Aus dem Institut für Humangenetik und Anthropologie, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf (Institutsdirektorin: Prof. Dr. rer. nat. Royer-Pokora)

Molekularbiologische Untersuchungen zur Chemotherapieresistenz und entwicklungsbiologischen Klassifizierung blastemreicher und stromareicher

Wilms Tumoren

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

> vorgelegt von Sandra Kirstin Sonner aus Essen 2001

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. W. Kunz Korreferentin: Prof. Dr. B. Royer-Pokora

Tag der mündlichen Prüfung: 18.12.2001

Für Stephan Sonner

Es gibt eine Theorie, die besagt, wenn jemals irgendwer genau herausfindet, wozu das Universum da ist und warum es da ist, dann verschwindet es auf der Stelle und wird durch noch etwas Bizarreres und Unbegreiflicheres ersetzt.

- Es gibt eine andere Theorie, nach der das schon passiert ist.

(Douglas Adams)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	5
1 Einleitung	7
1.1 Nierenentwicklung	9
1.2 Wilms Tumor	11
1.2.1 Epidemiologie	12
1.2.2 Klinik und Einteilung	12
1.2.3 Therapie	13
1.2.4 Histopathologie	14
1.2.5 Mit Wilms Tumoren assoziierte Syndrome	15
1.2.6 Entstehung und Genetik des Wilms Tumors	16
1.3 Ziel der Arbeit	20
2. Material	21
3. Patienten	29
4 Methoden	32
4.1 Mikrodissektion	32
4.2 DNA Isolationsmethoden	33
4.3 DNA-Analysen	34
4.3.1 DNA-Konzentrationsbestimmung durch photometrische Messung:	34
4.3.2 Konzentrationsbestimmung durch Auftrag auf ein Agarosegel	35
4.3.3 Gelelektrophoresen	35
4.3.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	35
4.3.5 PCR-Bedingungen für das WT1-Gen:	36
4.3.6 Sonstige PCR Bedingungen	36
4.3.7 Nichtradioaktive SSCP	37
4.3.8 Automatische Seguenzierung mit LiCOR	38
4.3.9 LOH-Analysen von CA-Repeat Markern	40
4.3.10 Klonierung von DNA-Fragmenten	41
4.4 Komparative genomische Hybridisierung (CGH)	42
4.5 Zellkultur	43
4.6 RNA-Isolation	44
4.6.1 RNA-Isolation aus Tumorgewebe	44
4.6.2 RNA-Isolation aus Zellen mittels Atlas Pure RNA Isolation Kit (Clontech) 45
4.6.3 RNA-Isolation nach Mikrodissektion	45
4.7 RNA-Analysen und Expressionsprofilerstellung	47
4.7.1 SMART cDNA-Synthese für PCR-Select (Clontech)	48
4.7.2 cDNA-Subtraktion (Clontech)	51
4.7.3 PCR-Select Differential Screening (Clontech)	55
4.7.4 Atlas Human Cancer Array (Clontech)	58
4.8 Immunhistochemie	61
5. Ergebnisse	64
5.1 Mutationsscreening	65
5.1.1 WT1-Mutationsanalyse von Exon 1-10 mit der PCR-SSCP Methode	65
5.1.2 Mutationsscreening der Promotorbereiche	66
5.2 LOH-Analysen	68
5.3 CGH-Analysen an Wilms Tumoren	71
5.3.1 Herstellung von Metaphasenpräparaten aus Lymphozytenzellkulturen	72
5.3.2 Markierung der Tumor und Kontroll DNA	73

5.3.3 Fällung und Denaturierung der DNA-Probe	74
5.3.4 Vorbehandlung der Chromosomenpräparate	75
5.3.5 Flow-Chart der optimalen Bedingungen für eine CGH-Analyse	76
5.3.6 CGH-Auswertung	77
5.4 Immunhistochemische Analysen	78
5.4.1 Entwicklungsbiologische Einordnung von Stroma und Blastem	79
5.4.2 Weitere entwicklungsbiologische Klassifizierung von blastemre	eichen
Tumoren mit Cytokeratin	85
5.4.3 Immunhistochemische Analysen von chemotherapieresistenz-	und
apoptoseassoziierten Proteinen in blastemreichen Tumoren	86
5.5 RNA-Analysen	89
5.5.1 cDNA-Subtraktion von Blastemzellen	89
5.5.2 Atlas Array Analysen	95
6. Diskussion	109
7. Zusammenfassung	130
8. Literaturverzeichnis	132
9.Lebenslauf	136
10. Danksagung	137

1 Einleitung

Nach ihrem Wachstumsverhalten lassen sich Tumoren gemäß ihrer Dignität in zwei Unterschied Gruppen einordnen. Der zwischen malignen und benignen Tumorerkrankungen besteht zum Einen in ihren Wachstumseigenschaften (bei benignen Tumoren langsam und innerhalb der Organgrenzen und bei malignen Tumoren schneller und infiltrativ mit der Neigung zur Metastasenbildung) und zum Zweiten in ihren Differenzierungseigenschaften. Während benignes Tumorgewebe dem Gewebe, aus dem es hervorgegangen ist, sehr ähnlich ist, kann es bei malignen Tumoren zu unterschiedlich starken Dedifferenzierungen kommen, die dazu führen können, daß die Proteinexpression der Krebszellen verändert wird.

Die Entstehung von malignen Tumoren erfolgt durch eine Veränderung der genetischen Information der Zelle. Diese Erkenntnis ist darauf zurückzuführen, daß Tumoren in der Regel klonal wachsen. Die Malignität, die von der Mutterzelle auf die Tochterzelle vererbt wird, muß also genetisch fixiert sein. Auch der regelmäßige Nachweis bestimmter Chromosomenveränderungen bei unterschiedlichen Krebserkrankungen spricht dafür, daß Veränderungen auf DNA-Ebene für das Entstehen und das Wachstum von Tumoren verantwortlich sind. Dabei entstehen maligne Tumoren meist nicht aus einer einzigen Mutation heraus, sondern bilden sich in mehreren Zyklen von Mutationen in Zellen, die alle von derselben Vorläuferzelle abstammen. Dabei weichen die ersten Stadien nur leicht von der Norm ab und erst nach und nach kommt es zu immer stärkeren Entartungen. Die Krebsentstehung verläuft dabei über einen langen Zeitraum.

Dabei können die Mutationen so kooperieren, daß sowohl Gene aktiviert werden, die die Proliferation steigern, als auch solche Gene inaktiviert werden, die die Proliferation hemmen. Die Gruppe der Gene, die durch eine Mutation oder Fehlregulation die Proliferation steigern und so aktiv an der malignen Transformation der Zelle Anteil haben, nennt man **Onkogene**, sie gehen meist aus sogenannten **Proto-Onkogenen** hervor. Diese haben im physiologischen Zustand der Zelle häufig eine Funktion als Wachstumsfaktor oder Teil eines Signaltransduktionsweges, der die Zellteilung kontrolliert. Dabei muß ein Onkogen nicht zwangsweise mutiert sein, es kann auch einfach durch eine Translokation in den Einflußbereich eines

ungeeigneten Regulationsmechanismus geraten und zum Beispiel zu stark exprimiert werden. Im Regelfall kann ein einzelnes Onkogen nur dann seine dominante Wirkung entfalten, wenn das Regulationssystem schon schwer gestört ist.

Die andere Gruppe der Tumorgene, die **Tumorsuppressorgene**, verhindert normalerweise eine zu starke Zellvermehrung. In einer normalen diploiden Zelle ist eine Inaktivierung beider Allele des entsprechenden Gens nötig, um eine maligne Veränderung der Zelle und eine gesteigerte Proliferation hervorzurufen. Die physiologische Funktion der Tumorsuppressorgene muß jedoch nicht primär in der Unterdrückung des Tumorwachstums liegen.

In vielen Fällen beruht die Entstehung eines Tumors auf dem Zusammenwirken multipler Mutationen. Da die Basenzusammensetzung der DNA im physiologischen Zustand außerordentlich stabil ist, geht man davon aus, daß der Mechanismus der Entstehung multipler somatischer Mutationen auf einem primären Defekt beruhen kann, der eine genomische Instabilität hervorruft. Ein Beispiel für einen solchen Effekt stellt der "**Mutator-Phänotyp**" dar. Man kann solche Mutator-Phänotypen beispielsweise bei der Entstehung des hereditären Non-Polyposis-Kolon-Karzinoms (HNPCC) beobachten. Bisher ist lediglich der Wirkmechanismus der Mutatoreffekte geklärt, jedoch konnten die im Einzelnen betroffenen Gene noch nicht ermittelt werden. Der Mechanismus wird auf eine Mutation in den komplexen DNA-Reparatursystemen der Zellen zurückgeführt.

Das Zusammenwirken multipler Mutationszyklen bei der Krebsentstehung ist sicher eine gute Erklärung für das gehäufte Auftreten maligner Erkrankungen mit steigendem Alter. Für die Entstehung von embryonalen Tumoren und Tumoren bei Kindern muß jedoch davon ausgegangen werden, daß nur wenige Mutationen vonnöten sind um den Krebs auszulösen, hier bietet sich also eher das Modell der Tumorsuppressorgene als Erklärung an. Ein wichtiges Modell für die Karzinogenese bei embryonalen Tumoren ist der Wilms Tumor, der vor allem wegen seiner histologischen und genetischen Heterogenität und seines Auftretens sowohl in sporadischer als auch in familiärer Form ein interessantes Untersuchungsobjekt für die Tumoren und Wirkmechanismen Entstehung embryonaler die von Tumorsuppressorgenen darstellt.

8

1.1 Nierenentwicklung

Um Wilms Tumoren und ihre Entstehung zu verstehen, muß man sich zunächst mit der normalen Nierenentwicklung beschäftigen.



Abb.1.1: Querschnitt durch die Niere (aus Lippert Anatomie 1995)

Teil des Nierengewebes ist Ein abgetragen, um den Blick auf das Nierenbecken freizugeben. Der Unterschied zwischen der feingekörnten Nierenrinde und dem längsgestreiften Mark ist mit bloßem Auge zu erkennen. Das Nierenmark ist in einzelne Lappen (Nierenpyramiden) gegliedert. An deren Spitze wird der Harn jeweils in den zugehörenden Kelch des Nierenbeckens abgegeben. 9.: Nierenschlagader; 10.: Nierenvene; 13.: Harnleiter; 14.: Nierenbecken; 15.:

Nierenrinde; 16.: Nierenmark (gebildet aus Nierenpyramiden); 18.: Nierensäule; 19.: Nierenpapille; 20.: Nierenkelch; 21.: Bindegewebige Nierenkapsel; 22.: Bogenschlagader; 23.: Teil der Fettkapsel

Hierbei entstehen die Harn und Geschlechtsorgane in engem morphologischen Zusammenhang, entwickeln sich jedoch zu Systemen mit unterschiedlichen Funktionen.

Das Urogenitalsystem entsteht aus dem intermediären Mesoderm. Seine einzelnen Abschnitte, die Nephrotome, bilden den nephrogenen Strang, ein perlschnurartig angeordnetes Blastem, aus dem sich zeitlich versetzt und räumlich getrennt drei Nierenanlagen entwickeln, die Vorniere (Pronephros), die Urniere (Mesonephros) und die Nachniere (Metanephros).

Die Bildung der Vorniere im Bereich der zervikalen Somiten geht nicht über ein rudimentäres Stadium hinaus, nur der Wolffsche Gang kommt voll zur Ausbildung. Er setzt sich als Ausführgang der Urniere fort, die sich im menschlichen Embryo zu beträchtlicher Größe entwickelt. Aus ihm sproßt zu Beginn der sechsten Woche der embryonalen Entwicklung die Ureterknospe aus, die Verbindung mit dem kaudal verbliebenen Teil des nephrogenen Stranges, dem metanephrogenen Blastem aufnimmt. Die gesamte Anlage des Metanephros wächst dorsal aus der Urniere empor. Die Ureterknospe und das metanephrogene Blastem bilden unter gegenseitiger Beeinflussung die Nierenbestandteile. Aus der Knospe entstehen die ableitenden Harnwege, während sich das Blastem zu den Nephronen sowie zum Nierenstroma entwickelt. Die Ureterknospe verzweigt sich und bildet ein Sammelrohrsystem, dessen Zweige jeweils mit einer terminalen Ampulle enden. Jeder Ampulle sitzt metanephrogenes Gewebe auf, das sich unter dem induzierenden Einfluß der Ampulle in ein Nephron entwickelt, das aus Bowmannscher Kapsel, Glomeruli mit Podozyten, malpighischen Körperchen und Schleife besteht. Mittelstück, der Henleschen Da am Ende der dem Embryonalentwicklung die terminalen Ampullen verschwinden, können keine weiteren Nephrone nachgebildet werden.

Die Aufgabe der Nephrone besteht darin, durch das Glomerulum Plasmaflüssigkeit abzufiltrieren und durch das Tubulisystem Urin aus dem Primärharn zu gewinnen. Das Skelettelement des Glomerulus, das ihm Stabilität verleiht und gleichermaßen Bedeutung für die Filtration hat, ist die glomeruläre Basalmembran. An ihrer Bildung sind sowohl die gefensterten Endothelzellen als auch die Podozyten beteiligt. Somit besteht die Filtrationsbarriere für den Primärharn aus den gefensterten Endothelzellen mit großen offenen Poren und dem dichten fibrillären Netzwerk der Basalmembran, die die engen Filtrationsschlitze zwischen den Füßchen der Podozyten basal abschließt. Hinzu kommt auf beiden Seiten, eine stark negativ geladene Glykokalix, die zusätzlich die Filtereigenschaften verstärkt.



Abb.1.2 (aus Schmidt Physiologie des Menschen 2000): A. Übersicht über die Struktur eines Glomerulus mit juxtaglomerulärem Apparat. Am Gefäßpol mündet die afferente Arteriole (AA), die von sympathischen Nervenfasern (N) versorgt ist und deren glatte Muskulatur unmittelbar vor der Einmündung deutlich Granula (G) aufweist. EN: Endothelzellen; BM: Basalmembran; EP: Epithelzellen mit Fußfortsätzen = Podozyten; M: Mesangiumzellen; MD: Macula-Densa-Segment des distalen Tubulus; EA: Efferente Arteriole.

1.2 Wilms Tumor

Obwohl vermutlich zuerst im Jahr 1814 von Thomas Rance beschrieben, ist der Wilms Tumor (WT) nach dem deutschen Arzt Dr. Carl Max Wilhelm Wilms benannt. Es handelt sich um einen hochmalignen embryonalen Mischtumor der Nieren (Wilms 1899). Während zu Beginn und noch bis in die 50er Jahre des letzten Jahrhunderts die meisten Kinder an einer Erkrankung mit dem Wilms Tumor starben, hat sich die Überlebensrate heute auf über 80% gesteigert. In den ehemaligen Ostblockländern ist die Überlebensrate signifikant niedriger als in den westeuropäischen Ländern und der europaweite Durchschnitt liegt leicht unter dem Australiens und der USA (Plesko, Kramarova et al. 2001). Einer der Gründe für die stetig steigende Überlebensrate und die verbesserten Heilungserfolge liegt in der Tatsache, daß der Wilms Tumor als Modell für die Entwicklung von malignen Tumoren und für die Untersuchung des

B. Schematische Darstellung der Anordnung von intraglomerulären Mesangiumzellen und Podozyten; oben: Kapillarschlinge mit einer zentralen Mesangiumzelle, die mit Fußfortsätzen an der inneren Kurvatur der kapillären Basalmembran verankert ist und die Kurvenstruktur stabilisiert. Unten: Querschnitt mit der gleichen Anordnung der zentral verankerten Mesangiumzelle und den peripher angelagerten Fußfortsätzen der Podozyten. Auch die Podozytenanordnung stabilisiert die Kapillarschlinge und wirkt einer druckpassiven Dehnung entgegen.

Einflusses von Tumorsuppressorgenen auf die normale Nierenentwicklung, ein Objekt sowohl intensiver klinischer Forschung als auch intensiver Grundlagenforschung ist.

1.2.1 Epidemiologie

Der Wilms Tumor oder das Nephroblastom ist mit einer jährlichen Inzidenz von 7 bis 10 Fällen pro einer Millionen Kinder unter 15 Jahren der am weitesten verbreitete maligne Nierentumor der Kindheit. In den meisten Fällen kommt es zur Ausbildung unilateraler Tumoren, aber etwa 5% bis 10% der Patienten zeigen Tumorbildung in beiden Nieren. Nur in 1% bis 2,4% kann jedoch eine familiäre Prädisposition nachgewiesen werden (Coppes and Pritchard-Jones 2000). Epidemiologische Daten deuten daraufhin, daß für einige bilaterale und multizentrische Fälle somatische Mosaike eher als Entstehungsmechanismen in Frage kommen, als Keimbahnmutationen. Insgesamt tritt der Wilms Tumor in westlichen Industrieländern mit einer etwa doppelt so großen Häufigkeit auf, wie in Asien (Breslow, Olshan et al. 1993). In den USA und in Afrika ist er in der schwarzen Bevölkerung stärker vertreten als in der weißen (Breslow, Olshan et al. 1993). Das Durchschnittsalter für die Diagnose bilateraler WT liegt etwa bei 2 Jahren, während das für unilaterale WT etwas höher liegt, nämlich bei 3-4 Jahren (Breslow, Beckwith et al. 1988; Pastore, Carli et al. 1988). Selten kommen Fälle von Wilms Tumoren bei älteren Kindern oder Erwachsenen vor (Arrigo, Beckwith et al. 1990).

1.2.2 Klinik und Einteilung

Die Diagnose eines WT erfolgt meist durch die vom Tumor selbst ausgelöste Bauchschwellung, da der Tumor ansonsten zunächst eine asymptotische abdominale Masse darstellt, die sich durch ihr invasives Wachstum bis in die Nierenvene, die Vena Cava inferior oder sogar bis in den rechten Vorhof fortsetzen kann.

In 5% bis 30% der Fälle kann es zu Symptomen wie Unterleibsschmerzen, Blutungen, Fieber, Anorexie, Erbrechen und Unwohlsein kommen. Metastasen bilden sich vor allem in der Lunge, der Leber und bei 10% bis 15% der Patienten in den Lymphknoten. Zur Diagnose können Röntgenuntersuchung, Computertomographie und Ultraschalluntersuchungen als bildgebende Verfahren angewandt werden. Die Erkenntnisse, die über den Wilms Tumor in den letzten Jahren gewonnen wurden, sind zum größten Teil auf zwei systematisch durchgeführte Studien zurückzuführen, die sich mit unterschiedlichen Therapieansätzen beschäftigen. Die Stadieneinteilung der National Wilms Tumor Study (NWTS) erfolgt dabei vor der Chemotherapie, während die Society of pediatric oncology (SIOP) die Stadieneinteilung der WT nach der Chemotherapie erstellt. Gemäß dieser Studien werden die Wilms Tumoren international in 5 Stadien eingeteilt. Eine Übersicht über die Stadien der Wilmstumoreinteilung ist in Tabelle 1.1 dargestellt.

Stadium	Charakteristika
I	Tumor liegt innerhalb der Tumor bzw. Nierenkapsel
II SIOP	Tumor mit Infiltration des extrarenalen Raums mit vollständiger Resektion und/oder Befall der regionalen Lymphknoten
NWTS	Tumor mit Infiltration des extrarenalen Raums mit vollständiger Resektion oder Biopsie bzw. lokal auf die ipsilaterale Flanke begrenzte Tumoraussaat bei Tumorruptur (minor spillage)
III SIOP	Tumor unvollständig reseziert oder ruptiert oder intraoperativ biopsiert und/oder Befall abdominaler Lymphknoten
NWTS	Tumor unvollständig reseziert oder ruptiert mit großflächiger Tumoraussaat (major spillage) und/oder Befall abdominaler Lymphknoten oder Tumorpenetration durch das Peritoneum
IV	Hämatogene Fernmetastasen z.B. in der Lunge und/oder Leber und/oder sehr selten in Knochen und Zentralnervensystem
v	Bilateraler Wilms Tumor

Tabelle 1.1 (aus Royer-Pokora und Schumacher eds. Ganten/Ruckpaul Hereditäre Tumorerkrankungen 2001): Stadieneinteilung beim Wilms Tumor nach SIOP und NWTS

1.2.3 Therapie

Die beiden weltweiten Studien NWTS und SIOP führten seit ihrem Beginn zu einer enormen Verbesserung der Behandlungserfolge und damit der Überlebensmöglichkeiten der Patienten (D'Angio, Breslow et al. 1989; Grundy, Breslow et al. 1989; National-Wilms-Tumor-Study-Comittee 1991). Die Grundlagen der Wilms Tumor Therapie beinhaltet in jedem Fall Chemotherapie, eine operative Entfernung und nötigenfalls Bestrahlung des Tumors. Es lassen sich jedoch zwei deutlich voneinander zu unterscheidende Therapiekonzepte erkennen. Während sich das Therapiekonzept der nordamerikanischen NWTS-Studie auf eine sofortige Nephrektomie stützt und entsprechend des Tumorstadiums und der Histopathologie eine postoperative Chemotherapie vorschlägt, geht die SIOP-Studie, in die ca. 90% der Patienten in Deutschland eingebracht werden, den umgekehrten Weg. Zunächst wird eine Chemotherapie durchgeführt und anschließend erfolgt die Nephrektomie. Je nach Stadium und Histopathologie erfolgt nötigenfalls eine weitere postoperative Chemo- oder Strahlentherapie (Ludwig 1992). Näheres zu den Therapiekonzepten wird unter Punkt 3. Patienten beschrieben.

