004. Gene expression profiling of mesoblastic nephroma and Wilms tumors--comparison and clinical implications. *Urology* 64(2):362-8; discussion 368.
- Sun SY, Wan H, Yue P, Hong WK, Lotan R. 2000. Evidence that retinoic acid receptor beta induction by retinoids is important for tumor cell growth inhibition. *J Biol Chem* 275(22):17149-53.
- Sun SY, Yue P, Lotan R. 1999. Induction of apoptosis by N-(4-hydroxyphenyl)retinamide and its association with reactive oxygen species, nuclear retinoic acid receptors, and apoptosis-related genes in human prostate carcinoma cells. *Mol Pharmacol* 55(3):403-10.
- Takahashi M, Yang XJ, Lavery TT, Furge KA, Williams BO, Tretiakova M, Montag A, Vogelzang NJ, Re GG, Garvin AJ and others. 2002. Gene expression profiling of favorable histology Wilms tumors and its correlation with clinical features. *Cancer Res* 62(22):6598-605.
- Talts JF, Aufderheide E, Sorokin L, Ocklind G, Mattsson R, Ekblom P. 1993. Induction of mouse tenascin expression by a human sarcomatoid Wilms' tumor cell line growing in nude mice. *Int J Cancer* 54(5):868-74.
- Taylor AJ, Winter DL, Pritchard-Jones K, Stiller CA, Frobisher C, Lancashire ER, Reulen RC, Hawkins MM. 2008. Second primary neoplasms in survivors of Wilms' tumour--a

- population-based cohort study from the British Childhood Cancer Survivor Study. *Int J Cancer* 122(9):2085-93.
- Tonini T, D'Andrilli G, Fucito A, Gaspa L, Bagella L. 2008. Importance of Ezh2 polycomb protein in tumorigenesis process interfering with the pathway of growth suppressive key elements. *J Cell Physiol* 214(2):295-300.
- Villablanca JG, Krailo MD, Ames MM, Reid JM, Reaman GH, Reynolds CP. 2006. Phase I trial of oral fenretinide in children with high-risk solid tumors: a report from the Children's Oncology Group (CCG 09709). *J Clin Oncol* 24(21):3423-30.
- Vujanic GM, Sandstedt B, Harms D, Kelsey A, Leuschner I, de Kraker J. 2002. Revised International Society of Paediatric Oncology (SIOP) working classification of renal tumors of childhood. *Med Pediatr Oncol* 38(2):79-82.
- Williams RD, Al-Saadi R, Chagtai T, Popov S, Messahel B, Sebire N, Gessler M, Wegert J, Graf N, Leuschner I and others. 2010. Subtype-specific FBXW7 mutation and MYCN copy number gain in Wilms' tumor. *Clin Cancer Res* 16(7):2036-45.
- Williamson D, Lu YJ, Gordon T, Sciot R, Kelsey A, Fisher C, Poremba C, Anderson J, Pritchard-Jones K, Shipley J. 2005. Relationship between MYCN copy number and expression in rhabdomyosarcomas and correlation with adverse prognosis in the alveolar subtype. *J Clin Oncol* 23(4):880-8.
- Wilmore HP, White GF, Howell RT, Brown KW. 1994. Germline and somatic abnormalities of chromosome 7 in Wilms' tumor. *Cancer Genet Cytogenet* 77(2):93-8.
- Witt O, Hammerling S, Stockklausner C, Schenk JP, Gunther P, Behnisch W, Hamad B, Al Mulla NA, Kulozik A. 2009. 13-cis retinoic acid treatment of a patient with chemotherapy refractory nephroblastomatosis. *J Pediatr Hematol Oncol* 31(4):296-9.
- Wittmann S, Wunder C, Zirn B, Furtwangler R, Wegert J, Graf N, Gessler M. 2008. New prognostic markers revealed by evaluation of genes correlated with clinical parameters in Wilms tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 47(5):386-95.
- Wright KD, Green DM, Daw NC. 2009. Late effects of treatment for wilms tumor. *Pediatr Hematol Oncol* 26(6):407-13.
- Yeger H, Baumal R, Pawlin G, Phillips MJ. 1985. Relationship of histology of Wilms' tumor to growth characteristics of nude mouse heterotransplants. *Cancer Res* 45(5):2340-9.
- Yoo NJ, Kim S, Lee SH. 2009. Mutational analysis of WTX gene in Wnt/ beta-catenin pathway in gastric, colorectal, and hepatocellular carcinomas. *Dig Dis Sci* 54(5):1011-4.
- 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(8):1954-62.
- Zirn B, Samans B, Spangenberg C, Graf N, Eilers M, Gessler M. 2005a. 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, Wittmann S, Graf N, Gessler M. 2005b. Chibby, a novel antagonist of the Wnt pathway, is not involved in Wilms tumor development. *Cancer Lett* 220(1):115-20.