1.2.4 Histopathologie

Histologisch gesehen entsteht der Wilms Tumor durch eine Entwicklungsstörung in Form einer aberranten Differenzierung embryonaler metanephritischer Blastemzellen. Der Differenzierungsprozeß des embryonalen Gewebes wird dadurch in einem frühen Stadium gestört, dies führt zu unkontrollierter Proliferation der Zellen (Mierau, Beckwith et al. 1987).

Das makroskopische Bild des Wilms Tumors stellt sich als expansiv wachsende meist eingekapselte Masse dar. Die meisten Tumoren zeigen die typische triphasische Histologie, bestehend aus dem primitiven Blastem, dem differenzierten Epithel und dem Stroma (mesenchymaler Anteil) in unterschiedlichen Anteilen. Die Gewichtung der Einzelkomponenten weicht dabei soweit voneinander ab, daß es auch zum Erscheinungsbild eines monophasischen oder diphasischen WT kommen kann. Die genaue Aufteilung der Tumorhistologien ist unter Punkt 3. Patienten dargestellt.

Die Tumoren sind häufig mit nephrogenen Resten assoziiert; das sind nicht ausdifferenzierte Nierenveränderungen, die vermutlich ein Vorläuferstadium zum Wilms Tumor darstellen. Entsprechend ihrer Position in der Niere kann man sie in intralobäre und perilobäre nephrogene Reste einteilen (Beckwith, Zuppan et al. 1996). Die früher in der Entwicklung entstehenden intralobären Wilms Tumoren, haben eine heterogene Histologie und sind eher stromareich. Die blastem/ epithelreichen Wilms Tumoren entstehen eher aus den perilobären Tumoren, die sich später entwickeln und aus homogenen Zelltypen bestehen. Die Erstgenannten sind häufig mit dem WAGR-Syndrom (<u>W</u>ilms Tumor, <u>A</u>niridie, <u>G</u>enitale Fehlbildungen, und

mentale <u>R</u>etardierung) assoziiert, während die des zweiten Typs eher mit dem Beckwith-Wiedemann-Syndrom in Verbindung gebracht werden.

1.2.5 Mit Wilms Tumoren assoziierte Syndrome

Unterschiedliche, mit kongenitalen Anomalien einhergehende Syndrome sind mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit, an einem Wilms Tumor zu erkranken, verbunden. Patienten, die diese Syndrome aufweisen, sollten sich einer regelmäßigen Überwachung (beispielsweise durch Ultraschalluntersuchung des Abdomens) einer Entstehung von Wilms Tumoren unterziehen.

Syndrom	Genetik	Häufigkeit bei WT Patienten	WT-Risiko	Diagnostik	Tumorscreening
Urogenital Fehlbildung	WT1- assoziiert	4-8%	30-50%	<i>WT1</i> Genanalyse	Ultraschall der Niere
Aniridie	<i>WT1</i> - assoziiert	1%	50% (bei Del. des <i>WT1-</i> <i>Gen</i> s)	Zytogenetik, FISH, PAX6 Genanalyse	
WAGR	<i>WT1</i> - assoziiert	1-2%	50%	Zytogenetik, FISH	Ultraschall der Niere, Urinanalyse, Abtasten d. Abdomens
DDS	<i>WT1-</i> assoziiert	2%	90%	<i>WT1</i> Genanalyse	Ultraschall der Niere, Urinanalyse, Abtasten d. Abdomens, evtl. Nephrektomie
ICNS (DMS)	<i>WT1-</i> assoziiert	?	90%	<i>WT1</i> Genanalyse	siehe DDS
Frasier-Syndrom	<i>WT1-</i> assoziiert	?	gering	<i>WT1</i> Genanalyse	prophylaktische Gonadektomie, Screening auf WT
BWS	sp.; kon. de- novo; 15% fam.; AD vP)	0,5%	3-5%	Zytogenetik, UPD, p57 Genanalyse	Ultraschall der Niere, Urinanalyse, Abtasten d. Abdomens, Serum AFP
Perlman- Syndrom	fam.; AR	sehr selten	> 50%	?	Ultraschall der Niere, Urinanalyse, Abtasten d. Abdomens
Simpson-Golabi- Behmel- Syndrom	XR	selten	?	?	Ultraschall der Niere, Urinanalyse, Abtasten d. Abdomens
Mulibrey- Minderwuchs	sp.; fam. (AR)	selten	?	?	Ultraschall der Niere, Abtasten d. Abdomens

Tab. 1.2 (zusammengefaßt bei [Royer-Pokora, 2000 #138]): Übersicht über die WT assoziierten Syndrome. DDS: Denys-Drash-Syndrom; ICNS: Isoliertes kongenitales nephrotisches Syndrom; ?: keine Angaben bekannt; sp: sporadisch; kon.: konstitutionell; AD.: autosomal dominant; AR: autosomal rezessiv; XR: X-chromosomal rezessiv; fam: familiär, vP: variable Penetranz Die Wilms Tumor-assoziierten Syndrome sind in zwei Gruppen zu unterteilen: solche mit *WT1*-Mutation und solche ohne *WT1*-Mutation. In Tabelle 1.2 ist eine Übersicht über Wilms Tumor assoziierte Syndrome dargestellt

1.2.6 Entstehung und Genetik des Wilms Tumors

1.2.6.1 Two Hit Modell

Ein Modell für die Entstehung von Tumoren des Kindesalters ist das "Two Hit Modell", es wurde 1971 von Knudson für das Retinoblastom aufgestellt und später auf den Wilms Tumor übertragen. Das Two Hit Modell bietet eine Erklärung für das jüngere Diagnosealter und das häufigere Auftreten von bilateralen und multizentrischen Tumoren bei Patienten mit genetischer Prädisposition.



Abb. 1.3 [Royer-Pokora, 2000 #138]: Two Hit Modell für sporadische und erbliche Wilms Tumoren. Zellen mit einer Mutation sind gelb, Zellen mit zwei Mutationen orange dargestellt. Die Mutation ist durch einen roten Block gekennzeichnet.

Es geht davon aus, daß zur Entstehung des Tumors zwei aufeinanderfolgende Mutationen ("hits") notwendig sind. Zuerst erfolgt eine somatische oder germinale Mutation, der sich stets eine somatische Mutation anschließen muß, damit ein Tumor entstehen kann. Das frühere Auftreten von Tumoren bei familiären oder erblichen Tumorerkrankungen ist damit zu erklären, daß der erste "Hit", also die erste Mutation bereits durch die Keimbahn in allen Körperzellen vorhanden ist (Abb. 1.3). Die Entstehung eines sporadischen Tumors erfordert zwei somatische Mutationen in

derselben Zelle. Da dies ein sehr viel selteneres Ereignis ist, treten sporadische Tumoren meist später und unilateral auf.

Für die "Hits" kommen unterschiedliche genetische Veränderungen, wie z. B. Mutationen, Translokationen oder LOH-Mechanismen, in Betracht. LOH (Loss of heterozygosity – Verlust der Heterozygotie) kann durch unterschiedliche Mechanismen entstehen, die in Abb. 1.4 dargestellt sind. Die Inaktivierung des zweiten Allels des Wilms Tumor Gens kann durch den Verlust eines Chromosoms, sowie durch den Verlust des einen Chromosoms bei gleichzeitiger Duplikation des anderen erfolgen. Ebenso kann eine mitotische Rekombination oder eine vollkommen unabhängige zweite Mutation zu dem LOH-Ereignis führen.



Abb. 1.4 [Royer-Pokora, 2000 #138]: LOH-Mechanismen (Verlust der Heterozygotie) in Tumorzellen. Die Mutation im WT1 Gen ist durch einen schwarzen Stern gekennzeichnet, eine zweite Mutation durch einen weißen. + bedeutet Wildtyp-Allel. Das mütterliche und das väterlichen Chromosom sind in unterschiedlichen Farben dargestellt, um die mitotische Rekombination zu verdeutlichen.

1.2.6.2 Das WT1-Gen

Seit 1990 ist das erste Gen für die Entstehung des Wilms Tumors bekannt (Call, Glaser et al. 1990; Gessler, Poustka et al. 1990). Es wurde aus der kleinsten Überlappungsregion für WAGR-Deletionen (Rose, Glaser et al. 1990) auf Chromosom 11p13 isoliert und *WT1* genannt.

Das *WT1*-Gen besteht aus 10 kodierenden Exons, die sich über einen Bereich von 50kBp auf Chromosom 11p13 ausdehnen. Upstream des *WT1*-Gens findet man eine Promotorregion, die für die Regulation des Gens sorgt.

Das *WT1*-Gen codiert für ein Zink Finger Protein mit vier Zink Fingern am carboxyterminalen Ende. Solche Motive sind häufig bei Transkriptionsfaktoren zu finden, sie sind für eine Bindung des Proteins an die DNA notwendig. Im aminoproximalen Teil des Proteins befindet sich eine zweite funktionell wichtige Domäne, die Glutamin/Prolin-reiche Region. Für eine dazwischenliegende Region, die von Exon 6 codiert wird, ist noch keine Funktion bekannt (Royer-Pokora 2000). Das Transkript enthält zwei alternative Spleißstellen, die zur Bildung von insgesamt 4 verschiedenen Spleißformen führen, die gewebsspezifisch exprimiert werden. Die Expression in der Niere wird zunächst in den kondensierten metanephritischen Blastemzellen und später in den Podozyten des frühen Glomerulus gefunden. Nach Ausdifferenzierung wird die WT1-Produktion weitgehend abgeschaltet und bleibt nur noch in den Podozyten erhalten. Auch die Expression in den Gonaden weist auf eine Funktion während der Entwicklung hin.

In Wilms Tumoren ist das WT1-Gen in 10% bis 15% der Fälle mutiert.



Abb. 1.5 (Royer-Pokora 2000): Struktur und Spleißstellen des *WT1*-Gens. Die Exons sind als Rechtecke dargestellt, die alternativen Spleißstellen dunkelgrün markiert (Exon 5 und 9Bp am Ende von Exon 9). Die bekannten funktionellen Domänen sind orange bzw. hellgrün markiert. ZF: Zink Finger; Pro/Glu: Prolin/Glutamin-reiche Domäne.

Struktur des WT1 Gens mit alternativen Spleißstellen

1.2.6.3 Die Region 11p15

In der Region von Chromosom 11p15 wird ein weiteres Wilms Tumor Gen vermutet, das *WT*2-Gen. Für diese Vermutung sprechen LOH-Ergebnisse, die in sporadischen Wilms Tumor Fällen und beim Beckwith-Wiedemann-Syndrom beobachtet werden konnten (Mannens, Slater et al. 1988; Karnik, Chen et al. 1998).

Mögliche Gene, die in dieser Region liegen und die als Kandidatengene für *WT*2 angesehen werden, sind *IGF II*, *H19*, *p57* (Dao, Walsh et al. 1999).

1.2.6.4 Weitere WT-Loci

Kopplungsanalysen in mehreren Familien mit genetischer Prädisposition für Wilms Tumor haben gezeigt, daß in den familiären Wilms Tumoren außer dem *WT1*-Gen noch mindestens 3 weitere Loci betroffen sein müssen. Die beiden bisher bekannten Loci sind *FWT1* in der Region 17q12-q21, und *FWT2* auf 19q13, mindestens ein weiterer Locus konnte bisher nicht näher spezifiziert werden (Rapley, Barfoot et al. 2000).

Weitere vermutlich mit WT assoziierte Loci wurden durch LOH-Analysen auf den Chromosomen 1p, 16q 11q und 22q aufgedeckt, wobei die Loci 11q, 16q und 22q möglicherweise eine prognostische Relevanz aufweisen, da sie mit einer hohen Frequenz mit anaplastischen Tumoren, dem Wiederaufflammen der Tumoren, und einer fatalen Prognose einhergehen (Klamt, Schulze et al. 1998).

Mit WT in Verbindung gebracht werden auch tumorspezifische Mutationen im *p*53-Gen auf 17p13 (Bardeesy, Falkoff et al. 1994) und LOH-Ereignisse auf 7p (Grundy, Pritchard et al. 1998).

1.3 Ziel der Arbeit

Im Rahmen der vorliegenden Promotionsarbeit sollen die beiden histologisch unterschiedlichen Gruppen der stromareichen und der blastemreichen Wilms Tumoren mit Hilfe verschiedener molekulargenetischer und biochemischer Analysen näher klassifiziert und miteinander verglichen werden. Zusätzlich sollten Faktoren aufgedeckt und näher analysiert werden, die mit der Entstehung von chemotherapieresistenten Tumoren und mit der Entstehung einer blastemreichen Histologie korrelieren.

Zu Beginn der Arbeit war bekannt, daß die histologisch sehr heterogenen Wilms Tumoren in nur 10% bis 15% der Fälle Mutationen im *WT1*-Gen aufweisen. Das häufigste Auftreten von *WT1*-Mutationen war dabei mit etwa 60% in stromareichen Wilms Tumoren zu finden. Diese Befunde legten die Vermutung nahe, daß für das Auftreten anderer Histologien weitere Faktoren eine Rolle spielen müssen.

Ziel war daher zunächst, die Gruppe der blastemreichen Wilms Tumoren auf Mutationen im *WT1*-Gen zu untersuchen, um eine Korrelation zwischen der Histologie und einer *WT1*-Mutation zu überprüfen. Diese histologische Subklasse sollte dann näher betrachtet und mit den *WT1* assoziierten stromareichen Wilms Tumoren verglichen werden.

Zur Differenzierung dieser beiden Gruppen sollten Genexpressionsprofile mit verschiedenen Methoden erstellt und miteinander verglichen werden. In Beiden Gruppen sollten die Mechanismen der Chemotherapieresistenzbildung untersucht werden.

2. Material

2.1 Chemikalien

Die Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen:

Amersham-Pharmacia Biotech Biozym DAKO Hoffmann-La Roche Merck Life Technologies Seromed Shandon Sigma Stratagene

Alle Chemikalien besaßen den Reinheitsgrad pro analysis.

2.2 Radiochemikalien

α - ³² P dCTP	NEN - Perkin Elmer; ICN
α - ³² P dATP	NEN - Perkin Elmer; ICN

2.3 Restriktionsenzyme

Restriktionsenzyme wurden von den Firmen Roche, New England Biolabs, MBI Fermentas, Life Technologies, Clontech bezogen und mit den entsprechenden kommerziell erhältlichen 10x Restriktionspuffern verwendet.

2.4 Andere Enzyme

Tag DNA-Polymerase	Life Technologies
T4 DNA-Ligase	New England Biolabs
T4 DNA-Ligase	Clontech
Klenow Polymerase	Roche
RNasin	Roche
Superscript Reverse Transkriptase	Roche
Superscript RT II	Roche
Proteinase-K	Roche
DNase I / Polymerase I Mix	Roche
DNase	Stratagene

2.5 Größen und Konzentrationsmarker

1kBp-DNA-Marker (Life Technologies):

12216/11198/10180/9162/8144/7126/6108/5090/4072/3054/2036/1636/1018/ 517/506/396/344/298/220/201/154/134/75 Bp 100 Bp-DNA-Marker (Life Technologies): 2072/1500/1400/1300/1200...300/200/100 Bp

Lambda DNA/Hind III-Verdau eines μg (Life Technologies)

Вр	ng
23130	480
9416	190
6557	140
4361	90
2322	50
2027	40
564	10
125	2

2.6 Bakterien

Transformationen wurden mit den Bakterienstämmen D5H α (Hanahan, 1985) und INF α 5F' (Invitrogen) durchgeführt.

2.7 Vektoren

pCR [™] II	Invitrogen
pt7Blue-3	Novagen

2.8 Kulturmedien und Antibiotikalösungen für Bakterien und humane Zellkultur

LB- (Luria Bertani) Medium	10g Bacto Trypton; 5g Bacto Yeast; 10g NaCl; ad 1l ddH ₂ O; autoklavieren
LB-Agar	10g Bacto Trypton; 5g Bacto Yeast; 10g NaCl, 1,5% Agar (w/v); ad 1I ddH ₂ O, autoklavieren
Ampicilin, Kanamycin	100mg/ml bzw. 50 mg/ml in sterilem ddH ₂ O; lagern bei -20° C
RPMI-Medium (Zellkultur)	Seromed Nr. F1213
Penicilin-Streptomycin	Seromed Nr. A2212
Fötales Kälberserum (FCS)	Boehringer Nr. 210463
L-Glutamin	Boehringer Nr. 14874200
PHA	Seromed Nr. M5030
Colcemid	Seromed Nr. L6221

2.9 Puffer und Lösungen

DABCO Antifade 2,3%DABCO; 2% Tris HCI pH 8,0; 85% Glyzerin **DAPI Stammlösung** 5mg/ml in ddH₂O DAPI Gebrauchslösung 1:2000 in 2xSSC / Tween 20 Denhardts Lösung (100x) 2% Ficoll 400; 2% Polyvinylpyrolidon; 2% BSA Denaturierungslösung (AA) 1M NaOH; 10mM EDTA DNA-Puffer (10x) 1M NaCl; 0,1M EDTA; 0,5M Tris/HCl, pH 7,4 **DNA-Isolationspuffer LCM** 1M Tris HCl pH 8; 0,5M EDTA; 1% Tween 20; 0.04% Proteinase-K EDTA 0,5M, pH 8,0 (NaOH) Ethidiumbromid Stammlösung 10mg/ml in ddH₂O Ficoll Ladepuffer (5x) 25% Ficoll 70; 25mM EDTA; 0,1% Bromphenolblau Formamid Ladepuffer 98% Formamid (deionisiert); 1% EDTA; 1% Bromphenolblau 25mM EDTA; 0,5% Sarkosyl; Guanidinthiocyanatlösung 4M Guanidinthiocyanat Lösung A (Silberfärbung) 10% Ethanol; 0,5% Essigsäure Lösung B (Silberfärbung) 0,1% AgNO₃ 1,5% NaOH; 0,01% NaBH₄; 0,015% Formaldehyd Lösung C (Silberfärbung) (37%)0,75% Na₂CO₃ Lösung D (Silberfärbung) Neutralisierungslösung (AA) 1M NaH₂PO₄ pH 7,0 Nick Translationspuffer (10x) 1M Tris HCl pH 8; 0,5M MgCl₂; 10mg/ml BSA 80mM Na₂HPO₄; 100mM NaCl, pH 7,5 PBS 100mM Tris HCl pH 8,3; 500 mM KCl; 15mM PCR-Puffer (10x) MgCl₂; 0,1% Gelatine PCR-Puffer A₁ 300mM Tris HCl pH 8,0; 250 mM KCl; 7,5mM MgCl₂; 75mM (NH₄)₂SO₄; 0,1% Gelatine PCR-Puffer A₂ 600mM Tris HCl pH 8,0; 15mM MgCl₂; 0,1% Gelatine Phenol Phenol mit 0,02M Tris HCl pH 8,0 gesättigt Proteinase-K 10mg/ml in 10mM Tris HCl pH 8,0 vor Gebrauch 2h bei 37°C inkubieren Plaque Screen Buffer (PSB) 1M NaCl; 1g/l Na-Pyrophosphat; 50mM Tris/HCl pH 7,5; 10ml/l 100x Denhardts Lösung; 1% SDS; 5mM **EDTA RNA-Denaturierungspuffer** 4M GITC; 0,02M Na-Citrat; 0,5% Sarkosyl SE-Puffer 75mM NaCl; 0,92mM EDTA; pH 8,0 SSC (20x) 3M NaCl; 0,3M NaCitrat, pH 7,0 SSCP-Ladepuffer 95% Formamid (deionisiert); 10mM EDTA Strip Lösung (AA) 0.5% SDS TAE (50x) 2M Tris Base; 5,71% Eisessig (v/v); 50mM EDTA 0,89M Tris Base; 0,89M Borsäure; 0,02M EDTA TBE (10x) TBE (10x) longrun (LiCOR) 134mM Tris Base; 45mM Borsäure; 25mM EDTA TE (1x) 10mM Tris/HCI, pH 7,4; 1mM EDTA Terminationsmix (10x) 0,1M EDTA; 1,0mg/ml Glycogen 0,32M Sucrose; 10mM Tris/HCl, pH 7,4; 5mM Triton X 100 MgCl₂; 1% Triton X 100 20mg/ml in Dimethylformamid X-Gal

Alle Lösungen wurden mit ddH_2O angesetzt und zum Teil autoklaviert oder steril filtriert. Lösungen zum Arbeiten mit RNA wurden mit 0,2% DEPC behandelt und anschließend autoklaviert. AA: Atlas Array

2.10 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden über die Firmen Metabion und MWG Biotech bezogen.