## 7. Abkürzungen

13cisRA	13cis Retinsäure
4HPR	Fenretinid (4-Hydroxy(phenyl)retinamid)
9cisRA	9cis Retinsäure
Abb.	Abbildung
APL	Akute Promyelozytische Leukämie
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATRA	all-trans Retinsäure
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FCS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GPOH	Gesellschaft für Pädiatrische Hämatologie und Onkologie
HDAC	Histon-Deacetylasen
het	heterozygot
IHC	Immunhistochemie
kb	Kilobasen
LCM	Laser captured microdissection
LOH	Loss of heterozygosity
LOI	Loss of imprinting
Mb	Megabase
MET	mesenchymal to epithelial transition
MN	Mesoblastisches Nephrom
MSC	mesenchymale Stammzellen
NLS	nuclear localization sequence (Kern-Lokalisations-Sequenz)
nt	Nukleotid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese

PFA	Paraformaldehyd
RA	Retinsäure
RAR	Retinsäure-Rezeptor
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rotation per minute (Umdrehung pro Minute)
RT	Reverse Transkription
RXR	Retinoid X-Rezeptor
SAHA	suberoylanilide hydroxamic acid (N <sup>1</sup> -hydroxy-N <sup>8</sup> -phenyl-octanediamide)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SIOP	Société Internationale d'Oncologie Pédiatrique
SNP	single nucleotide polymorphism
Tab.	Tabelle
U	unit
UTR	untranslatierte Region
Vol	Volumenanteil
WT	Wilms Tumor
wt	Wildtyp

---

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die einen Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit leisteten.

Zuallererst danke ich meinem Doktorvater Prof. Manfred Gessler, der mir diese Arbeit am „Wilms-Projekt“ ermöglichte und sie mit viel Interesse begleitete. Er hatte stets ein offenes Ohr und gute Ratschläge für anfallende Probleme. Durch seine hilfreiche Unterstützung während der gesamten Zeit habe ich eine Menge gelernt.

Bei Prof. Manfred Scharl bedanke ich mich für die unkomplizierte Übernahme des Zweitgutachtens.

Den Mitarbeitern der PCI und der Entwicklungsbiochemie danke ich für die nette Atmosphäre und Hilfe bei allen anfallenden Fragestellungen bzw. der Einführung in neue Methoden.

Allen ehemaligen und derzeitigen Kollegen aus der AG Gessler - Anja, Barbara, Christian, Conny, Daniela, Eva, Holger, Josi, Julia, Katha, Melanie, Patrick, Rebecca, Sabrina, Steffi, Tine und Traudel - danke ich für das freundliche Arbeitsklima und die Möglichkeit, sowohl aktuelle Arbeitsprobleme als auch alltägliche Kleinigkeiten bequatschen zu können. Einen besonderen Anteil am Gelingen dieser Arbeiten hatten: Stefanie Wittmann bei der gemeinsamen Betreuung der Wilms-Bank; Bettina Lakeit, die durch unermüdliches Telefonieren die Kooperation mit den Kliniken vereinfachte; Sabrina Bausenwein bei der Durchführung von Realtime-Experimenten; Barbara Ziegler, die sich tapfer durch viele Tumorproben kämpfte.