2.10.1 WT1 Oligonukleotide

cDNA-Oligonukleotide

BB3 for	5'-ATGAGGATCCCATGGGCCAGCA-3'
BB4 rev	5'-CCTGCAGATGCCGACCGTACAAGA-3'
VS1a for	5'-CGAATTCTATGGGCTCCGACGTGCGGA-3'
VS2a rev	5'-CAGTCGACTCAGCTCAGGCACTGCTCCTC-3'
VS3a rev	5'-CAGTCGACTCACCTCAGCAGCAAAGCCTG-3'
VS4a rev	5'-CAGTCGACTCAACCTGTATGTCTCCTTTG-3'
VS5a rev	5'-CAGTCGACTCAAAGCGCCAGCTGGTGTTT-3'

2.10.2 Oligonukleotide für DNA-PCR/SSCP

WT1-Exon 1-10

Promotorbereich Fragmente 1-4

Sus 21 (Pr 1) for	5'-ACTGGAAAGGGAAACTAAGTGC-3'
Sus 22 (Pr 1) rev	5'-CTTGAGGTCTGGCTCTTGCTTCTA-3'

Sus 23 (Pr 2) for5'-AAGCAAGAGCCAGACTCAAG-3'Sus 24 (Pr 2) rev5'-GTCCGTTCAGGTAAGCAGTGA-3'Sus 25 (Pr 3) for5'-ACGAGGCTCCCACACTGG-3'Sus 26 (Pr 3) rev5'-GCCGCTCCATTCACTCAG-3'Sus 27 (Pr 4) for5'-GCTTGGGCTGCTGAGTGAAT-3'Sus 28 (Pr 4) rev5'-GGGTGGGTGGGTGGGTGAAT-3'

2.10.3 Andere Oligonukleotide

cDNA-Oligonukleotide	
Aktin A for	5'-GTGGGGCGCCCCAGGCACCA-3'
Aktin B rev	5'-GTCCTTAATGTCACGCACGATTTC-3'
GapDH 5'	5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'
GapDH 3'	5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'
Enolase1 for	5'-CCACAACCTGAAGAATGTCA-3'
Enolase1 rev	5'-GTCCTTGATGAAGGACTTGTA-3'

2.10.4 CA-repeat Marker

D1S199 for	5'-GGTGACAGAGTGAGACCCTG-3'
D1S199 rev	5'-CAAAGACCATGTGCTCCGTA-3'
D1S2725 for	5'-GGAGAATTGCTTGAACCTG-3'
D1S2725 rev	5'-GATTGCTTTCATGTATTGGC-3'
D1S449 for	5'-CAGGTTTGGGGACTCAGAA-3'
D1S449 rev	5'-CCCTTGTGGTGAGGACAT-3'
D1S2749 for	5'-GATCCTGCCTTTACTGCTTG-3'
D1S2749 rev	5'-GGCCATGTGTAGCCTTTC-3'
D1S2781 for	5'-CTCTCACAGACACACGCA-3'
D1S2781 rev	5'-GTTCAATGGGGGATTCAG-3'
D1S247 for	5'-CAGATGGCCCCACCTC-3'
D1S247 rev	5'-AAGCAAAAACATTCTAGGGGTG-3'
D1S228 for	5'-AACTGCAACATTGAAATGGC-3'
D1S228 rev	5'-GGGACCATAGTTCTTGGTGA-3'
D1S201 for	5'-GGTATGGAAGTCACCCAACA-3'
D1S201 rev	5'-CTCAAAATGACTGATGGGGT-3'
D7S506 for	5'-CCCTTCAAATGCACAGATA-3'
D7S506 rev	5'-GCGTCAGTTACTGGAACTT-3'
D7S478 for	5'-TGTGTCATTACGCTTTTCATC-3'
D7S478 rev	5'-TCAAATGGTTCAGGAGAAAGA-3'
D7S678 for	5'-TGCCATCCTCAGCACTTAG-3'
D7S678 rev	5'-AGCCCATTTGAGTGGTCTT-3'
D7S510 for	5'-CAGTGTGGAGGTTCCCAA-3'
D7S510 rev	5'-ACCCAGCCGCAAGAT-3'
D7S528 for	5'-TCAACTTGAATTTCACTTTCAG-3'
D7S528 rev	5'-CATGTGCGTGCTTGTGT-3'
D11S1318 for	5'-CCCGTATGGCAACAGG-3'
D11S1318 rev	5'-TGTGCATGTNCATGAGTG-3'

D11S1323 for	5'-TGCTGCTTAGAATGAGTAGATGTC-3'
D11S1323 rev	5'-CTCTATGAAGTTGGAGTCTAGGTTG-3'
D16S503 for D16S503 rev D16S3089 for D16S3089 rev D16S400 for D16S400 rev D16S508 for D16S508 rev D16S508 rev D16S419 for D16S419 rev D16S514 for D16S514 rev D16S514 rev D16S408 for D16S408 rev D16S308 for D16S308 for D16S308 for	5'-AGTGCTCTGGAATGATGTG-3' 5'-TTGCTAGGTAGTTGTCTCCC-3' 5'-TGTGGTATTTTCAAATTAACCTG-3' 5'-AGTACGCTTCGTTTGTTTCC-3' 5'-GTCATCCGACTTCTCACAGG-3' 5'-CAGGAAAATAAATCTAACACACATA-3' 5'-CTGTGGGCACTGATAAATA-3' 5'-CTGTGGGCACTGATAAATA-3' 5'-GACGTTAGACCAGGAGTCAG-3' 5'-CTATCCACTCACTTTCCAGG-3' 5'-TCCCACTGATCATCTTCT-3' 5'-CACTCTTATCCCAGGAACCC-3' 5'-TGTAACCTTGTGTGCATCCT-3' 5'-CAGCCAGGGTAGTAAGGCTAGACCT-3' 5'-TGGGTGGCAGAGTGAGACCCTGTCT-3' 5'-AGTCTGAGAGACATCCAGGT-3'
D16S320 rev	5'-GTGATATCAGTCAGTCCTGT-3'
D22S258 for	5'-GCCTGAAATTATTCCAGCTG-3'
D22S258 rev	5'-AATAGTAGAGTTTGCCTTTC-3'

2.10.5 Oligonukleotide zur Sequenzierung

U19-800	5'-GTTTTCCCAGTCACGACG-3'
T7-800	5'-CTAATACGACTCACTATAGGG-3'
M13 uni (-29) for	5'-TGTAAAACGACGGCCAGT-3'
M13 uni (-29) rev	5'-CAGGAAACAGCTATGACC-3'

Die Oligonukleotide zur Sequenzierung und die reversen Oligonukleotide der CA-Repeat Marker wurden für die Detektion im LiCOR Sequenzierer mit IRD 800 fluoreszenzmarkiert.

2.11 Kits

Megaprime DNA-Labelling System Rediprime II DNA-Labelling System Thermo Sequenase DNA-Sequencing Kit Quick-Prep mRNA-Purification Kit SequiTherm EXCEL[™] II DNA-Sequencing Kits SMART[™] cDNA-Synthesis Kit Advantage[™] cDNA-Synthesis Kit Advantage[™] cDNA PCR Kit Advantage[™] cDNA PCR Kit PCR-Select[™] cDNA-Subtraction Kit PCR-Select[™] Differential Screening Kit Atlas[™] Pure Total RNA Labelling Kit Atlas[™] SMART[™] Probe Amplification Kit Amersham Amersham Amersham Amersham / Pharmacia Biozym Clontech Clontech Clontech Clontech Clontech Clontech Clontech Clontech

Atlas [™] SMART [™] Probe Amplification Kit	Clontech
Atlas [™] cDNA Human Cancer 588 Expression Arrays	Clontech
Atlas [™] cDNA Human Cancer 1.2 Expression Array	DAKO
DAKO Biotin Blocking System	DAKO
DAKO Peroxidase Blocking System	DAKO
DAKO Proteinblock Serum-free	DAKO
DAKO Antibody Diluent	DAKO
DAB-Chromogen Tabletten	DAKO
DAKO LSAB+ Kit, Peroxidase	DAKO
DAKO EnVision [™] visualization System	Invitrogen
Original TA Cloning Kit	Invitrogen
PCR Optimizer Kit	Invitrogen
perfectly blunt Cloning Kit	Novagen
QIAprep Spin Miniprep Kit	QIAGEN
QIAprep Spin Miniprep Kit	QIAGEN
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN
Enhanced Avian RT-PCR Kit	Sigma
RNA microprep Kit	Sigma Stratagene

2.12 Antikörper

2.12.1 Primärantikörper

Antikörper	Art	Fixierung	Verdünnung	Klon	Herkunft
BCI-2	М	Aceton	1:400	M 0887 (Klon 124)	DAKO
<i>BCI-2</i> (N-19)	Ρ	Aceton	1:50	sc-492	Santa Cruz
Cytokeratin	М	Aceton	1:10	Klon KL1	Immunotech
Desmin	М	A / M	1:25	Klon D33	DAKO
<i>IGF II</i> (C-20)	Ρ	Aceton	1:15	sc-1416	Santa Cruz
Laminin A	М	Aceton	1:25		DAKO
Vimentin	М	Aceton	1:20	Klon Vim 3B4	Roche
WT (180)	Ρ	A / M	1:200	sc-846	Santa Cruz
WT (C-19)	Р	A / M	1:300	sc-192	Santa Cruz

2.12.2 Sekundärantikörper

Anti-mouse Ig, Peroxidase linked	Amersham	(NA 931))
Anti-rabbit Ig, Peroxidase linked	Amersham	(NA 934))

2.13 Verbrauchsmaterial

Material

CapSure HS Caps Coverplates Deckgläser Dialyseschläuche Gelträgerfolie Histoslides Nylon Membran Hybond N+ Whatman 3MM

2.14 Software

Photoshop Bildbearbeitung Isis CGH-Auswertung Ikaros Excel Tabellenkalkulation Word Textverarbeitung AIDA Image Analysis AIDA Array Compare RFLP-Scan Image Manipulation

2.15 Geräte

96 Well Platten PCR Cycler Doppelblock PCR Cycler PE 9600 PCR Cycler PE 4700 PCR Cycler Automatischer Sequenzierer Phosphorimager Fluoreszenzmikroskop Phasenkontrast / Durchlichtmikroskop PixCell[®] II LCM System CM1900 Cryostat Hersteller

Arcturus Shandon Shandon Roth FMC Shandon Amersham Schleicher & Schuell

Adobe Metasystems Microsoft Microsoft Raytest Raytest Scanalytics Scanalytics

MJ Bioscience MJ Bioscience Perkin Elmer Perkin Elmer LiCOR Fuji Zeiss Zeiss Arcturus Leica

3. Patienten

Die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit beziehen sich auf ein Kollektiv von 35 Patienten mit vorwiegend blastem- und stromareichen Wilms-Tumoren, das sich hauptsächlich aus Tumoren von Patienten der Nephroblastomstudie SIOP Nr. 9/ GPOH, die von Januar 1989 bis März 1994 durchgeführt wurde (Ludwig 1992), zusammensetzte.

Es wurden vorwiegend sporadische, unilaterale Wilms Tumoren untersucht. Einige familiäre und bilaterale Tumoren konnten zusätzlich in die Untersuchung einbezogen werden.

Die Patientendaten (Klinik und Histologie) sind in Tabelle 3.1 auf Seite 26 dargestellt:

3.1 Kriterien für die Erhebung der Patientendaten

Für die Behandlung von Wilms Tumoren, werden international zwei verschiedene Konzepte angewandt, mit denen mittlerweile Überlebensraten von über 80% erzielt werden. Das Konzept der SIOP-Studie, die den größten Teil der hier untersuchten Tumoren zur Verfügung stellte, sieht für alle Patienten im Alter von 6 Monaten bis 16 Jahren bei Verdacht auf Nephroblastom eine präoperative Chemotherapie vor. Nur in bestimmten Altersgruppen, bei Notfallindikation und Unsicherheiten in der Diagnosestellung wird eine primäre Operation angewandt.

Bei Nephroblastomen der Stadien I-III (Nephroblastome ohne Fernmetastasen) erfolgt vor der Operation eine vierwöchige Chemotherapie mit Actinomycin D und Vincristin. Zu Beginn der Therapiestudie wurden eine vierwöchige und eine achtwöchige präoperative Zytostatikatherapie randomisiert geprüft. Bei Tumoren des Stadiums IV (vorliegen von Fernmetastasen) wird die präoperative Chemotherapie auf sechs Wochen verlängert und durch die Gabe von Adriamycin ergänzt. Bei Nephroblastomen des Stadiums V (bilaterales Nephroblastom) kommt eine individuelle präoperative Chemotherapie von unterschiedlicher Dauer zu Einsatz.

Patient	Sex	Klinische Merkmale	Tumorstadium/ Histologie	ul/bl	I/P	PO/ Chemo (Wochen)	Alter bei Diagnose
AB (200)	f	normal	V/ li:s; re:tri	bl	I	8	1J, 3 Mo
AF (9122)	m	normal	ll / b	ul	Ρ	4	3J, 5 Mo
AV(9318)	f	normal	V/ s	bl	I	8	7 Mo
AW (9362)	m	normal	l/ s	ul	I	4	3J, 9 Mo
CO (9345)	m	normal	b	ul		4	2J, 1 Mo
DAB (9561)	m	normal	II/ s	ul		4	2J, 10 Mo
DB (9274)	m	Hypospadie. Krypt.	l/ s	ul	I	4	9 Mo
DE (9139)	f	Doppelnieren	l/ s	ul	I	8	3J, 10 Mo
DT (9177)	m	normal	l/ s	ul	I	4	2J, 5 Mo
FG (9168)	f	normal	l/ b	ul	Ρ	PO	5 Mo
JAH (9443)	m	Metastase	IV/ e	ul	Ρ	6	2J
JB (9125)	f		IV / s	ul	Ρ	6	3J 2 Mo
JHA 9553)	f					PO	
JHB (9422)	m	Metastase	IV/ s	ul		6	3J, 9 Mo
JLH (9394)	f		I-III / tri	ul		4	6 Mo
KE (9501)	m	normal	V/ s	bl		4	1J, 2 Mo
KZ (9094)	f	normal	III/ b	ul	Ρ	4	2J, 6 Mo
LB (9184)	m	ul. Hodenaplasie	l/ s	ul	I	4	1J
MAM (9288)	m		l/s	ul		8	11 Mo
MATS (9098)	m	normal	I/ tri	ul	Ρ	8	3J
MD37							
MHU (9600)	m					PO	
MR (9545)	m		b	ul		PO	11 Mo
MVS (9519)	f		I-III / b	ul		4	5J 1 Mo
NB	f		I-III / tri	ul		4	7 Mo
PL (9474)	m		I-III / b	ul		4	1J
SAD (9476)	f		I-III / b	ul		4	12J 11 Mo
SeS (9596)	m		b	ul		PO	4J 1 Mo
SF (9385)	m	normal	II/ s	ul		4	1J
SH (5018)	m	normal	I/ tri	ul	Ρ	8	3J
SJT (9097)	f		I / tri	ul		6	4J 1 Mo
SK (9415)	f		ll/e	ul			8 Mo
SR (9066)	m	normal	III/ tri	ul	Ρ	4	7J, 5 Mo
TK (HDWT4)	m	Metastase	b				14J 11 Mo
UH (9310)	m		III / b	ul		PO	4J 11 Mo

Tab. 3.1: Zusammenstellung von klinischen und histologischen Daten der untersuchten Patienten. ul: unilateral; bl: bilateral; l: intralobäre nephrogene Reste; P: perilobäre nephrogene Reste; Chemo: Chemotherapie; m: männlich; w: weiblich; Krypt.: Kryptorchismus; Anirid.: Aniridie; PO: primär operiert; tri: triphasisch; b. blastemreich; s: stromareich; e: epithelreich; li: links; re: rechts

Vor der Operation wird durch bildgebende Verfahren (Computertomographie und Sonographie) die Verkleinerung des Tumors und die Veränderung seiner Struktur (Tumorresponse) überprüft. Der Tumor soll dadurch möglichst vollständig zu entfernen sein. Zur Graduierung der Tumorstadien erfolgt eine histologische Aufarbeitung. Die Zuordnung der Tumoren zu den einzelnen Stadien erfolgte hierbei durch die Referenzpathologen Prof. Harms, Kiel; Prof. Schmidt, Mannheim und Prof. Waldherr, Heidelberg, die neben einer einheitlichen histologischen Zuordnung auch die eventuellen Veränderungen durch die Chemotherapie festlegen. Im Rahmen dieser Studie wurden für genetische Untersuchungen Tumormaterial und Blut zur Verfügung gestellt.

3.2 Histologisches Einstufungsverfahren

Klassifikation der Nephroblastome:

- 1. Günstige Histologie (niedrige Malignität)
- 2. Standardhistologie (mittlere Malignität)
- 3. Ungünstige Histologie (hohe Malignität)

Die Histologie der Tumoren bietet die Grundlage dieser Klassifizierung, sie wird mit der Prognose des Krankheitsverlaufs korreliert.

Subklassifikation der Standardhistologie:

Es handelt sich um ein quantitatives Verfahren zur Klassifizierung der Wilms-Tumoren unter Berücksichtigung der drei typischen Komponenten des triphasischen Wilms Tumors (Blastem, Stroma und Epithel). Aus dieser Klassifizierung ergeben sich die vier histologischen Typen der Wilms-Tumoren:

- 1. Blastemreicher Tumor (B) ▷ Über 62% Blastem in der Tumorfläche
- 2. Stromareicher Tumor (S) ⇔ Über 62% Stroma in der Tumorfläche
- 3. Epithelreicher Tumor (E) ⇔ Über 62% Epithel in der Tumorfläche
- 4. Mischtyp (M) ⇔ Keine der Komponenten überwiegt

4 Methoden



Abb. 4.1 Schematische Übersicht über die durchgeführten Analysen im Rahmen dieser Arbeit

4.1 Mikrodissektion

Die Laser Capture Mikrodissektion (LCM) ist eine Methode, um kleine Areale oder auch einzelne Zellen aus einem histologischen Schnitt zu isolieren. Zellgenaue Dissektionen aus heterogenen Gewebeschnitten ermöglichen Analysen von DNA, RNA und Proteinen, ohne Kontamination durch andere Zellsorten.

Bei der LCM wird das Gewebe zunächst schonend entwässert, um die Mikrodissektion der Zellen zu ermöglichen. Es folgt das Aufsetzen des LCM-Caps, das mit einem speziellen Transferfilm versehen ist, auf den gewünschten Gewebebereich. Der Transfer Film wird nun mittels eines Niedrigenergie-Infrarot-Lasers aktiviert und verschmilzt dabei mit der jeweiligen Zelle oder Zellgruppe. Die Extraktion von DNA oder RNA erfolgt direkt vom Cap, damit werden mögliche Kontaminationen vermieden. (Abbildung 4.2)



Abb. 4.2 Methode der Laser Capture Mikrodissektion (Arcturus): Das Cap wird aufgesetzt, der Transferfilm wird durch Beschuß mit einem Infrarotlaser aktiviert und verschmilzt mit dem Gewebe, das Cap mit angeheftetem Gewebe wird abgenommen und der weiteren Verarbeitung zugeführt.

4.2 DNA Isolation

4.2.1 DNA Präparation aus Tumorgewebe mit dem QIAmp Tissue Kit

Die DNA Extraktion mittels QIAmp Tissue Kit beruht auf einem Silica Membran basierten System, bei dem die DNA durch eine Hochsalzlösung in Verbindung mit Isopropanol an die Membran gebunden und später durch eine Niedrigsalzlösung eluiert wird.

- Etwa 25mg gefrorenes Tumorgewebe (-80°C) in flüssigem Stickstoff mit einem Mörser pulverisieren.
- DNA-Isolation laut Angaben des Herstellers durchführen.

4.2.2 DNA Isolation aus Blut

Für eine DNA-Isolation aus Blut müssen zunächst die Kernlosen und daher störenden Erythrozyten entfernt werden, um die DNA dann aus den Lymphozyten Extrahieren zu können. Diese werden nun durch unterschiedliche Methoden aufgespalten, um die DNA freizusetzen, störende Zellreste werden entfernt.

a.) DNA-Isolation aus Zellkernen

- 5ml EDTA-Blut in 50ml Falcon Röhrchen geben und mit 0,32M Sucrose; 10mM Tris/HCl, pH 7,4; 5mM MgCl₂; 1% Triton X 100 (4°C) auf 50ml auffüllen; durch invertieren mischen.
- Bei 1500 rpm 10 min zentrifugieren, Überstand abgießen.
- Pellet bei –70°C lagern oder weiterverarbeiten.
- Pellet mit 2,5ml 1x DNA-Lysepuffer (1M Tris HCl pH 8; 0,5M EDTA; 1% Tween 20; 0,04% Proteinase-K) waschen, bis Erythrozyten entfernt sind; zentrifugieren, Überstand verwerfen.
- 62,5µl 20% SDS (⇔0,5%) und 125µl 10 mg/ml Proteinase-K (⇔0,5 mg/ml) zugeben und 6-12h bei 37°C inkubieren.
- Zugabe von 62,5µl 20% SDS (⇒1%)
- 2x Phenol/Chloroform, 1x Chloroform extrahieren 5 min 1500 rpm Zentrifugation.
- Ethanol Fällung mit 1/10 Vol. 3M NaOAc und 2 Vol. Ethanol abs. (-20°C). Ü.N. bei -20°C fällen, 20 min bei 4000 rpm abzentrifugieren.

b.) Aussalzmethode

- Gesamte Zellmenge mit Medium in ein 50ml Falconröhrchen geben.
- 15min bei 1000rpm zentrifugieren, Überstand verwerfen.
- Pellet in 5ml SE-Puffer (75mM NaCl; 0,92mM EDTA; pH 8,0) aufnehmen und vollständig lösen.
- 12,5µl Proteinase-K (10mg/ml) und 500µl SDS (20%) zugeben.
- Bei 56°C ü.N. im Wasserbad inkubieren.
- Nach der Proteolyse 1,5ml gesättigte NaCl-Lösung (5M) zugeben und 15sec vortexen.
- 15min bei RT und 3600rpm zentrifugieren.
- Überstand in ein neues Falconröhrchen überführen (enthält die DNA).
- 2 Vol Ethanol abs. zugeben und ü.N. bei –20°C fällen.

• 30min abzentrifugieren anschließend mit 70% Ethanol waschen.

4.2.3 Plasmid DNA-Isolation aus Bakterien mittels QIAprep Spin Kit

Die Methode der Plasmid Isolation mittels QIAprep Kit beruht auf einer alkalischen Lyse der Bakterien und nachfolgender DNA-Bindung an eine Silica-Membran unter Hochsalzkonditionen. Die Elution erfolgt wie beim QIAmp Tissue Kit mit einer Niedrigsalzlösung.

- Isolierung des Plasmides aus *E. Coli* nach Angaben des Herstellers
- Überprüfung des Inserts durch Verdau von 1µl Plasmid DNA mit den entsprechenden Enzymen.

4.2.4 DNA-Isolation nach Mikrodissektion

Bei der DNA-Isolation nach Mikrodissektion wird lediglich ein Proteinase-K-Verdau durchgeführt, um die Proteine zu lysieren und die DNA für weitere Analysen (PCR, Restriktionsverdau etc.) zugänglich zu machen.

a.) Niedrigtemperatur Proteinase-K Verdau

- Cap mit 50µl DNA-Isolationspuffer (1M Tris HCl pH 8; 0,5M EDTA; 1% Tween 20; 0,04% Proteinase-K) überschichten und über Nacht bei 37°C inkubieren.
- 8min bei 95°C Proteinase-K inaktivieren.

b.) Hochtemperatur Proteinase-K Verdau

- Cap mit 50µl DNA-Isolationspuffer (1M Tris HCl pH 8; 0,5M EDTA; 1% Tween 20; 0,04% Proteinase-K) überschichten und über Nacht bei 56°C inkubieren.
- 30min bei 68°C Proteinase-K inaktivieren.

4.3 DNA-Analysen

4.3.1 DNA-Konzentrationsbestimmung durch photometrische Messung:

Um die Konzentration einer DNA-Lösung zu bestimmen, kann eine Messung der Absorption des Lichtes bei der Wellenlänge ihres Absorptionsmaximums (260 nm) in einem Spektralphotometer erfolgen. Um Verunreinigungen durch andere Licht absorbierende Stoffe auszuschließen, wird stets eine Nullkontrolle als Referenz verwendet.

• Berechnung der Konzentration nach der Formel:

1OD₂₆₀ = 50 µg/ml doppelsträngige DNA

- Messung des Wertes bei 280nm und Errechnen des Verhältnisses OD₂₆₀/OD₂₈₀ zur Bestimmung des Grades an eventuellen Verunreinigungen mit Phenol- oder Proteinresten.
- Verhältnis für nicht verunreinigte DNA-Präparationen = 1,8.

4.3.2 Quantitative Konzentrationsbestimmung durch Auftrag auf ein Agarosegel

- Konzentrationsbestimmung einer DNA-Lösung durch Vergleich der Fluoreszenzintensität mit einem DNA-Mengenstandard (zum Beispiel λ/Hind III-Verdau eines µg DNA).
- Vergleich der Bande der DNA mit den jeweils definierten Mengen der Banden des Standards verglichen (Tabelle siehe Materialteil). Die Anfärbung der DNA erfolgt dabei mit Ethidiumbromid und die Auftrennung durch eine Agarosegelelektrophorese.

4.3.3 Gelelektrophoresen

- Auftrennung von Nukleinsäuren erfolgt durch Anlegen eines elektrischen Feldes an eine auf einer Trägermatrix aufgetragenen DNA-Präparation aufgrund ihres Molekulargewichtes und ihrer Konformation.
- Unterscheidung von zwei Systemen von Gelen, je nach Größe der aufzutrennenden Fragmente.
- PAA-Gele zur Auftrennung von Fragmenten von einem bis zu 500 Bp.
- Agarosegele für Fragmente ab 200Bp bis 50KBp.

a.) Agarosegelelektrophorese

- Lösen der Agarose durch Aufkochen einer entsprechenden Menge in 1x TAEoder TBE-Puffer (Zusammensetzung siehe Materialteil) mit der Mikrowelle.
- Abkühlen auf ca. 60° C und Zugabe von 1µg Ethidiumbromid pro 1ml Gellösung.
- Laden der Proben mit 1/5 Volumen Ficoll Ladepuffer (5x) (25% Ficoll 70; 25mM EDTA; 0,1% Bromphenolblau) und Elektrophorese in entsprechendem Puffer (1x TAE bzw. 1x TBE).
- Photographieren des Gels unter UV-Licht der Wellenlänge 260nm.

b.) Polyacrylamidgele

Anwendung von Polyacrylamidgelen bietet sich für folgende Analysen an (Beschreibungen in den entsprechenden Kapiteln):

- SSCP
- Sequenzierung
- Fragmentanalyse

4.3.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

In-vitro-Methode zur Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente, die von zwei bekannten Sequenzen eingerahmt werden (Mullis et al, 1986).

Ansatz:	100ng	genomische DNA
	25 pmol	pro angrenzendem Oligonukleotid (Primer)
	200µM	pro Nukleotid
	5µl	10x PCR-Puffer (s. Materialteil)
	ad 49,5µl	steriles H ₂ O

- 5min bei 94°C denaturieren, abzentrifugieren und auf Eis stellen.
- 1,25U Taq-Polymerase (Gibco) zugeben.
- Überschichten mit 50µl Öl.

4.3.5 PCR-Bedingungen für das WT1-Gen:

Amplifizierter Bereich	Fragment- größe (Bp)	Annealing Temp.(°C)	Zeiten für Denaturierung, Annealing und Extension (min)	Zyklenzahl	PCR-Puffer
			Exon 1-10		
WT1 EX1a	160	53	1;1;1	30	A ₁ +10%DMSO
WT1 EX1b	350	53	1;1;1	30	A+10%DMSO
WT1 EX2	230	60	1;2;2	30	standard
WT1 EX3	159	60	1;2;2	30	st +5% DMSO
WT1 EX4	127	57	1;2;2	30	standard
WT1 EX5	204	60	1;2;2	30	standard
WT1 EX6	238	60	1;2;2	30	standard
WT1 EX7	235	57	1;1;1	30	standard
WT1 EX8	192	65	1;1;1	30	standard
WT1 EX9	224	57	1;1;1	30	standard
WT1 EX10	204	60	1;2;2	30	standard
			Promotorbereich	ne 1-4	
Promotor 1	270	55	1;1;1	30	standard
Promotor 2	203	53	1;2;2	30	standard
Promotor 3	212	53	1;2;2	30	standard
Promotor 4	227	55	1;1;1	30	standard

Tabelle 4.1: PCR-Bedingungen für WT1-PCR. Puffer A aus dem Optimizer Kit von Invitrogen. Puffer A1 siehe Materialteil st: standard

4.3.6 Sonstige PCR Bedingungen

Amplifizierter Bereich	Fragment- größe (Bp)	Annealing Temp.(°C)	Zeiten für Denaturierung, Annealing und Extension (min)	Zyklenzahl	PCR-Puffer
Aktin		58	1; 2; 2	35	standard
GapDH		65	1; 1; 1	35	standard
VS1 VS5		56	1; 1; 1	35	standard
VS1a VS4a	1160	54	45sec; 1; 1	30	standard
Untersuchung von PCR-Produkten auf NuSieve-Agarosegelen

- Gießen eines 3% NuSieve-Agarosegels mit 1x TBE Puffer.
- Auftrag von 10µl des PCR-Ansatzes mit 2,5µl 5x Ficoll Ladepuffer.
- Laufpuffer: 1x TBE.

4.3.7 Nichtradioaktive SSCP

SSCP (single strand conformation polymorphism) ist eine Methode, mit der sich Mutationen und Polymorphismen nachweisen, nicht aber beschreiben lassen (Orita et al., 1989). Sie basiert auf dem Prinzip, daß DNA-Einzelstränge im nativen Gel gemäß ihrer Basensequenz eine bestimmte Konformation einnehmen. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgt dann nicht ausschließlich nach ihrem Molekulargewicht, sondern auch entsprechend ihrer Konformation.

Bei den verwendeten Gelbedingungen können daher, etwa 95% aller *WT1*-Mutationen nachgewiesen werden.



Abb. 4.3: Methode der nichtradioaktiven SSCP

SSCP-Gelelektrophorese

- Verwendung des Multiphor II Systems (Pharmacia) bei konstanter Temperatur.
- Gießen des Gels auf einer Gelträgerfolie zur Ermöglichung einer späteren Silberfärbung.

8% Gellösung: 4,5ml
 2% bzw. 10%
 Glycerol
 9ml
 40% PAA-Stammlösung.(2)

 9ml
 40% PAA-Stammlösung.(29:1; 49:1)

 ad 45ml
 H₂O steril

Zugabe von 136µl Ammoniumpersulfat 10% und 75µl TEMED

- Mindestens 1h auspolymerisieren lassen.
- Probenvorbereitung je nach Konzentration des PCR-Produktes.:

5µl	SSCP-Ladepuffer (95% Formanid,10mM EDTA pH 8,0)
1,5µl	PCR-Produkt

- oder: 6μl SSCP-Ladepuffer 3μl PCR-Produkt
- 10 min bei 95°C denaturieren, abzentrifugieren, sofort auf Eis stellen
- Auftrag von 5µl auf das Gel.
- Der Gellauf erfolgt bei 15°C und 500 Volt. Um die Laufstrecke abzumessen werden 5µl Farbmarker aufgetragen (SSCP-Ladepuffer + Bromphenolblau, Xylencyanol)

Silberfärbung

- Lösung B und D aus 10x Stammlösung verdünnen. Lösung A und C frisch herstellen.
- Fixieren der DNA 2x 3min in 300ml Lösung A unter stetigem Schütteln.
- Färbung 10min in 1x Lösung B unter stetigem Schütteln.
- Waschen je 2x mit d H₂O.
- Entwickeln bis zur deutlichen Anfärbung (etwa 20min) in 1x Lösung C unter stetigem Schütteln.
- Fixieren 5min in 1x Lösung D

4.3.8 Automatische Sequenzierung mit LiCOR

- Sequenzierung nach der Didesoxy-Methode nach Sanger (Sanger et al., 1977).
- Verlängerung der Primer mit den vier dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) durch eine DNA-Polymerase entlang einer einzelsträngigen Matrize.
- Zufälliger Kettenabbruch durch den statistisch verteilten Einbau von 2',3'-Didesoxynukleotiden (ddNTP) in vier Reaktionsansätzen mit jeweils einem unterschiedlichen 2',3'-Didesoxynukleotid.
- Entstehung unterschiedlich langer Fragmente mit jeweils dem gleichen Didesoxynukleotid an ihrem Ende.
- Auftrennung durch eine hochauflösende Gelelektrophorese.
- Detektion mittels Infrarotlaser und 5' IRD 800 markierten Primern.

PCR

100ng	spezifisches PCR-Produkt oder DNA
20pmol	M13-getailter Primer (jeweils)
200µM	dNTP (jeweils)
1x	PCR-Puffer
1,25U	Tag-Polymerase

• Bei Verwendung von PCR-Produkten erfolgt eine Aufreinigung mit dem QIAquick PCR-Purification Kit von Qiagen (Protokoll nach Angaben des Herstellers).

a) Cycle Sequencing mit Thermo Sequenase Kit (Amersham)

•	Mastermix:	10-40ng	gereinigtes PCR-Produkt oder 500ng
			Plasmid DNA
		1µl	M13 for-Primer (2pmol)
		1µl	M13 rev-Primer (2pmol)
		1µl	DMSO
		ad 21µl	ddH ₂ O _{steril}
		<u> </u>	

- Vorlegen von je 2µl Terminatormix in einer Mikrotiterplatte.
- Zugeben von 5µl Mastermix und Überschichten mit Liquidwax.
- Sequenzreaktion für PCR-Produkte: 95°C

95°C40sec65°C15sec30	95°C	2min	
70°C 20sec	95°C 65°C 70°C	40sec 15sec	30x

Sequenzreaktion für Plasmidsequenzierung:

95 0	2min	
95°C	15sec	
60°C	15sec	25x
70°C	15sec	

- Zugeben von 7µl Ladepuffer.
- Denaturieren für 3 min bei 70°C.
- Gelauftrag von jeweils 1µl.

b) Sequenzreaktion mit Excel SequiTherm (Biozym)

- Mastermix: 7,2μl SequiTherm Excel II Sequencing Buffer 2μl M13 for-Primer (2pmol) 2μl M13 rev-Primer (2pmol) 3-6,8μl DNA (50-250fmol) ad 16μl ddH₂O 1μl SequiTherm Excel II Polymerase
- Vorlegen von je 2µl Terminatormix in einer Mikrotiterplatte.
- Zugeben von 4µl Mastermix und Überschichten mit Liquidwax.

• Sequenzreaktion für PCR-Produkte:

95°C	2min	
95°C 65°C 70°C	40sec 15sec 20sec	30x

- Zugeben von 3µl Ladepuffer.
- Denaturieren für 3 min bei 70°C.
- Gelauftrag von jeweils 1µl.

Gelbedingung:

• 6% PAA-Gel 41cm lang; 0,25mm dick

Urease
10x TBE longrun
DMSO
dH ₂ O
APS
TEMED

• Entgasen und steril filtrieren.

4.3.9 LOH-Analysen von CA-Repeat Markern

- Durchführung aller LOH-PCR Analysen mit fluoreszenzmarkierten Primern; Auswertung im LiCOR automatischen Sequenzierer.
- Evaluierung mittels RFLP-Scan Software.

PCR Ansatz der LOH-PCR:

H ₂ O	2,52µl / 2,97µl
DNA (10 ng/µl)	5,0µl
10x PCR-Puffer	1,5µl
10 mM dNTP (125 μM)	1,5µl
MgCl ₂	0,9µl / 0,45µl
DMSO	1,5µl
Oligos (2 pmol/µl) je	1,0µI
Taq Polymerase	0,08µl
Gesamt	15,0µl

LOH-Locus	Annealingtemp.	Zeiten für	Zyklenzahl	MgCl ₂ -
	(°C)	Denaturierung,		Konzentration
		Annealing und		auf 15µl
		Extension (min)		Gesamtvol.
D 11 S 1318	55°C	1,1,1	35	0,9 µl
D 11 S 1323	50°C	1,1,1	35	0,9 µl
D 16 S 419	55°C	1,1,1	35	0,45 µl
D 16 S 514	55°C	1,1,1	35	0,45 µl
D 16 S 408	55°C	1,1,1	35	0,45 µl
D 16 S 308	60°C	1,1,1	35	0,45 µl
D 16 S 320	60°C	1,1,1	35	0,9 µl
D 16 S 503	50°C	1,1,1	35	0,9 µl
D 16 S 3089	50°C	1,1,1	35	0,45 µl
D 16 S 400	50°C	1,1,1	35	0,9 µl
D 16 S 508	50°C	1,1,1	35	0,9 µl
D 7 S 506	55°C	1,1,1	35	0,45 µl
D 7 S 478	50°C	1,1,1	35	0,45 µl
D 7 S 510	50°C	1,1,1	35	0,45 µl
D 7 S 528	60°C	1,1,1	35	0,45 µl
D 7 S 678	60°C	1,1,1	35	0,45 µl
BB 6/7	60°C	1,1,1	35	0,45 µl
D 1 S 228	60°C	1,1,1	35	0,9 µl
D 1 S 199	50°C	1,1,1	35	0,9 µl
D 1 S 2725	50°C	1,1,1	35	0,45 µl
D 1 S 449	50°C	1,1,1	35	0,9 µl
D 1 S 2749	50°C	1,1,1	35	0,9 µl
D 1 S 2781	50°C	1,1,1	35	0,9 µl
D 1 S 247	50°C	1,1,1	35	0,45 µ
D 1 S 201	50°C	1,1,1	35	0,45 µl
D 22 S 258	50°C	1,1,1	35	0,9 µl

PCR Bedingungen für die CA-repeat-Marker:

Tabelle 4.2: PCR-Bedingungen für CA-Repeat Marker

4.3.10 Klonierung von DNA-Fragmenten

a.) Klonierung von PCR-Produkten mittels TA-Cloning Kit (Invitrogen)

- Klonierung nach Angaben des Herstellers
- Kompetente Zellen: One-shot[™]
- Ligation über Nacht bei 14°C.
- Auftrag von je 50µl und 200µl der transformierten Probe auf eine Ampicilin bzw. Kanamycinplatte ausstreichen, und ü.N. bei 37°C inkubieren.

b.) Klonierung mit perfectly blunt Cloning Kit (Novagen)

- Klonierung nach Angaben des Herstellers
- Kompetente Zellen: One-shot[™]
- Ligation: 1 bis 2h bei 22°C.
- Vektor: pT7Blue-3
- Ausplattieren von jeweils 10 und 60µl der Zellsuspension auf Kanamycinplatten.

4.4 Komparative genomische Hybridisierung (CGH)

Bei der CGH handelt es sich um eine Methode, die eine cytogenetische Untersuchung solider Tumoren ermöglicht, die sonst schwer durchführbar wäre,



Abb.4.4: CGH-Technik schematisiert

weil diese Tumoren nur schwer oder gar nicht in Kultur zu nehmen sind. Sie beruht auf der unterschiedlichen Markierung der direkt aus dem Tumor isolierten DNA mit FITC und der Kontroll DNA mit TRITC markierten Nukleotiden und der Hybridisierung beider markierter DNA-Proben auf normale Chromosomen. Eine Inkulturnahme der Tumorzellen erübrigt sich somit. Vorher erfolgt ein Blocken repetitiver Sequenzen mit humaner Cot1 DNA. Bei Cot-1 DNA handelt es sich um angereicherte repetitive Sequenzen aus humaner Plazenta DNA.

• Direkte Fluoreszenzmarkierung der DNA-Proben durch Nick Translation nach folgendem Schema:

10x NT-Puffer		5,0µl
dNTP Mix ohne dTTP (500 µM)		2,0µl
FITC dUTP / dTTP Mix		-
bzw. TRITC dUTP/dTTP Mix		2,0µl
Tumor DNA		2µg
Polymerase I / DNase I Mix		7-9µl
H ₂ O	ad	50µĺ

• 1h 45min bei 15°C inkubieren, nach 30min 2µl Polymerase nachgeben

- Nach Ablauf der Inkubationszeit 10min bei 70°C Enzyme inaktivieren.

- Der Peak des Schmiers sollte bei etwa 300 bis 400 Bp liegen.
- Fällung nach folgendem Schema ansetzen:

20µl Kontroll DNA (TRITC markiert) 20µl Tumor DNA (FITC markiert) 20µl Cot 1 DNA 1µl Glycogen 30µl NH₄OAc (1/2 Volumen) 225µl Ethanol abs. (ca. 2,5 Volumen)

- 1h bei –20°C fällen.
- 30min bei 14000rpm zentrifugieren, Pellet lufttrocknen.
- In 7,5µl Mastermix (4x SSC 20% Dextransulfat) und 7,5µl FA deion. aufnehmen und ca. 1h bei 37°C inkubieren.
- Bei 75°C 5min denaturieren.
- OT durch Ethanol-Reihe (70% 1min; 90% 1min; 100% 1min) entwässern.
- 1ml 70% FA in 2x SSC auf 72°C vorwärmen und auf OT auftropfen (Deckglas auflegen) OT 5min im Wärmeschrank bei 72°C denaturieren).
- Kurz in 2x SSC bei RT schwenken (Deckglas abschwemmen) sofort in eiskalte Ethanol-Reihe überführen.
- Lufttrocknen und Probe auf die Hybridisierungsstelle geben. Deckglas mit Fixogum versiegeln und 4d in feuchter Kammer bei 37°C hybridisieren.
- 10 min in 2x SSC pH 7,0 bei 45°C waschen.
- In 4x SSC /Tween 20 (Lsg. IV) auf 45°C erwärmt bei RT äquilibrieren.
- 30µl DAPI Gebrauchslösung in 1ml Lösung IV geben und auf OT auftropfen.
- 10min bei RT im Dunkeln inkubieren, in Lösung IV kurz waschen, lufttrocknen lassen und mit DABCO-Antifade Mount eindeckeln.

4.5 Zellkultur

4.5.1 Adhärente Zellen

Zur Gewinnung von DNA zur CGH Kontrolle wurden humane Hela-Zellen in Kultur genommen. Die Auswahl der Zellen erfolgte, da diese bereits auf chromosomale Aberrationen untersucht worden waren und ein Vergleich Aufschluß über die Qualität der CGH-Analyse geben sollte.

- In Kulturnahme der Zellen in Petrischalen mit 20cm Durchmesser in 20ml Medium (RPMI Medium mit 0,6% Penicilin-Streptomycin; 1,2% Glutamin, 10% FCS).
- Kultivierung bei 37°C und 5% CO₂-Begasung und Medienwechsel alle zwei Tage.

4.5.2 Lymphozyten

Für die Herstellung von Chromosomenpräparaten für die komparative genomische Hybridisierung (CGH) werden Lymphozyten einer normalen Kontrollperson in Kultur genommen und durch das Spindelgift Colcemid im Stadium der Metaphase angereichert. Durch Zugabe einer hypotonen Lösung werden die Zellen anschließend zum Platzen gebracht, so daß der Zellkern für die Präparation freiliegender Metaphasenchromosomen von umgebendem Cytoplasma bereinigt ist.