Mein Dank gilt auch Dr. Eva Geißinger und Sabine Roth vom Institut für Pathologie für die immunhistochemische Untersuchung all unserer vielen Proben und die Mühen mit den merkwürdigen Fällen. Dr. Jörg Kalla danke ich für die Betreuung im Rahmen des GK639.

Dr. Susanne Kneitz von der Microarray core unit (IZKF Würzburg) danke ich für die Durchführung der Microarray-Experimente.

---

Für die Bereitstellung der klinischen Daten danke ich Nasenien Nourkami und Prof. Norbert Graf vom Universitätsklinikum Homburg/Saar. Mein Dank gilt auch den Ärzten, Schwestern, Studienassistenten, Patienten und Eltern, ohne deren Kooperation im Rahmen der SIOP/GPOH-Studie kein einziges Experiment meiner Arbeit möglich gewesen wäre.

Meiner Familie danke ich für all die Unterstützung, die sie mir während der gesamten Zeit in jeglicher Hinsicht bot, und das Interesse an meiner Arbeit. Schön, dass ich mich immer auf dieses „Zuhause“ verlassen kann.

Dankbar bin ich Martin für seine beständige Hilfe und Geduld („Du, kannst Du mal kurz...?!“); für den Rückhalt und die Aufmunterung an schlechten Tagen; für die Gewissheit, täglich etwas zum Lachen zu finden und die Fähigkeit, sich über jede Menge Kleinigkeiten freuen zu können! Danke für jeden Tag! :-\*

**DANKE!**

---

## Wissenschaftliche Beiträge

### Publikationen

**Wegert J**, Wittmann S, Leuschner I, Geissinger E, Graf N, Gessler M. 2009. WTX inactivation is a frequent, but late event in Wilms tumors without apparent clinical impact. *Genes Chromosomes Cancer* 48(12):1102-11.

Wittmann S, Wunder C, Zirn B, Furtwangler R, **Wegert J**, Graf N, Gessler M. 2008. New prognostic markers revealed by evaluation of genes correlated with clinical parameters in Wilms tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 47(5):386-95.

Drake KM, Ruteshouser EC, Natrajan R, Harbor P, **Wegert J**, Gessler M, Pritchard-Jones K, Grundy P, Dome J, Huff V, Jones C, Aldred MA. 2009. Loss of heterozygosity at 2q37 in sporadic Wilms' tumor: putative role for miR-562. *Clin Cancer Res* 15(19):5985-92.

Williams RD, Al-Saadi R, Chagtai T, Popov S, Messahel B, Sebire N, Gessler M, **Wegert J**, Graf N, Leuschner I, Hubank M, Jones C, Vujanic G, Pritchard-Jones K. 2010. Subtype-specific FBXW7 mutation and MYCN copy number gain in Wilms' tumor. *Clin Cancer Res* 16(7):2036-45.

### Kongressbeiträge

**Wegert J**, Wittmann S, Graf N, Leuschner I, Gessler M. 2009. „WTX mutation as late event in Wilms tumor“, 15<sup>th</sup> International AEK Cancer Congress, Berlin (Poster)

**Wegert J**, Geissinger E, Nourkami N, Gessler M. 2010. “Retinoic acid signalling in Wilms tumors and its effect on primary cultures“, 7<sup>th</sup> International Meeting on the Biology of Childhood Renal Tumors, Banff, Kanada (Vortrag)

---

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation „WTX-Mutationscreen und funktionelle Analyse des Retinsäure-Signalwegs in Wilms Tumoren“ selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel durchgeführt habe.

Ich erkläre außerdem, dass diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe früher außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den 25. August 2010

Jenny Wegert