- Zehn bis 15 Tropfen Heparinblut aus der Spritze in 10ml Medium (RPMI Medium mit 0,6% Penicilin-Streptomycin; 1,2% Glutamin, 20% FCS; 2,5% PHA) eintropfen.
- Kultivierung für 72h bei 37°C in geschlossenen Falcon-Röhrchen.
- Zugabe von 100µl Colcemid 90min vor Kulturende.
- 10min Zentrifugation bei 1000rpm, Überstand verwerfen.
- Tropfenweise Zugabe von 5ml hypotoner Lösung (0,56% KCl) auf 37°C vorgewärmt.
- 15min Inkubation bei 37°C im Wasserbad.
- 10min Zentrifugation bei 1000rpm, Überstand verwerfen.
- Zugabe von 5ml kaltem Fixativ auf dem Vortex, 1h Inkubation bei –20°C.
- Fixativ mindestens 4x ersetzen ohne Einwirkzeit.
- Bis auf 1,5ml abnahmen und Sediment resuspendieren.
- Lymphozytenchromosomen präparieren.

4.6 RNA-Isolation

4.6.1 RNA-Isolation aus Tumorgewebe

a.) RNA-Isolation mittels Pharmacia Quick-Prep mRNA Purification Kit (Amersham-Pharmacia Biotech)

- Gewebe unter flüssigem Stickstoff pulverisieren.
- RNA-Isolation laut Angaben des Herstellers durchführen.
- RNA mit 10µl Glycogen und 40µl NH₄OAc in 1ml Ethanol fällen und Pellet bei -80°C lagern.

b.) RNA-Isolation mit Tri Reagent LS RNA-DNA-Protein-Isolationskit (Firma)

- Zugeben von 750µl Tri Reagent zu 250µl Probe (Blut oder pulverisiertes Gewebe)
- Lysat ca. 5min bei RT bis zur vollständigen Dissoziation der Nukleo-Protein-Komplexe inkubieren.
- Mit 270µl Chloroform 2 bis 15min bei RT inkubieren; 15min 13500rpm bei 4°C zentrifugieren.
- Die obere wäßrige Phase enthält die RNA, die Interphase DNA, die untere Phenol/Chloroform-Phase die Proteine.
- wäßrige Phase mit 500µl Isopropanol (2/3 Vol.) 8min bei 13500rpm und 4°C zentrifugieren.
- Pellet mit 1ml 75% Ethanol waschen.

4.6.2 RNA-Isolation aus Zellen mittels Atlas Pure RNA Isolation Kit (Clontech)

- Zellen in ein steriles Zentrifugationsgefäß überführen.
- Mit 2000rpm (500 x g) bei 4°C 5min zentrifugieren.
- 1 mal mit PBS Puffer waschen, mit 2000rpm (500 x g) bei 4°C 5min zentrifugieren. Überstand verwerfen.
- 3ml Denaturierungslösung zugeben und durch Auf- und Abpipettieren mischen, anschließend gut vortexen, bis das Pellet komplett gelöst ist.
- 5 bis 10min auf Eis inkubieren. Gut vortexen.
- Homogenisat bei 12000rpm und 4°C 5min zentrifugieren, um Zellreste zu entfernen.
- Kompletten Überstand in ein neues Röhrchen geben.
- 6ml Phenol zugeben und 1min vortexen. 5min auf Eis inkubieren.
- 1,8ml Chloroform zufügen 1-2min vortexen 5min auf Eis inkubieren.
- Homogenisat bei 12000rpm und 4°C 10min zentrifugieren.
- Obere wäßrige Phase in ein neues Röhrchen überführen.
- Phenol / Chloroform Extraktion mit 4,8ml Phenol und 1,8ml Chloroform wiederholen. Obere Phase in ein neues Röhrchen überführen
- Langsam unter wiederholtem mischen 6,0ml Isopropanol zufügen. 10min auf Eis inkubieren.
- Probe bei 12000rpm und 4°C 10min zentrifugieren.
- Überstand schnell abnehmen, ohne das RNA-Pellet zu zerstören.
- 3,0ml Ethanol 80% zugeben.
- Probe bei 12000rpm und 4°C 5min zentrifugieren.
- Überstand schnell und vorsichtig abnehmen.
- Pellet Lufttrocknen.
- Pellet in soviel H₂O_{DEPC} aufnehmen, daß eine Konzentration von 1-2µg/µl vorliegt. Pellet gründlich durch Pipettieren und Schütteln lösen.
- RNA bis zum weiteren Gebrauch bei -80°C lagern.

4.6.3 RNA-Isolation nach Mikrodissektion

a.) RNA- Extraktion mit Guanidinthiocyanatpuffer:

- 200 μ l RNA Denaturierungspuffer (GITC) und 1,6 μ l β -Mercaptoethanol in 0,5ml Röhrchen geben.
- Mehrmals invertieren um das Gewebe vom Cap abzulösen.
- Lösung in ein 1,5ml Röhrchen umfüllen.
- 20µl (0,1x Vol.) 2M NaOAc, 220µl (1x Vol.) Phenol und 60µl (0,3x Vol.) Chloroform-Isoamylalkohol zugeben. Gut vortexen.
- 15min. bei 4°C zentrifugieren, wäßrige Phase in neues Röhrchen überführen.
- 1-2µl Glycogen und 200µl kaltes Isopropanol hinzufügen.
- Bei -80°C mind. 30min (oder ü.N.) fällen 15min bei 4°C zentrifugieren
- Überstand abnehmen
- mit 400µl kaltem 70 % Ethanol waschen. 5min bei 4°C zentrifugieren.
- Überstand vollständig abnehmen. Lufttrocknen um restlichen Alkohol zu entfernen.
- Lagern des Pellets bei -80°C bis zum weiteren Gebrauch.

- Zugabe von 15µl DEPC-Wasser, 1µl 20U/µl RNase Inhibitor (RNasin), 2µl 10x DNase Puffer (Genhunter) und 2µl U/µl DNase (20 Units total)
- Bei 37°C 30min inkubieren.
- Zugabe von 20µl NaOAc, 220µl Phenol & 60µl Chloroform-Isoamylalkohol 10min. bei 4°C zentrifugieren.
- obere wäßrige Phase in neues Röhrchen überführen.
- 1-2µl Glycogen und 200µl kaltes Isopropanol hinzufügen.
- Zentrifugieren bei -80°C mind. 30min (oder ü.N.) fällen; 15min bei 4°C; Überstand abnehmen.
- Mit 400µl kaltem 70% Ethanol waschen; 5min bei 4°C zentrifugieren.
- Überstand vollständig abnehmen; lufttrocknen um restlichen Alkohol zu entfernen.
- Lagern des Pellets bei -80°C bis zum weiteren Gebrauch.

b.) RNA-Extraktion mittels Strata-Prep Total RNA-Microprep Kit (Stratagene):

- 0,7 μ I β -Mercaptoethanol zu 100 μ I Lysepuffer geben und CapSure Cap mit Gewebeprobe aufsetzen. Mehrfach invertieren.
- RNA Isolation laut Angaben des Herstellers durchführen.
- Bei geringeren RNA-Mengen (nach Mikrodissektion) Extraktion mit 10µl Elutionspuffer.

4.7 RNA-Analysen und Expressionsprofilerstellung

Die Untersuchung der aus Mikrodissektion gewonnenen RNA erfordert aufgrund der geringen Mengen, die aus einem Tumorschnitt isoliert werden können, stets eine Amplifikation der gesamt-RNA, bevor weiterführende Untersuchungen gemacht werden können. Die von Clontech entwickelte SMART (früher CapFinder) Methode, bietet dazu eine relativ unkomplizierte Möglichkeit. Unter Ausnutzung der terminalen Transferaseaktivität der MMLV-Reversen-Transkriptase wird an das 5'-Ende der RNA eine kurze (3-5 Bp) Desoxycytidinsequenz angehängt, mit der das 3'-Ende des SMART-Oligonukleotides annealt. Das dadurch kreierte verlängerte Template weist nun am 5'-Ende eine komplementäre Sequenz zu dem SMART-Oligonukleotid und am 3'-Ende eine dem Oligo(dT)-Nukleotid komplementäre Sequenz auf. In der darauffolgenden LD (long distance) PCR, dienen diese Sequenzen als Primerangriffsellen. Dadurch kommt es zu einer starken Anreicherung an "full-length"-Fragmenten. (Schematische Darstellung in Abb. 4.5)



Abb. 4.5 SMART (<u>S</u>witched <u>M</u>echanism <u>At</u> 5' end of <u>RNA T</u>emplate) Methode (Clontech)

Die **cDNA-Subtraktions-Methode**, ist eine Methode zur Identifizierung differentiell exprimierter cDNAs speziell aus geringen Ausgangsmengen. Durch Hybridisierung unterschiedlicher Adaptoren und anschließende PCR-Amplifikation nur der

differentiell exprimierten Fragmente, ohne daß eine physikalische Trennung von einzel- und doppelsträngiger cDNA erfolgen muß, soll eine bis zu 1000fach Anreicherung der differentiell exprimierten Sequenzen erfolgen. Bei geringen Ausgangsmengen ist eine SMART-Amplifikation als vorgeschalteter Schritt möglich, was die Subtraktion auch aus mikrodissektioniertem Material möglich macht. Eine schematische Darstellung der Funktionsweise der cDNA-Subtraktions-Methode nach Clontech ist in Abbildung 4.5 dargestellt.

4.7.1 SMART cDNA-Synthese für PCR-Select (Clontech)

- A. Erststrangsynthese:
- Ansatz je Probe (+ Kontrolle):

RNA-Probe	1-3µl*
(0,025-1µg Poly A ⁺ - oder 0,05-1µg total-RNA))
cDNA-Synthese (CDS) Primer (10 μM)	1µl
SMART II Oligonukleotide (10 µM)	1µl
H ₂ O _{dest.}	xµl

Gesamtvolumen

5µl

(* Bei RNA aus Mikrodissektion: Pellet in $3\mu I H_2O_{st.}$ aufnehmen und komplett einsetzen)

- 2min. im Cycler bei 70 °C inkubieren, anschließend bei Raumtemperatur lassen.
- Folgende Reagentien hinzufügen:

5x First Strand Buffer	2µl
DTT (20mM)	1µl
dNTP (10 mM)	1µl
Superscript II reverse Transkriptase	1µl

- Bei 42°C 1h im Wärmeschrank inkubieren.
- Total RNA in 40µl TE Puffer aufnehmen und 7min bei 72°C im Cycler inkubieren.
- B. cDNA-Amplifikation mittels LD-PCR
- Je Reaktion entsprechendes Volumen cDNA einsetzen (bei Material aus Mikrodissektion 10μl).
- Aufteilung der Proben auf jeweils drei Ansätze zur PCR Optimierung.
- Mastermix herstellen:

H ₂ O _{deion.}	74µl
10 x Klen-Taq PCR-Puffer	10µl
dNTP (10mM)	2µl
PCR-Primer (10µM)	2µl

Gesamtvolumen

90µl (je Ansatz)

• Cyclerprogramm:

95°C	1min
x Zyklen:	
95°C	15sec
65°C	30sec
68°C	6min

- alle Röhrchen zunächst 15 Zyklen durchlaufen lassen.
- Zwei Röhrchen jeder Probe abnehmen, bei 4°C lagern.
- 15µl der 15-Zyklen PCR abnehmen und bei 4°C aufbewahren und mit dem restlichen Ansatz die PCR weiterführen.
- nach 18, 21, 24 und 27 Zyklen ebenso verfahren.
- 5µl der jeweils entnommenen Proben auf ein 1,2%iges Agarosegel auftragen, um die optimale Anzahl der Zyklen festzustellen.
- Mit den nach 15 Zyklen entnommenen Röhrchen die PCR bis zur optimalen Zyklenzahl weiterführen.
- 5µl der Proben auf ein 1,2%iges Agarosegel auftragen.
- 2µl EDTA hinzufügen um die Reaktion abzustoppen.
- Bei –20°C lagern. 7µl in ein neues Röhrchen überführen und zur Kontrolle der Säulenaufreinigung aufbewahren.

C. Säulenaufreinigung:

- Zur Aufreinigung der cDNA für die Anwendung im PCR-Subtraktions-Kit, Prozedur sowohl mit der Driver, Tester, als auch mit der Kontroll cDNA durchführen.
- Je Reaktionsansatz 2 Röhrchen in einem 1,5ml Röhrchen vereinigen.
- Gleiches Volumen Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol-Gemisch (25:24:1) hinzufügen, 10min bei 14000rpm zentrifugieren.
- Obere wäßrige Phase in neues 1,5ml Röhrchen überführen.
- 700µl n-Butanol (Isobutanol ist auch möglich), zur Einengung des Volumens der wäßrigen Phase hinzufügen. Vortexen. (Das Produkt soll in einem Volumen von 40 – 70µl konzentriert werden.)
- bei 14000rpm (RT) 1min zentrifugieren.
- Untere wäßrige Phase weiterverwerten. Obere Butanol-Phase abnehmen und verwerfen.
- Chromaspin Säulen mehrmals invertieren, bis Gelmatrix völlig verteilt ist.
- Säulenpuffer, verwerfen und 1,5ml TNE Puffer auf die Säule geben.
- Puffer durch die Säule laufen lassen, bis die Geloberfläche zu sehen ist und verwerfen (Oberfläche solle bei 7,5ml sein, wenn deutlich niedriger ⇒ neue Säule nehmen).
- Langsam und vorsichtig Probe auf die glatte Geloberfläche geben.
- 25µl 1x TNE Puffer auf die Säule geben und komplett durchlaufen lassen. Mit weiteren 150µl ebenso verfahren ⇒ verwerfen.
- Säule auf ein neues 1,5ml Röhrchen stellen und 320µl 1x TNE Puffer zugeben und als aufgereinigte cDNA Fraktion sammeln.
- Nochmals 75µl 1x TNE Puffer auf die Säule geben und in weiterem Röhrchen sammeln ⇒ bei –20°C lagern, bis zur Überprüfung mittels EtBr-Gel-Analyse aufbewahren.

• Zur Überprüfung der Säulenchromatographie 3µl unaufgereinigtes PCR-Produkt zusammen mit 10µl aufgereinigtem PCR-Produkt auf ein 1,2%iges Agarosegel auftragen.

4.7.2 cDNA-Subtraktion (Clontech)



Abb. 4.6: PCR-Select cDNA-Subtraction Methode (Clontech)

4.7.2.1 Protokoll der cDNA-Subtraktions-Methode (Clontech):

A. Rsa I Verdau:

Fraktionen I und II aus der Säulenchromatographie des SMART Ansatzes vereinigen und zusammen weiterverarbeiten.

Verdau jeweils mit Tester, Driver und Kontroll DNA durchführen, zur Gewinnung kürzerer Blunt-End DNA-Fragmente (notwendig für Adaptor-Ligation).

Ansatz:	
ds cDNA	395µl
10x Rsa I Puffer	40µl
Rsa I (10u/µI)	5µl

- Vortexen und kurz abzentrifugieren.
- Bei 37 °C 3h inkubieren.
- 2,5µl EDTA / Glycogen-Mix hinzufügen, um die Reaktion zu stoppen.
- Phenol-Chloroform Extraktion durchführen.
- Mit 200µl 4M NH₄OAc und 1500µl 95% Ethanol fällen.
- Pellet mit 200µl 80% Ethanol waschen.
- Pellet in 6,7µl TNE Puffer aufnehmen und bei –20°C lagern.
- Kontroll-Driver und Proben-Driver DNA bei –20°C lassen, Tester und Kontroll-Tester DNA weiterpräparieren.

B. Adaptor Ligation:

- 1µl jeder Rsa verdauten experimental DNA mit 5µl H₂O verdünnen.
- Kontroll Tester DNA herstellen:
- 2μl der Kontroll DNA (Hae III-digest of φ X 174 DNA) mit 38μl H₂O verdünnen

Präparation der adaptorligierten Tester DNA:

• Ligationsmastermix herstellen; Ansatz:

H ₂ O	3µl
5 x Ligationspuffer	2µl
T4 DNA Ligase (400u/µl)	1µl

• Für jede Proben Tester DNA und für die Kontroll Tester DNA Ansatz nach folgender Tabelle herstellen:

Komponente	Tester 1 – 1 (µl)	Tester 1 – 2 (µl)
verdünnte Tester cDNA	2	2
Adaptor 1 (10µM)	2	-
Adaptor 2R (10µM)	-	2
Mastermix	6	6
Gesamtvolumen	10	10

- Je 2µl des Tester 1 –1 und des Tester 1 2 Ansatzes in neuem Röhrchen mischen (⇔ unsubtrahierte Tester Kontrolle)
- Röhrchen kurz zentrifugieren und bei 16 °C ü.N. hybridisieren.

- Ligationsreaktion durch Zugabe von 1µl EDTA/Glycogen-Mix abstoppen und 5min auf 72°C erhitzen, um die Ligase zu inaktivieren.
- Präparation der adaptorligierten Tester DNA ist abgeschlossen.
- 1µl der unsubtrahierten Tester DNA abnehmen (1-c, 2-c, 3-c) und in 1ml H₂O lösen. Proben werden für PCR gebraucht.
- Proben bei –20°C lagern.
- Ligationsüberprüfung:
- Jeweils 1µl der cDNA in 200µl H₂Overdünnen.
- Komponenten laut folgender Tabelle zusammengeben:

Komponente	Tube:	1	2	3	4	
Tester 1-1 (ligiert mit Adaptor 1)	1		1	-	-	
Tester 1-2 (ligiert mit Adaptor 2R)	-		-	1	1	
G3PDH 3' Primer (10µM)	1		1	1	1	
G3PDH 5' Primer (10µM)	-		1	-	1	
PCR-Primer 1 (10µM)	1		-	1	-	
Gesamtvolumen	3		3	3	3	

• Mastermix erstellen für alle Röhrchen (+1 zusätzliches):

Reagenz	pro Röhrchen	für 4 Reaktionen
H ₂ O	18,5µl	92,5µl
10 x PCR Puffer	2,5µl	12,5µl
dNTP-Mix	0,5µl	2,5µĺ
50x Adv. cDNA Pol. Mix	0,5µl	2,5µl
Gesamtvolumen	22µI	110µl

- Im Perkin Elmer (PE 480) 5min bei 75°C inkubieren für die Adaptorextension.
- Proben nicht aus dem Cycler entfernen, sondern sofort mit der PCR beginnen.

30sec	94°C	
30sec	65°C	x 25
2,5min	68°C	

• 5 µl jedes Ansatzes mittels Agarosegelelektrophorese überprüfen.

C. Erste Hybridisierung:

• Für jeden Versuchsansatz und für die Kontrolle Komponenten nach folgender Tabelle zusammengeben:

Komponente	Hybridisierung Probe 1	Hybridisierung Probe 2
Rsa I-verdaute Driver cDNA	1,5µl	1,5µl
Adaptor 1-ligierter Tester 1-1	1,5µl	-
Adaptor 2-ligierter Tester 1-2	-	1,5µl
4x Hybridisierungspuffer	1,0µl	1,0µl
Gesamtvolumen	4.0µl	4.0µl

- Im Thermocycler 1,5min bei 98°C inkubieren.
- 8h bei 68°C inkubieren und direkt mit der zweiten Hybridisierung fortfahren.

D. Zweite Hybridisierung:

Ansatz:	
Driver cDNA	1µ
4 x Hybridisierungspuffer	1µ
H ₂ O steril	2µ

- 1µl des Ansatzes in ein 0,5µl Röhrchen geben und im Thermocycler 1,5 min bei 98°C inkubieren.
- Frisch denaturierten Driver aus dem Thermocycler nehmen und nach folgender Prozedur simultan mit Probe 1 und 2 mischen. Dadurch wird abgesichert, daß die beiden Hybridisierungsproben nur in Anwesenheit frisch denaturierten Drivers zusammengemischt werden:
- Mikropipette auf 15µl stellen.
- Mit der Spitze die Mineralöl/Proben Grenze des Röhrchens mit Probe 2 berühren.
- Vorsichtig gesamte Probe in die Pipettenspitze einziehen. (Eine kleine Menge Mineralöl im Ansatz ist nicht störend).
- Pipette aus dem Röhrchen nehmen und ein wenig Luft einziehen, dann gleiche Prozedur mit dem frisch denaturierten Driver durchführen. (Das Röhrchen sollte nun beide Proben getrennt durch ein kleines Luftpolster enthalten.)
- Den gesamten Inhalt in das Röhrchen mit Probe 1 geben.
- Reaktion bei 68°C über Nacht inkubieren.
- 200µl Dilution-Buffer hinzufügen.
- Im Thermocycler bei 68°C 7min inkubieren.
- Bei –20°C lagern.

E. PCR Amplifikation der Subtrahierten Proben:

• Mastermix erstellen:

H ₂ O st.	19,5µl
10 x PCR-Puffer	2,5µl
dNTP Mix (10 mM)	0,5µl
PCR-Primer 1 (10 µM)	1,0µl
50 x Polymerasemix	0,5µl
-	•

Gesamtvolumen 24,0µl

- Je Probe 1µl DNA aus Hybridisierung 2 hinzugeben.
- PCR Ansätze:
 - Forwärts subtrahierte cDNA
 - unsubtrahierte Tester Kontrolle (1-c)
 - Rückwärts subtrahierte cDNA
 - unsubtrahierte Tester Kontrolle (2-c)
 - Subtrahierte Skelettmuskulatur Kontrolle
 - unsubtrahierte Skelettmuskulatur Kontrolle (3-c)
 - PCR Kontrolle subtrahierte DNA aus dem Kit

 Reaktion im Cycler 5min. bei 75°C inkubieren und dann sofort mit der PCR beginnen (Perkin Elmer Cycler PE 2400):

94°C	25sec
27 Zyklen:	
94°C	10sec
66°C	30sec
72°C	1,5min

• 8µl auf einem 2%igen Agarosegel überprüfen.

F. Nested PCR

- 3µl jedes Ansatzes mit 27µl H₂O verdünnen (Für Differential Screening aufbewahren!!!).
- Mastermix für nested PCR herstellen:

H ₂ O st.	18,5µl
10 x PCR-Puffer	2,5µl
Nested PCR-Primer 1	1,0µI
Nested PCR-Primer 2R	1,0µl
dNTP Mix (10mM)	0,5µll
50x Polymerasemix	0,5µl
Gesamtvolumen	24,0 µl

- PCR (Perkin Elmer Cycler PE 2400):
- 12 Zyklen:
- 94°C 10sec
- 68°C 30sec
- 72°C 1,5min
- 8µl auf einem 2%igen Agarosegel überprüfen.
- Produkte bei –20°C lagern.

4.7.3 PCR-Select Differential Screening (Clontech)

Die Methode des Differential Screening, ist eine Methode zur Reduktion des Hintergrundes an nicht differentiell exprimierten cDNA-Sequenzen, der sich speziell beim Einsatz geringer Ausgangsmengen an RNA ergeben kann.

Das Screening erfolgt in zwei Ansätzen. Im ersten Ansatz erfolgt eine Hybridisierung der Tester cDNA auf zwei Dot-Blots, die jeweils aus Tester und Driver cDNA aufgetragen sind. Die differentiell exprimierten cDNAs sollten dabei nur auf dem "Tester-Blot" hybridisieren. Hierbei werden speziell die in größerer Menge vorhandenen Sequenzen detektiert. Die weniger stark vertretenen fallen dabei weg.

Um diese Sequenzen nicht zu verlieren, hybridisiert man im zweiten Ansatz die Tester cDNA auf eine forwärts subtrahierte Probe und auf eine rückwärts subtrahierte Probe. Wirklich differentiell exprimierte Sequenzen dürften dabei nur mit derselben, also der forwärts-Probe ein Signal ergeben.

4.7.3.1 Protokoll der Differential Screening Methode:

- Bearbeitung der cDNA-Inserts für den Array:
- Kolonien von Agarplatten picken und in einer 96 Well Mikrotiterplatte jede Kolonie in 100µl LB-Ampicilin (oder Kanamycin) Medium mind. 2h bei 37°C schütteln. Dieser Schritt kann auch über Nacht erfolgen.
- Mastermix für jeden zu amplifizierenden Klon (+1) herstellen:

10x PCR Puffer	2,0µl
Nested Primer 1	0,6µl
Nested Primer 2R	0,6µl
dNTP (10mM)	0,4µl
H ₂ O	15,2µl
50 x PCR Enzymmix	0,2µĺ
Gesamt	19,0µl

- 19µl des MM in jedes Well der Mikrotiterplatte aliquotieren, und 1µl Bakteriensuspension hinzufügen.
- PCR-Bedingungen:

94°C	30sec
23 Zyklen:	
95°C	30sec
68°C	3min

- 5µl jeder Reaktion auf einem 2%igen Agarosegel überprüfen.
- Dot-Blots der PCR-Produkte herstellen.
- 5µl jedes PCR-Produktes mit 5µl frischer 0,6M NaOH in einer 96 Well Platte mischen.
- 1-2µl jeder Probe denaturierten DNA auf eine Nylonmembran aufbringen. Mindestens zwei identische Blots anfertigen.
- Neutralisieren der Blots für 2-4min. in 0,5M Tris-HCI (pH 7,5) und anschließend waschen in H_2O .
- Crosslinken der DNA mittels UV-Bestrahlung.
- Nested PCR der subtrahierten DNA
- PCR Mastermix nach folgendem Schema herstellen:

H ₂ O Nested Primer 1 Nested Primer 2R 10x PCR-Puffer dNTP (10mM)	18,5µl 1,0µl 1,0µl 2,5µl 0,5µl
50x PCR Enzym Mix	0,5µl
Gesamivolumen	24,0µi

- Je Reaktion 1µl Template aus der ersten (nicht nested) End-PCR der cDNA-Subtraktion hinzufügen.
- Jeweils eine PCR für die forwärts-subtrahierte und eine für die rückwärtssubtrahierte Probe anfertigen.
- PCR Bedingungen:

11 Zyklen:	
94°C	30sec
68°C	30sec
72°C	1,5min
ein zusätzlicher Zyklus:	
72°C	5min

- 8µl der PCR auf einem 2%igen Agarosegel überprüfen. Das Gelbild sollte einen Schmier ohne distinkte Banden ergeben.
- Aufreinigung und Restriktionsverdau der Subtrahierten cDNA-Proben.
- Zwei PCR-Röhrchen vereinigen und mittels PCR-Purification Kit von Qiagen aufreinigen.
- Zur vollständigen Entfernung störender Substanzen anschließend eine Ethanol Fällung vornehmen (28µl aufgereinigtes PCR-Produkt mit 15µl 7,5M NH₄OAc mischen und 90µl Ethanol abs. zugeben. Mischen und bei 14000rpm. 15min zentrifugieren. Mit 100µl Ethanol 70% waschen 5min bei 14000rpm zentrifugieren)
- Pellet in 28µl H₂O aufnehmen.
- 3µl Je Probe aliquotieren und zur Überprüfung des Verdaus aufbewahren.
- 3µl Restriktionspuffer und 1,5µl Rsa I hinzugeben 1h bei 37°C inkubieren.
- Ohne abzustoppen den Verdau auf einem 2%igen Agarosegel zusammen mit den unverdauten Proben überprüfen. (Die Adaptoren sollten als Bande am unteren Ende des Gellaufs zu sehen sein.)
- Proben auf Eis lagern.
- Nach der Gelüberprüfung 1µl Sma I Restriktionsenzym hinzugeben und 1h bei RT inkubieren.
- Aufreinigung mittels QIAquick PCR-Purification-Kit.
- Radioaktives Labeln der Proben mit Rediprime[™]II
- Zu labelnde DNA in einer Konzentration von 2,5-25ng auf 45µl mit 1x TE Puffer verdünnen.
- DNA in kochendem Wasserbad 5min denaturieren und anschließend 5min auf Eis abkühlen
- Kurz zentrifugieren, um die Probe am Boden des Röhrchens zu sammeln.
- Denaturierte DNA in das Reaktionsgefäß aus dem Kit geben. NICHT MISCHEN!
- 5µl Redivue [³²P] dCTP zugeben und durch auf und abpipettieren mischen
- 10min bei 37°C inkubieren.
- Durch Zugabe von 5µl 0,2M EDTA Reaktion stoppen.
- Fällung nach folgendem Schema durchführen:
- + 7,0µl tRNA (1/10 Vol.)
- + 7,0µl 0,5M EDTA (1/10 Vol.)
- + 70µl Na-Acetat 3M (1 Vol.)
- + 280µl Ethanol abs. –20°C (2 Vol.)

- 30min bei –20°C fällen.
- 15mi bei 14000rpm und 4°C zentrifugieren.
- In 200µl 1x TE aufnehmen.
- 5min bei 95°C denaturieren.
- Vorhybridisierung und Hybridisierung mit markierter Probe.
- Hybridisierungslösung für jede Membran anfertigen.
- 50µl 20x SSC und 50µl Blockierungs Lösung mischen und 5min kochen, dann auf Eis abkühlen und mit 5ml vorgewärmter Hybridisierungslösung kombinieren.
- Jede Membran in ein Hybridisierungsröhrchen geben und mit 2x SSC anfeuchten.
- SSC verwerfen und die angefertigte Hybridisierungslösung zugeben.
- 40-60min Bei 72°C Prähybridisieren.
- Hybridisierungsproben anfertigen 50µl 20x SSC und 50µl Blockierungs Lösung mischen und die markierte, aufgereinigte Probe zugeben.
- Markierte Forwärts- und Rückwärts-Probe in die jeweiligen Hybridisierungsröhrchen geben.
- Bei 72°C ü.N. im Rotationsofen hybridisieren.
- Membranen mit niedrigstringenter Waschlösung (2xSSC / 0,5% SDS) 4x 20min bei 68°C waschen.
- Membranen mit hochstringenter Waschlösung (0,2x SSC / 0,5% SDS) je nach Bedarf bis zu 2x 20min bei 68°C waschen.
- Membranen 3h bei -80°C und anschließend ü.N. (oder für 2 Nächte) bei RT mit einem Röntgenfilm exponieren.

4.7.4 Atlas Human Cancer Array (Clontech)

Die Atlas cDNA-Expression-Arrays sind auf Nylonmembran basierende Arrays, mit denen die Erstellung eines breiten Expressionsprofiles ermöglicht wird. Die in dieser Arbeit verwendeten Makroarrays enthalten je nach Größe 588 doppelt gespottete bzw. 1200 einzeln gespottete cDNA-Sequenzen auf einem Filter. Bei den gespotteten Sequenzen handelt es sich um speziell krebsspezifisch exprimierte Gene. Das Schema der Methode ist in Abb. 4.6 dargestellt.

4.7.4.1 Protokoll der Array Hybridisierung:

- RNA Isolation mittels Stratagene Microprep-Kit und Amplifikation mittels SMART (cDNA-Synthese und LD-PCR) laut vorhandenen Protokollen.
- Aufreinigung der Produkte mittels QIAquick-PCR-Purification-Kit.
- SMART cDNA Probe Markierung
- Je 2,0µl spezifische CDS-Primer mit ca. 500ng aufgereinigtem PCR-Produkt versetzen, mit dH₂O auf 34µl auffüllen.
- Denaturieren der DNA-Probe durch Erhitzen auf 95°C für 10min, Abkühlen bei RT, kurz abzentrifugieren.
- Mix erstellen (pro Röhrchen):

5,0µl	Labelling Buffer
-------	------------------

- 5,0µl dNTP-Mix (for dCTP-label)
- 5,0µI [α -³²P] dCTP (>2500 Ci/mmol, 10µCi/µI)
- Proben 2-3min bei 50°C vorinkubieren; 1,0µl Klenow-Polymerase zum Mix geben.

- Zugabe von 16µl Mastermix zur denaturierten Probe, durch Pipettieren mixen.
- für 30min bei 50°C inkubieren.
- Stop der Reaktion durch Zugabe von 1µl EDTA (0,5M)
- Aufreinigen mit Nucleospin Column:
- Verdünnung der Probe auf 400µl mit NT2-Puffer.
- Probe auf die Säule pipettieren und 1min bei 14.000rpm zentrifugieren.
- Säule in frisches Röhrchen stellen, Zugabe von 350µl NT3-Puffer, anschließend 1min bei 14.000rpm zentrifugieren, 2x wiederholen.



Abb. 4.7: Atlas Array Hybridisierungsmethode (Clontech)

- Säule in frisches Röhrchen stellen, Zugabe von 100µl NE, 2min inkubieren und 1min bei 14.000rpm zentrifugieren.
- Probe auf Einbau von ³²P überprüfen.
- Hybridisierung auf Atlas Array.
- 5ml ExpressHyb Lösung auf 68°C erwärmen.
- 50µl Smart Blockierungs Lösung für 5 min auf 95°C erhitzen, dann 2 min auf Eis abkühlen.
- Die denaturierte Smart Blockierungs Lösung in die erwärmte ExpressHyb-Lösung geben und bis zum Gebrauch auf 68°C lassen.
- Atlas Array mit dH₂O anfeuchten und überschüssige Flüssigkeit abschütteln. Filter in mittelgroßer Hybridisierungsflasche plazieren.
- Fertige ExpressHyb Lösung zugeben und gut über den gesamten Filter verteilen.
- 30 min bei 68°C im Rotationsofen vorhybridisieren.
- Markierte Probe mit 11µl 10x Denaturierungslösung (1M NaOH, 10mM EDTA) versetzen und 20min bei 68°C denaturieren.
- Gleiches Volumen (120µl) 2x Neutralisierungslösung (1M NaH₂PO₄, pH 7,0) zugeben und 10min bei 68°C Neutralisierung.
- In die Hybridisierungsflasche geben. Dabei darauf achten, daß die Probe nicht direkt auf die Membran aufgebracht wird.
- Über Nacht bei 68°C im Rotationsofen hybridisieren.
- Waschlösung 1 (2x SSC, 1% SDS) und 2 (0,5x SSC, 0,5% SDS) auf 68°C erwärmen.
- Vorsichtig die Hybridisierungslösung abgießen und Filter in Schale geben 500ml Waschlösung 1 zusetzen. Atlas Array 2x 30min bei 68°C mit Waschlösung 1 waschen.
- Einen zusätzlichen Waschschritt für 10min mit Waschlösung 2 durchführen.
- 5 Minuten in 2xSSC bei RT äquilibrieren.
- Membran sofort in Plastikfolie einschließen.
- Filter in Phosphorimager bei –80°C mit variablen Zeiten (t1= 5d, t2= 4d) exponieren.
- Strippen der cDNA-Proben vom Atlas-Array.
- 500ml 0,5% SDS im Wasserbad auf 95°C erhitzen.
- Plastik Folie entfernen und Filter sofort in die heiße Lösung geben. Lufttrocknung vermeiden!!!
- 10min inkubieren.
- Lösung von der Heizplatte nehmen und 10min auskühlen lassen.
- Atlas Array herausnehmen und mittels Geigerzähler Effizienz des Strippens überprüfen. Wird noch Radioaktivität festgestellt, Vorgang wiederholen.
- Atlas Array in Waschlösung (2x SSC, 1% SDS) abspülen. Atlas-Filter in Folie bei –20°C lagern. Lufttrocknung (auch teilweise) ist unbedingt zu vermeiden.
- Exposition der Filter auf Imaging Plates der Firma Raytest für je 1h, 5h, 20h und bei Bedarf 2d.
- Auswertung der Arrays erfolgt mittels eines Fuji Phosphorimagers und der AIDA-Array Auswertungssoftware der Firma Raytest.

4.8 Immunhistochemie

Zur Detektion antigener Komponenten in Gewebeschnitten wurden spezifische Antikörper eingesetzt, die mit Enzymen markiert sind.

4.8.1 Gefrierschnitte

- 7µm dicke Schnitte werden mit dem CM1900 Cryostat der Firma Leica angefertigt und für die normale Immunhistochemie für mindestens 2h bei RT luftgetrocknet.
- Der Lufttrocknungsschritt entfällt für die Mikrodissektion.
- Lagern der Schnitte entweder bei –80°C oder direkte Weiterverarbeitung.
- Für die spätere RNA-Extraktion wurden die Glasobjektträger vorher durch 30min Inkubation in Chloroform von Nukleasen gereinigt, oder mehrere Stunden bei 200°C gebacken.

4.8.2 LSAB Immunhistochemie (DAKO)

- Verwendung des "Labelled StreptAvidin Biotin-Kit" (LSAB-Kit) der Firma DAKO.
- Vorteil dieser Methode gegenüber anderen Methoden (z.B. ABC-Methode) ist eine gesteigerte Sensitivität durch die verstärkende Wirkung eines biotinylierten Brückenantikörpers an den Primärantikörper. (Siehe Abb.4.8)



Abb.4.8: Technik der LSAB-Methode (DAKO)

- Diesem Schritt folgt eine Inkubation mit einem StreptAvidin-Peroxidase-Konjugat, das durch die Reaktion mit einem Substratchromogen (hier DAB 3', 3'- Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid) angefärbt wird.
- Als Gegenfärbung zur besseren Kenntlichmachung der antikörpergefärbten Bereiche wird eine Hämatoxylin Gegenfärbung eingesetzt.
- Die verschiedenen Primärantikörper und ihre Bedingungen sind im Materialteil aufgeführt.
- Der LSAB Kit wurde nach Angaben des Herstellers eingesetzt.
- Fixieren für 10min in Aceton oder Aceton/Methanol 1:1 bei –20°C
- Fixiermedium abdampfen lassen und Schnitt in ddH₂O äquilibrieren.

- Nach dem Aufziehen auf Shandon Histoslides mit der Antikörperfärbung beginnen.
- Folgende Reagentien der Firma DAKO wurden zusätzlich verwendet:
- DAKO Biotin Blockierungs System (Blocken der endogenen Biotinaktivität)
- DAKO Peroxidase Blockierungs System (Blocken der endogenen Peroxidase Aktivität)
- DAKO Proteinblock Serum-free (Blocken der unspezifischen Bindungsstellen)
- DAKO Antibody Diluent (Verdünnung der Primärantikörper)
- DAB-Chromogen Tabletten (Substratchromogen)
- Nach der DAB Färbung erfolgte eine Hämatoxylin Gegenfärbung für 30sec in Meyers Hämatoxylin III.
- Die blaue Farbreaktion erfolgte durch Bläuen unter fließendem Wasser für 7min.

4.8.3 Envision[™] IHC für Mikrodissektion (DAKO)



Abb.4.9: Envision Technologie (DAKO)

Die Envision Technologie (Abb. 4.9) bindet eine große Anzahl von Molekülen an ein Dextranrückgrat und ermöglicht somit die:

- Verkürzung der Zeit für die Immunhistochemie von 2 ¹/₂h auf unter 15min.
- Verstärkung des IHC Ergebnisses. •
- Schonende Behandlung der RNA (bei zusätzlichen Vorsichtsmaßnahmen, wie RNasin-Verwendung in allen wäßrigen Schritten).

a.) IHC für DNA-Extraktion

- Schnitte direkt nach dem Schneiden in einem Falconröhrchen auf Trockeneis lagern und bei –80°C aufbewahren. (Ohne Lufttrocknung)
- OT vor der immunhistochemischen Färbung direkt in 70% Ethanol überführen, ohne vorheriges Auftauen.
- 10min in Aceton bzw. Aceton-Methanol 1:1 fixieren. Ohne vorheriges Lufttrocknen direkt in H₂O waschen.
- Auf Slide aufziehen und laut Envision Protokoll weiterbearbeiten.

- Nach dem Bläuen direkt, ohne Lufttrocknung in Ethanol-Reihe (70%, 90%, 100% Ethanol) überführen, jeweils eine Minute inkubieren. Anschließend 5min in Xylol entwässern.
- Lufttrocknen und mikrodissektionieren.

b.) IHC für RNA-Extraktion

- Bei allen wäßrigen Schritten 1µl/100µl RNasin zugeben!!!
- Slide in Aceton 2min bei –20°C fixieren.
- In 1x TBS schwenken (RNase freie Küvette benutzen!).
- 5min mit Primärantikörper inkubieren. (Primärantikörper in DAKO-Antibody-Diluent verdünnt).
- In 1x TBS schwenken (RNase freie Küvette benutzen!).
- 3min in DAKO-Envision Lösung inkubieren.
- In 1x TBS schwenken.
- 2,5min in DAB Substratlösung (in TBS gelöstes DAB) inkubieren, wieder in TBS waschen.
- In 1x TBS schwenken.
- Mit Hämatoxylin 30sec gegenfärben.
- In Alkoholreihe (70%, 90% 100%, Xylol) überführen.

5. Ergebnisse

Der Ergebnisteil gliedert sich gemäß der Ansätze, mit deren Hilfe die zwei unterschiedlichen Gruppen histologisch charakterisiert werden sollten, in unterschiedlich Teile. Zu Beginn soll jedoch eine tabellarische Übersicht aller erfolgten Untersuchungen gegeben werden (Tabelle 5.1). Voraussetzung für alle molekulargenetischen und immunhistochemischen Untersuchungen war die Anfertigung von Kryoschnitten, sowie die Isolation und Aufreinigung der Nukleinsäuren und zum Teil die Isolation von DNA aus Lymphozyten einiger der Patienten.

	Mut	ationsanalyse					
Tumor	Exon 10	1- Promotor 1-	Promotor 1-4 LOH-Analysen CGH IHC cDNA-Subtraktion				
			Stromareiche Wilms	Tumoren			
AB (9200)			Х		х		х
AV (9318)			Х				х
AW (9362)			Х		х		
DAB (9561)			Х				
DE (9193)			х		х		
DT (9177)			Х				
JHB (9422)			Х	Х	х		
JLH (9394)			Х				
KE (9501)			Х		х		
LB (9184)			Х		х		
MAM (9288)			Х				
MD37			Х		х		
SF (HDWT1)			Х		х		х
AF (9122)	х	Х	Х				
CO (9345)	Х	х	Х		х		х
FG (9168)	Х	Х	Х		х	Х	х
JHA (9553)	х	Х	Х		х		
KZ (9094)	х	Х	Х		х		
MHU (9600)	Х	Х	Х		х		
MR (9545)	Х	Х	Х		х		
MVS	х	Х	Х		х		
PL (9474)	Х	Х	Х		х		
SAD (9476)	х	Х	Х		х		
SeS (9596)	х	Х	Х	Х	х		Х
TK (HDWT4)	х	Х	Х		х		
UH (9310)	х	Х	Х		х		
JB			Х				
MATS			Х				
NB	х	Х	Х		х	Х	
SH			Х				
SK			Х				
SJT			Х				
SR			Х				

Tab. 5.1: Übersicht über die durchgeführten Untersuchungen

5.1 Mutationsscreening

Zu Beginn der Untersuchungen war bekannt, daß Wilms Tumoren eine histologische Heterogenität aufweisen und daß eine Mutation des *WT1-*Gens nur in 10% bis15% der Fälle auftritt. Aufgrund der Untersuchung von 62 Tumoren in der Arbeitsgruppe Royer-Pokora (Schumacher, Schneider et al. 1997) war davon auszugehen, daß hauptsächlich Tumoren mit stromareicher Histologie eine Mutation im *WT1-*Gen aufweisen. Hier sollte an weiteren Proben bestätigt werden, daß die blastemreiche Unterklasse weniger Mutationen im *WT1-*Gen aufweist. In diesen Tumoren sollten außerdem die weiteren Faktoren analysiert werden, die zum Entstehen eines Wilms Tumors führen.

Dazu wurde als erster Schritt ein Mutationsscreening an 14 blastemreichen und zwei triphasischen Wilms Tumoren durchgeführt.

Für die weiteren Analysen wurde diese Untersuchungsgruppe mit den stromareichen Tumoren des Patientenkollektivs verglichen und beide Gruppen wurden weiteren Untersuchungen unterzogen. Die Mutationsanalyse der stromareichen Wilms Tumoren wurden im Rahmen zweier Diplomarbeiten und einer Promotion angefertigt (Schneider 1994; Figge 1995; Schumacher 1995), einige der immunhistochemischen Analysen wurden im Rahmen der Promotionsarbeit von Frau Dr. Schumacher (Schumacher 1998) angefertigt. Auf diesen Daten bauen weitergehende Analysen auf, die im Rahmen dieser Arbeit angefertigt wurden, deshalb sollen die bisher bekannten Mutationsdaten hier ebenfalls zusammengefaßt werden.

5.1.1 WT1-Mutationsanalyse von Exon 1-10 mit der PCR-SSCP Methode

Die Mutationsanalyse am WT1-Gen wurde mittels nicht radioaktiver PCR/SSCP-Analyse durchgeführt. Dafür wurde zunächst DNA aus pulverisiertem Tumormaterial isoliert, um dann die 10 einzelnen Exons mit spezifischen Primern zu amplifizieren. Die Analyse der PCR-Fragmente erfolgte auf einem 8%igen nativen Polyacrylamidgel. Um ein möglichst großes Spektrum an Mutationen abzudecken, wurde jedes PCR-Fragment mit vier verschiedenen Gelbedingungen untersucht, die zuvor für das Mutationsscreening bei Wilms Tumoren optimiert wurden. Die Unterschiede in den Gelzusammensetzungen bestanden in der Glyzerinkonzentration (2% und 10%) und der Aufteilung des Acrylamid : Bisacryamid Verhältnisses (49:1 bzw. 29:1). Alle auffälligen SSCP-Ergebnisse wurden anschließend durch eine Sequenzierung überprüft. PCR-Artefakte wurden ausgeschlossen, indem zweifelhafte SSCP-Analysen wiederholt wurden (Abbildung 5.1)



Abb. 5.1: Mutationsscreening des WT1-Gens

Das Kollektiv der blastemreichen Tumoren setzte sich aus 6 chemotherapierten und 8 primäroperierten Tumoren zusammen.

Eine Mutation in Exon 1-10 des *WT1*-Gens wurde lediglich bei einem blastemreichen Wilms Tumor gefunden, während in den stromareichen Tumoren eine Mutationshäufigkeit von 62% zu beobachten war (Schumacher, Schneider et al. 1997). Bei den übrigen 13 blastemreichen und 1 triphasischen Tumoren, die im Rahmen dieser Arbeit weiter bearbeitet wurden, konnten keine Mutationen im *WT1*-Gen nachgewiesen werden.

5.1.2 Mutationsscreening der Promotorbereiche



Abb. 5.2 (nach Figge 1995): Übersicht über die Promotorregion und die vorhandenen Polymorphismen

Da in den 13 untersuchten blastemreichen Tumoren in den Bereichen von Exon 1-10 des *WT1*-Gens, außer bei einer Ausnahme (Tumor KZ) keine Mutationen detektiert werden konnte, und das *WT1*-Gen in diesen Tumoren stark exprimiert ist, sollte überprüft werden, ob Mutationen im Bereich des Promotors und eine daraus abzuleitende Fehlregulation der *WT1*-Expression für die Ausbildung eines blastemreichen Phänotyps verantwortlich sein könnten. Um dies zu überprüfen, wurde das oben beschriebene PCR/SSCP-Verfahren auch mit spezifischen Primern für den Promotorbereich der blastemreichen Tumoren angewendet.

Es wurden auch hier keine Mutationen gefunden. Die aufgetretenen Polymorphismen entsprachen, den für diese Bereiche bereits beschriebenen Typen (Figge 1995). Die Tumoren AF, KZ und UH waren für den beschriebenen Polymorphismus in Promotor 4 heterozygot (C ⇔T bei Nukleotid -52). Die Tumoren MHU und KZ, für den in Promotor 2 beschriebenen Polymorphismus (G ▷ C bei Nukleotid -459) und die Tumoren UH und KZ darüber hinaus für den in Promotor 1 beschriebenen Polymorphismus (C ⇔T bei Nukleotid –688). In den übrigen blastemreichen Tumoren wurden keine Polymorphismen in den Promotorbereichen gefunden, die Sequenz entsprach der publizierten (Hofman 1993) und in der Genom-Datenbank des Baylor College (http://www.hgsc.bcm.tmc.edu/SearchLauncher) zu findenden Sequenz. Eine schematische Übersicht über die Promotorbereiche und die möglichen Polymorphismen ist in Abb. 5.2 dargestellt.

Abbildung 5.3 zeigt exemplarische das Gelbild einer SSCP Analyse von Promotor 2, bei der in zwei Tumoren Polymorphismen zu erkennen sind. Die Tumoren FG, UH, CO, PL, MR, SeS sowie die Kontroll DNA SL zeigen die Bandenkonformation der homozygoten Sequenz. Bei den Tumoren MHU und KZ ist jeweils eine zusätzliche Bande zu erkennen, die sich aus dem heterozygoten Genotyp ergibt.



Abb.5.3: SSCP-Analyse von Promotor 2, der Patienten FG, UH, CO, PL, MHU, MR, SeS, KZ und einer Kontrolle (SL). Bei den Patienten MHU und KZ ist bei diesen Gelbedingungen (2% Glyzerin; 29:1 Acrylamid:Bisacrylamid) eine zusätzliche Bande zu erkennen. Die Patienten FG, UH, CO, PL, MR, SeS und die Kontrolle sind homozygot, für das RFLP in Promotor 2, die Patienten MHU und KZ sind heterozygot.

5.2 LOH-Analysen

Auf den Chromosomen 1p, 16q (Grundy, Telzerow et al. 1994) und 7p (Bardeesy, Falkoff et al. 1994; Grundy, Pritchard et al. 1998), so wie 22q (Klamt, Schulze et al. 1998) befinden sich weitere Loci, die bei Wilms Tumoren verändert sein können. LOH dieser Loci wurden bisher zwar mit der Klinik der untersuchten Tumoren in Verbindung gebracht (Klamt, Schulze et al. 1998), nicht jedoch mit der Histologie der Tumoren. Um eine eventuelle Verbindung der LOH-Ereignisse in diesen Loci und dem Phänotyp des jeweiligen Tumors zu ermitteln, wurden alle Tumoren, von denen Tumormaterial und Blut oder bereits isolierte DNA aus Tumormaterial und Blut vorhanden war, LOH-Analysen mit 19 verschiedenen CA-Repeat Markern aus den jeweiligen Bereichen unterzogen. Zusätzlich wurden 3 CA-Repeat Marker aus dem Bereich des Chromosoms 11 untersucht. Die Ergebnisse wurden auf dem LiCOR analysiert und mittels des RFLP-Scan Programms der Firma Scanalytics ausgewertet und die Verhältnisse der beiden Allele zueinander wurden mit dem Programm Excel der Firma Microsoft berechnet.

Die Ratios der einzelnen Allele zueinander wurde nach folgender Formel berechnet:

(Allel 1 Kontrolle : Allel 2 Kontrolle)

(Allel 1 Tumor : Allel 2 Tumor)

Um falsch positive LOH-Ergebnisse auszuschließen wurden lediglich die Resultate als positives LOH-Ereignis gewertet, bei denen das Ergebnis der oben genannten Gleichung kleiner als 0,5 ist, und somit die Ratio der Tumorallele um mehr als 1 von der der Kontrollallele abweicht. Ein Beispiel für ein positives LOH-Ereignis ist in Abbildung 5.4 dargestellt, der Tumor DNA des Tumors AB fehlt eindeutig das zweite Allel. Alle LOH-Ereignisse wurden durch Wiederholen der PCR und erneute Evaluierung durch das RFLP-Programm verifiziert.



Abb. 5.4: LOH-Analyse an Tumor AB. links: Blut DNA; rechts Tumor DNA mit LOH. Die Kurve zeigt die Peaks der beiden Allele, der Peak des zweiten Allels fällt in der Tumor DNA deutlich schwächer aus.

Insgesamt wurden in 10 von 19 analysierten Tumoren LOH-Ereignisse gefunden. Auf Chromosom 1p wurde LOH in 3 von 9 stromareichen Tumoren festgestellt (30%), ebenfalls 3 stromareiche Tumoren (30%) zeigten LOH in allen 3 untersuchten Loci auf Chromosom 11. LOH auf Chromosom 16 wurde in 7 von 9 stromareichen (78%) und in jeweils 1 von 4 untersuchten blastemreichen Tumoren, einem von 4 triphasischen und in einem Tumor ohne nähere Subklassifizierung gefunden. Ein blastemreicher und ein triphasischer Tumor zeigten LOH auf den Chromosomen 22 und 7. Auf Chromosom 7 wurden LOH-Ereignisse zusätzlich auch in 4 stromareichen Tumoren (45%) detektiert. In stromareichen Tumoren konnten dabei gleichzeitig sowohl LOH Ereignisse auf Chromosom 1p, 11 und 16 nachgewiesen werden, wie am Beispiel des Tumors SF. Meist beschränkten sich die LOH Ereignisse jedoch auf ein (AW - LOH auf Chromosom 16) oder zwei Chromosomen. (Tumor DAB - LOH auf 1p und 16; Tumor LB - LOH auf 11 und 16). LOH auf Chromosom 11 konnte ausschließlich in stromareichen Tumoren nachgewiesen werden. Eine Ergebnisübersicht der LOH Analysen sind in Tabelle 5.2 dargestellt.

	blastem	reich	ne W	Т	stromareiche WT t					triphasische WT				unbekannte Histologie					
	AF	FG	ΚZ	SeS	AV	AW	DAB	DE	DT	JLH	LB	SF	AB	SK	JB	MATS	SH	SJT	SR
D1 S199			-	-	-	-	+	-	1	1	-	n.i.	n.i.	n.i.	I	-	n.i.	-	n.i.
D1 S449			n.i.	n.i.			n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.		n.i.	n.i.	n.i.		n.i.	n.i.
D1 S2749			-	-	-	n.i.	n.i.	-	-	-	-	n.i.	-	n.i.	n.i.	n.i.	-	n.i.	n.i.
D1 S2781			-	-	-	n.i.	n.i.	-	-	-	n.i.	-	-	-	-	n.i.	n.i.	-	-
D1 S247			n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	+	-	-	I	n.i.	+	n.i.	I	I	n.i.	-	n.i.	n.i.
D1 S201			-	-	n.i.	-	-	+	-	n.i.	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BB 6/7	n.i.	n.i.	-	n.i.	n.i.	-	n.i.	-	-	-	+	+	+	n.i.	-	n.i.	n.i.	-	-
D11 S1318	n.i.	n.i.	-	n.i.	-	-	-	n.i.	n.i.	-	+	+	+	-	1	n.i.	n.i.	-	n.i.
D11 S1323	-	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	-	-	-	n.i.	I	+	+	+	I	I	-	-	-	n.i.
D16 S308	n.i.	n.i.	n.i.	-	n.i.	+	n.i.	n.i.	n.i.	+	-	+	-	-	-	n.i.	n.i.	+	-
D16 S320	n.i.	n.i.	n.i.	+	n.i.	-	-	+	-	n.i.	-	n.i.	-	-	n.i.	-	-	-	-
D16 S408	-	n.i.	n.i.	-	n.i.	n.i.	-	-	-	n.i.	-	-	-	n.i.	-	-	+	n.i.	-
D16 S503			n.i.	+	-	-	-	-	1	1	-	-	-	I	I	n.i.	-	-	-
D16 S400			n.i.	+	n.i.	-	n.i.	n.i.	-	I	-	-	-	I	n.i.	n.i.	-	n.i.	n.i.
D16 S419	-	n.i.	-	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	-	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	-
D16 S508			-	-	-	-	n.i.	+	-	n.i.	+	-	n.i.	n.i.	I	n.i.	-	-	n.i.
D16 S514	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	+	+	+	-	+	+	-	-	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	-
D22 S258	-	-	-	+	n.i.	-	-	-	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	-	-	I	n.i.	+	n.i.	n.i.
D7 S478	n.i.	-	n.i.	+	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	-	-	n.i.		-	-	n.i.	n.i.	+	n.i.	n.i.
D7 S506	n.i.	n.i.	-	n.i.	-	-	+	n.i.	n.i.	-	+	-	+	n.i.	n.i.	n.i.	+	n.i.	n.i.
D7 S510	-	-	-	+	n.i.	-	n.i.	-	-	n.i.	n.i.	+	-	n.i.	-	-	-	-	-
D7 S678	n.i.	n.i.	n.i.	+	n.i.	-	-	-	-	-	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.

Tabelle 5.2: LOH-Analysen von stromareichen, blastemreichen und triphasischen Wilms Tumoren. +: LOH-Ereignis; -: kein LOH-Ereignis; n.i.: nicht informativer Locus; leere Kästchen: aufgrund fehlenden Materials keine Analyse möglich.

5.3 CGH-Analysen an Wilms Tumoren

Um Deletionen oder Amplifikationen im Gesamtgenom von Wilms Tumoren ausfindig zu machen, wurde die Methode der komparativen genomischen Hybridisierung eingesetzt. Ziel dieser Untersuchung war es, die histologischen Subklassen auf chromosomale Veränderungen hin zu untersuchen. Die CGH ermöglicht eine Untersuchung von soliden Tumoren auf cytogenetischer Ebene, bei der Deletionen und Amplifikationen lokalisiert werden können. Die Schwierigkeiten bei der cytogenetischen Analyse solider Tumoren, die durch die Tatsache entstehen, daß die zu untersuchenden Zellen sich nur äußerst schwer, wenn überhaupt, in Kultur nehmen lassen, werden durch die Analysemethode umgangen. Hierbei wird die DNA direkt aus dem Tumor isoliert und auf Chromosomenpräparaten aus Lymphozyten einer Kontrollperson hybridisiert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Etablierung der CGH-Methode durchgeführt, in der diverse Bedingungen der einzelnen Teilschritte ausgetestet werden mußten. Dafür wurden unterschiedliche Protokolle verwendet und neu zusammengestellt. Im Folgenden werden die Ergebnisse einiger Testbedingungen aufgeführt. Die hohe Zeitintensität und der Aufwand dieser Methode, vor allem der cytogenetischen Auswertung, führte dazu, daß in dieser Arbeit zwar einige CGH-Analysen durchgeführt wurden, aber eine vergleichende Untersuchung des Patientenkollektivs nicht zu Ende gebracht werden konnte. Da die Etablierung der Methode jedoch für weitere Untersuchungen verwendet werden soll, werden die Ergebnisse der für ihre Etablierung notwendigen Schritte und eines als Beispiel analysierten Tumors hier dargestellt.

Die für eine erfolgreiche Durchführung der CGH wichtigen Schritte teilen sich in drei Teile auf. Zum Ersten die Herstellung geeigneter Chromosomenpräparate einer Kontrollperson, zum Zweiten eine gleichmäßige deutliche Markierung der Tumor und der Kontroll DNA und zum Dritten eine gleichmäßige Hybridisierung auf den Kontrollchromosomen.

5.3.1 Herstellung von Metaphasenpräparaten aus Lymphozytenzellkulturen

Bei der Herstellung von Metaphasenpräparaten ist es besonders wichtig, eine ausreichende Menge an möglichst gut gespreiteten Metaphasen im Hybridisierungsfeld zu haben, die von einer mittleren Länge sein sollten, außerdem sollte es zu keinen größeren Überlappungen unterschiedlicher Chromosomen kommen, da solche Chromosomen nicht auswertbar sind. Ein weiterer wichtiger Punkt ist die Sauberkeit des Präparates. Verunreinigung durch Cytoplasma führt zu einer verminderten Zugänglichkeit der Probe zu der DNA in den Chromosomen, was eine schlechtere Hybridisierung zur Folge hat.

Nicht alle Lymphozyten eignen sich zur Herstellung von CGH-Chromosomenpräparaten. Es wurde daher eine Testreihe mit Blutproben von 5 Kontrollpersonen (3 männliche und 2 weibliche) durchgeführt, aus denen Lymphozytenkulturen hergestellt wurden.

Das Ziel dieser Testreihe war es, die bestmögliche Kombination aus der Präparatreinheit, Spreitung und der zu gewinnenden Menge an Chromosomenpräparaten zu ermitteln. Die Kulturbedingungen waren für alle Proben gleich. Eine Übersicht über die Ergebnisse der Chromosomenpräparation ist in Tabelle 5.3 dargestellt.

Testperson	Lymphozyten	ideale Präparations-	Chromosomen	Reinheit des		
	Ertrag	bedingungen	Spreitung	Präparates		
w1 (SS)	+	4°C / Trocknen über Dampf	-	~		
w2 (VS)	~	4°C / Trocknen über Dampf	~	~		
m1 (CS)	~	4°C / Trocknen über Dampf	+	+		
m2 (DT)	++	4°C / Trocknen über Dampf	++	+		
m3 (YO)	+	4°C / Trocknen über Dampf	+	-		

Tabelle 5.3: Übersicht über die Ergebnisse der Chromosomenpräparation für CGH. ++: sehr gutes Ergebnis; +: gutes Ergebnis; ~: noch bedingt verwertbares Ergebnis; -schlechtes Ergebnis. w: weiblich; m: männlich

Als ideale Bedingung für die Chromosomenpräparation stellte sich ein Auftropfen auf einen feuchten, gekühlten Objektträger mit anschließender Trocknung über einem Wasserbad bei 70°C heraus. Durch das verlangsamte Antrocknen der
Chromosomen im Wasserdampf wurde die bestmögliche Spreitung bei geringer Cytoplasmaverunreinigung erzielt.

Zusätzlich zu den selbst hergestellten Chromosomenpräparaten wurden vergleichsweise kommerziell erhältliche Präparate der Firma Vysis ausgetestet. Die Anzahl der Metaphasen im Hybridisierungsfeld war zwar höher als der der selbst hergestellten Präparate, ansonsten konnte jedoch kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

5.3.2 Markierung der Tumor und Kontroll DNA

Für die Markierung der DNA zur späteren Unterscheidung der Tumor und der Kontroll DNA gibt es zwei grundlegende Praktiken. Die erste Methode beinhaltet eine Markierung der DNA mit Digoxigenin (Kontroll DNA) und Biotin (Tumor DNA) und eine an die Hybridisierung anschließende Detektion der unterschiedlichen DNAs mit mehreren Antikörperschritten, bei denen der letzte Antikörper fluoreszenzmarkiert ist. Bei der zweiten Methode werden die DNA-Proben direkt mit fluoreszenzmarkierten Nukleotiden markiert und dann auf die Kontrollchromosomen hybridisiert. Auf die Hybridisierung folgt lediglich ein Schritt, in dem die überflüssige Fluoreszenz und unspezifisch hybridisierte Fragmente ausgewaschen werden. Zusätzlich werden in beiden Methoden die markierten DNA-Fragmente durch einen DNase Verdau auf eine Länge gebracht, die eine Hybridisierung ermöglicht.

Die Überprüfung der erfolgreichen Markierung der DNA bei der ersten Methode ist nicht überprüfbar, nur der DNase-Verdau kann überprüft werden. Eine Überprüfung des Einbaus von Digoxigenin und Biotin durch die Nick Translation ist durch einen Auftrag auf ein Agarosegel nicht nachzuweisen. Die direkte Markierung der DNA über kann die Fluoreszenz des **FITC-Farbstoffes** auf einem nicht ethidiumbromidhaltigen (EtBr) Agarosegel überprüft werden. Nach einer anschließenden EtBr-Färbung erfolgt ein Vergleich der beiden Bilder. In Abbildung 5.5 sind im Vergleich eine gute und eine schlechte Markierung dargestellt.

Bei einer erfolgreichen Markierung muß das Gelbild ohne Ethidiumbromid mit dem nach der erfolgten Ethidiumbromidfärbung übereinstimmen. Die Färbung durch den Fluoreszenzfarbstoff sollte also nicht deutlich schwächer sein, als die Fluoreszenz durch die Interkalation des EtBr in die DNA-Helix. Der sichtbare Schmier erscheint dabei im Gegensatz zu den stark leuchtenden Nukleotiden (auf dem Gelbild als helle Punkte am unteren Ende des Schmiers zu erkennen) relativ schwach, das ergibt sich jedoch lediglich als Folge der Eigenfluoreszenz der Nukleotide im Zusammenhang mit der Aufnahmetechnik bei der Erstellung der Abbildung und hat keinen negativen Einfluß auf das Hybridisierungsergebnis.



Abb. 5.5: Vergleich einer erfolgreichen Markierung durch Nick Translation mit einer nicht erfolgreichen Markierung. Der Schmier der FITC-markierten Kontroll DNA sollte gleichmäßig sein und in Stärke und Größe etwa mit dem nach der EtBr-Färbung übereinstimmen. EtBr: Ethidiumbromid; FITC: grüner Fluoreszenzfarbstoff; TRITC: roter Fluoreszenzfarbstoff.

5.3.3 Fällung und Denaturierung der DNA-Probe

Die Fällung der DNA erfolgt in jedem Fall unabhängig von der Art der Markierung zusammen mit Cot1 DNA (also angereicherten repetitiven Sequenzen die aus humaner Plazenta gewonnen wurden), um die repetitiven Sequenzen der Tumorund der Chromosomen-DNA abzublocken. Bei der indirekten Markierung mit Digoxigenin/Biotin, wurde zusätzlich Lachssperma DNA hinzugegeben. Bei der direkten Markierung wurde die Fällung unter Zugabe von Glycogen und ohne Glycogen ausgetestet. Das beste Hybridisierungsergebnis wurde bei der direkten Markierung und einer Fällung der DNA in Anwesenheit von Glycogen erzielt.

Die Resuspendierung der DNA nach der Fällung erfolgte wieder in allen Fällen gleich, durch Zugabe von deionisiertem Formamid in einem Puffer aus Dextransulfat und SSC bei 37°C und anschließender Denaturierung für 5min bei 75°C.

Zur Absättigung der repetitiven Sequenzen wurden zwei unterschiedliche Ansätze miteinander Verglichen. Im ersten Ansatz erfolgte eine an die Denaturierung anschließende Preannealingphase für 1h bei 37°C; im zweiten Ansatz wurde die Resuspendierungsphase auf mindestens 1h verlängert und erst dann erfolgte die Denaturierung, mit direkt anschließender Hybridisierung. Der zweite Ansatz brachte die besseren Hybridisierungsergebnisse. Die genaue Übersicht der unterschiedlichen Testansätze ist im Methodenteil dargestellt.

5.3.4 Vorbehandlung der Chromosomenpräparate

Um eine optimale Aufbereitung und Reinheit der Chromosomenpräparate zu gewährleisten, wurden unterschiedliche Vorbereitungsschritte ausgetestet.

Für die Vorbereitung der Metaphasenpräparate werden von den verschiedenen Protokollen, die als Quellen für diese Arbeit herangezogen wurden, vor der Denaturierung der Chromosomen, verschiedentlich ein RNase-Schritt und ein Pepsin-Verdau zur Verminderung des Hintergrundes vorgeschlagen. In vergleichenden Beobachtungen konnte jedoch keine signifikante Hintergrundreduktion durch die Anwendung dieser Schritte festgestellt werden. Für das endgültige Protokoll wurden diese Schritte deshalb ausgelassen. Für die kommerziell erhältlichen Chromosomenpräparate der Firma Vysis wird von den erwähnten Vorbehandlungen sogar abgeraten, da sie das CGH-Ergebnis beeinträchtigen könnten.

Sehr wichtig für eine erfolgreiche CGH-Analyse ist die richtige Chromosomendenaturierung. Bei zu gering denaturierten Präparaten kommt es zu einer starken Abschwächung des Fluoreszenzsignals aufgrund der verminderten Zugänglichkeit der Chromosomen DNA für die Hybridisierung. Bei zu stark denaturierten Chromosomen wird das Fluoreszenzbild undeutlich, da die Randbereiche der Chromosomen verwaschen.

Die Denaturierung kann außerdem durch unterschiedliche Applikationsmethoden des Formamids (FA) erfolgen. Die erste Methode sieht eine Denaturierung in einer mit

75

70%FA / 2xSSC gefüllten Küvette bei 72°C vor, die zweite Applikationsmethode erfolgt durch Auftropfen der FA-Lösung ebenfalls bei 72°C. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, daß die Applikationsmethode für das Ergebnis zweitrangig oder sogar vernachlässigbar war. Wichtig ist die Einhaltung der Temperatur und der richtigen Zeit. Eine Übersicht der Ergebnisse bei unterschiedlichen Denaturierungsbedingungen ist in Tabelle 5.4 dargestellt.

Präparat	Zeit (min)	Bedingung	Ergebnis
DT	1,5	70% FA/SSC Küvette	schwach, hohe Hintergrundrate
DT	3	70% FA/SSC Auftropfen	gute Hybridisierung
DT	3	70% FA/SSC Küvette	gute Hybridisierung
DT	5	70% FA/SSC Auftropfen	verwaschenes Chromosomenbild
Vysis	5	70% FA/SSC Auftropfen	gute Hybridisierung

Tab. 5.4: Übersicht über den Effekt unterschiedlicher Denaturierungsbedingungen auf CGH-Ergebnisse verschiedener Präparate

5.3.5 Flow-Chart der optimalen Bedingungen für eine CGH-Analyse



5.3.6 CGH-Auswertung

Zur Auswertung der CGH werden die Intensitäten des roten und des grünen Fluoreszenzfarbstoffes gemessen und per Computer in Relation zueinander gebracht. Eine chromosomale Aberration ist daran zu erkennen, daß die Kurve des CGH-Profils zu einer Seite über den Schwellenwert abweicht. Eine Abweichung in Richtung des grünen Bereichs bedeutet dabei einen Gewinn an Tumormaterial und eine Abweichung in Richtung des roten Bereichs einen Chromosomenverlust. In Abbildung 5.6 ist ein Beispiel für ein CGH-Profil abgebildet, in dem hier untersuchten Tumor DE konnte keine Abweichung gefunden werden. Abweichungen im Bereich des Heterochromatins, wie hier beim Y-Chromosom zu sehen, kommen auch in den Telomerbereichen der Chromosomen in dieser Methode häufig vor und sind meist Artefakte.



Abb. 5.6:Beispiel eines CGH-Profils anhand der Darstellung der Analyse des Tumors DE. Schwellenwert links \Rightarrow Chromosomenverlust; Schwellenwert rechts \Rightarrow Gewinn an Chromosomenmaterial.

5.4 Immunhistochemische Analysen

Es wurden Antikörper gegen unterschiedliche Proteine verwendet, die entweder aufgrund ihrer Expression in Bezug auf die Einordnung der Entwicklungsstadien der Zellen im Tumor, oder aufgrund ihrer Funktion als Tumormarker bzw. Chemotherapieresistenz- oder Apoptosemarker ausgewählt wurden. Die genauen Fixierungsbedingungen und Verdünnungen der einzelnen Antikörper sind im Materialteil dieser Arbeit im Einzelnen näher Beschrieben. Die einzelnen Funktionen der Proteine sind im Folgenden charakterisiert:

Collagen-I: Faseriges Protein der extrazellulären Matrix. Bestandteil von Knorpel und lockerem Bindegewebe. Expression in der Nierenentwicklung im Stadium der Stammzellbildung.

Collagen-IV: Hauptbestandteil der Basalmembran, Expression in der Nierenentwicklung erst zu Beginn der epithelialen Kondensierung vor der Bildung der S-förmigen Körperchen.

Fibronectin: Fibrilläres Protein der extrazellulären Matrix. Fibronectin dient zur Aufrechterhaltug der Zelladhäsion zwischen unterschiedlichen Gewebekomponenten.

Vimentin: Intermediärfilament, das charakteristisch ist für Zellen mesenchymaler Herkunft. Expression in uninduziertem Mesenchym, Stammzellen und Podozyten der Glomeruli (Holthofer, Miettinen et al. 1984).

Laminin A: Wichtiges Protein der Basalmembran. Expression durch epitheliale und endotheliale Zellen sowie durch Zellen der glatten Muskulatur.

Desmin: Intermediärfilament der quergestreiften Muskulatur, sowie der Herz und glatten Muskulatur.

Cytokeratin: Intermediärfilament, das charakteristisch für epitheliale Zellen ist. Expression in der Ureterknospe, in einem Stadium zwischen dem Beginn der Kondensation des Mesenchyms und der Bildung der S-förmigen Körperchen. Spätere Expression im Nephron außer im Glomerulus und in Parietalzellen der Bowmann'schen Kapsel (Holthofer, Miettinen et al. 1984).

BCI-2: Protoonkogen, das die Apoptose hemmt und die Zellproliferation fördert. Die Expression erfolgt vor allem im kondensierten Mesenchym. Sobald die Zellen in Epithel differenzieren, erfolgt eine Herunterregulation der Expression. Spätere Expression fast nur noch in den Tubuli der Nephrone (LeBrun, Warnke et al. 1993). BCI-2 wird in vitro von WT1 gehemmt (Hewitt, Kessler et al. 1996).

IGF II: Wachstumsfaktor, mit starker Expression im uninduzierten und induzierten Blastem während der Kondensation um die Ureterknospe. Reduktion der Expression erfolgt mit Beginn der Epitheldifferenzierung. Geringe weitere Expression nur noch in Podozyten, Tubulusepithel und etwas höhere Expression im Stroma (Matsell, Delhanty et al. 1994). *IGF II* ist ein geprägtes Gen, dessen Expression in den meisten Fällen nur vom paternalen Allel erfolgt. In WT häufig Überexpression (Drummond, Madden et al. 1992)

p53: Onkogen, dessen Beteiligung zu den häufigsten Wirkmechanismen bei der Entstehung maligner Veränderungen gezählt wird. Überexpression oder Mutationen von *p53* konnten bisher nicht mit benignen Veränderungen assoziiert werden. Das Protein wird erst immunhistochemisch nachweisbar, wenn eine Mutation vorliegt, da die normale Form zu instabil ist.

MDR1: Protein, dessen Überexpression häufig in Verbindung mit Resistenz gegen multiple Chemotherapeutika in Verbindung gebracht wird.

WT1: Transkriptionsfaktor der Zink-Finger Familie; Expression im uninduzierten Mesenchym der Niere, später Expression nur noch in Podozyten, der Nierenglomeruli.

5.4.1 Entwicklungsbiologische Einordnung von Stroma und Blastem

Zur weiteren Charakterisierung und Unterscheidung der Untersuchungsgruppen der blastemreichen und stromareichen Tumoren sollte die Proteinexpression im Gewebe geprüft werden. Auch die entwicklungsbiologische Einordnung der Gewebearten "Stroma" und Blastem war ein Ziel der Arbeit. Zu diesem Zweck wurde eine immunhistochemische Antikörperfärbung von Gewebeschnitten beider Gruppen angefertigt. Stromareiche und blastemreiche Tumoren wurden zu diesem Zweck mit entwicklungsstadiumspezifischen Antikörpern untersucht, eine Übersicht über die Expression dieser Antikörper während der normalen Nierenentwicklung ist in Tabelle 5.5 dargestellt.

Antikörper	Uninduziertes MM	Stammzellen	Cond-S
Collagen I	+	+	-
Collagen IV	-	-	+
Fibronectin	+	+	-
Vimentin	+	+	-
Laminin	-	-	+
Desmin	-	-	-
WT1	+	+	+

Tab. 5.5: Proteinexpression während der Nierenentwicklung (nach Kidney Development Database 2001 http://golgi.ana.ed.ac.uk/kidhome.html): Uninduziertes MM: Metanephrogenes Mesenchym, das noch nicht von der Ureterknospe induziert wurde; Stammzellen: Zellen einen Schritt nach der Induktion durch die Ureterknospe in sehr jungen Nieren, oder im Cortex älterer Nieren; Cond-S: Alle Stadien von der präepitheliogenen Kondensation bis zu den S-Shaped epitheliogenen Tubuli.

Die blastemreichen und triphasischen Tumoren zeigten deutlich Zellbereiche, in denen WT1 positive Blastemzellen in Clustern vorkommen, diese werden im folgenden Blastemnester genannt. Die stromareichen Tumoren sind WT1 negativ (siehe Abbildung 5.8).



Abb. 5.8: Antikörperfärbung mit WT1 Antikörper bei verschiedenen Tumortypen, bei blastemreichen und triphasischen Tumoren sind deutlich Blastemnester zu erkennen, der stromareiche Tumor ist WT1 negativ

Die stromareichen Tumoren mit *WT1*-Mutation zeigen eine Muskeldifferenzierung (Abbildung 5.9) und damit einhergehend eine positive Immunreaktion mit dem Desmin Antikörper (Schumacher 1998).



Abb. 5.9: Immunhistochemische Färbung mit Desmin Antikörper. Die stromareichen Tumoren mit WT1 Mutation zeigen aufgrund ihrer Muskeldifferenzierung deutlich eine Immunreaktion mit dem Antikörper.

Die Antikörper gegen das WT1 Protein und gegen Desmin konnten zur besseren Kenntlichmachung der zu betrachtenden Zellen eingesetzt werden, da alle Blastemzellen WT1 positiv waren und in den stromareichen Tumoren mit *WT1*-Mutation nur die Zellen betrachtet werden sollten, die eine Muskeldifferenzierung zeigten und daher Desmin positiv waren. Zu diesem Zweck wurden Serienschnitte angefertigt und mit den jeweiligen Antikörpern angefärbt (stromareiche Tumoren mit Desmin und blastemreiche Tumoren mit WT1), es wurden im Folgenden nur die Zellen betrachtet, die entweder mit Desmin oder WT1 zu einer positiven immunhistochemischen Reaktion führten. Die Ergebnisse der entwicklungsbiologischen Charakterisierung der Zellen sind in Tabelle 5.6 dargestellt.

Tumoren	VV I 1	Desmin	Collagen I	Collagen IV	vimentin	A	Fibronectin
			str	omareiche Tu	umoren		
LB (9184)	-	+	+	+	+	+	+
AB (9200)	-	+	-	+	+	+	+
SF (9385)	-	+	-	+	+	+	+
KE	-	+	-	+	+	+	+
AW	-	+	-	+	+	+	+
MD 37	-	+	-	+	+	+	+
DE	-	+	+	+	+	+	+
JHB	-	+	-	+	+	+	+
			bla	stemreiche T	umoren		
CO (1345)	+	-	-	-	+	-	-
UH	+	-	-	-	+	+	+
MR (9545)	+	-	-	-	+	-	-
FG (9168)	+	-	-	-	+	-	-
ТК	+	-	-	-	+	-	-
KZ	+	-	-	-	+	-	-
SAD	+	-	-	-	+	-	-
JHA	+	-	-	-	+	-	-
MHU	+	-	-	-	+	-	-
PL (9474)	+	-	-	-	+	-	-
SeS (9254)	+	-	-	-	+	-	-
MVS	+	-	-	-	+	-	-

1 14/17 4

Tabelle 5.6: Immunhistochemische Einordnung der entwicklungsbiologischen Stadien von Stromazellen und Blastemzellen.

Die Abbildung 5.10 zeigt eine immunhistochemische Analyse an dem stromareichen Tumor JHB in einer Folge von Serienschnitten. Die Antikörper gegen Desmin, Collagen IV, Vimentin und Laminin zeigen eine positive Reaktion innerhalb der myogen differenzierten Zellen, während die Antikörper gegen Collagen I und WT1 zu keiner Färbung dieser Zellen führen. Der Collagen I Antikörper zeigt hingegen ein genaues Negativbild zu der Färbung des Collagen IV Antikörpers. Die myogen differenzierten Zellen (Desmin positive Zellen) sind nicht angefärbt, das umgebende Gewebe ist aber unverkennbar positiv. Der Antikörper gegen Fibronectin zeigt eine deutliche Färbung im Bereich der Zellmembran der Desmin positiven Stromazellen, eine definitive Aussage, ob das Fibronectin aus der Zelle selber oder aus dem umgebenden Bindegewebe stammt und sich nur an der Zellmembran anlagert, kann jedoch nur immunelektronenmikroskopisch geklärt werden (persönliche Mitteilung Dr. Leuschner).



Abb. 5.10 : Immunhistochemie an dem stromareichen Tumor JHB

Eine weitere Schnittserie ist in Abbildung 5.11 für den blastemreichen Tumor CO dargestellt. Die Blastemzellen liegen in diesem Tumor gut erkennbar und vom umgebenden Gewebe abgrenzbar in sogenannten Blastemnestern vor. Für die Auswertung werden jeweils nur die Antikörperreaktionen der Zellen in den Nestern betrachtet, da diese WT1 positiv sind. In diesen Zellen zeigt der Antikörper gegen Vimentin eine Färbung, während die Reaktion mit den Antikörpern gegen Fibronectin, Collagen IV, Collagen I, Laminin und Fibronectin keine Färbung der Blastemzellen aufweisen. Die Färbung für Vimentin liegt ebenso, wie die für Fibronectin bei dem vorher betrachteten Tumor am Rand der Zellen, was eine nähere Betrachtung der Zellen für eine eindeutige Aussage bezüglich der Anfärbung notwendig machen würde.



Abb. 5.11: Immunhistochemie an dem blastemreichen Tumor CO.

5.4.2 Weitere entwicklungsbiologische Klassifizierung von blastemreichen Tumoren mit Cytokeratin

Als weiterer Differenzierungsmarker innerhalb der Blastemzellen wurde die Expression von Cytokeratin untersucht. Um sicherzustellen, daß wirklich die Blastemzellen untersucht wurden, erfolgten die Antikörperfärbungen an Serienschnitten, von denen jeweils einer mit einem Antikörper gegen das WT1 Protein angefärbt wurde. In der Folge wurden nur die Bereiche der Zellen betrachtet, die im ersten Schnitt mit dem WT1 Antikörper eine positive immunhistochemische Reaktion gezeigt hatten. Zusätzlich wurde dieses Ergebnis jedoch mit der vorhergegangenen Behandlung des jeweiligen Tumors in Verbindung gebracht. Es wurde also eine Unterscheidung zwischen primäroperierten Tumoren und solchen mit vorangegangener Chemotherapie gemacht. Eine Ergebnisübersicht ist in Tabelle 5.7 dargestellt.

Tumoren	Behandlung des Tumors	WT 1	Cytokeratin
CO (1345)	Chemotherapie	+	+
UH	primäroperiert	+	-
MR (9545)	primäroperiert	+	+
FG (9168)	primäroperiert	+	-
тк	Chemotherapie	+	+
KZ	Chemotherapie	+	+
SAD	primäroperiert	+	-
JHA	primäroperiert	+	+/-
MHU	primäroperiert	+	+
PL (9474)	Chemotherapie	+	-
SeS (9254)	primäroperiert	+	+

Tab. 5.7: Übersicht über die Ergebnisse der immunhistochemische Analyse des Differenzierungsmarkers Cytokeratin in blastemreichen Tumoren.

In Abbildung 5.12 ist ein Beispiel für die nicht einheitliche Expression von Cytokeratin innerhalb der Gruppe der blastemreichen Tumoren dargestellt. Tumor CO zeigt eine deutliche Reaktion mit dem Cytokeratin Antikörper, während sie bei Tumor UH nicht so eindeutig ausfällt.



Abb. 5.12: Immunhistochemische Analvse des Cvtokeratin-Antikörpers in blastemreichen Tumoren

5.4.3 Immunhistochemische Analysen von chemotherapieresistenz- und apoptoseassoziierten Proteinen in blastemreichen Tumoren

Die Blastemzellen der blastemreichen Tumoren wurden zusätzlich mit einer Reihe von Antikörpern gegen chemotherapie- und apoptoseassoziierte Proteine untersucht, um mögliche Rückschlüsse auf die Wirkmechanismen dieser Proteine bei der Entstehung der Chemotherapieresistenz dieser Tumoren zu ziehen. Hier wurden ebenso, wie in den vorherigen Untersuchungen nur die Blastemzellen, also die WT1 positiven Zellen untersucht. Für diese Untersuchungen wurden die Proteine BCI-2 und IGF II, betrachtet, da sie schon in vorhergegangenen Untersuchungen (Schumacher, Scharer et al. 1998) deutliche Assoziationen zu einer Verminderung der Chemotherapiesensitivität und der Apoptose gezeigt hatten. Das desweiteren untersuchte Protein p53 ist mit dem gewählten Antikörper erst immunhistochemisch nachzuweisen, wenn es in einer mutierten Form vorliegt, da es ansonsten zu instabil ist. Die Mutation von p53 wird in anaplastischen Wilms Tumoren mit einer schlechten Prognose verbunden. Eine Übersicht über die Ergebnisse dieser Analyse ist in Tabelle 5.8 dargestellt.

Tumoren	WT1	BCI-2	IGF II	P 53	MDR 1
CO (1345)	+	+	+	+/-	*/-
UH	+	-	+		
MR (9545)	+	-	-	+/-	+
FG (9168)	+	-	-		
тк	+	+	+	+/-	+&-
KZ	+	+	+	+/-	+/-
SAD	+	+/-	+	+	+
JHA	+	+	+		
MHU	+	-	+	?	?
PL (9474)	+	+/-	+	+	+
SeS (9254)	+	+&-	+	+	+
MVS	+	+	+	-	-

Tab. 5.8: Übersicht über die Ergebnisse der immunhistochemischen Analyse apoptose- und chemotherapieresistenzassoziierter Proteine in blastemreichen Tumoren.

Die Expression von BCI-2 ist in einigen blastemreichen Tumoren klar zu erkennen, tritt in anderen aber nicht auf. Das gleiche Ergebnis zeigt sich auch bei stromareichen Tumoren. Ähnlich, wenn auch nicht ganz so eindeutig verhält es sich auch mit der IGF II Antikörperfärbung. Bei einigen Tumoren ist eine eindeutigen IGF II Färbung erkennbar, während beispielsweise die Tumoren FG und MR keine positive Antikörperreaktion aufweisen. Das Verhalten der beiden Antikörper ist nicht bei allen Tumoren gleich. Die Tumoren UH und MHU weisen für BCL-2 und IGF II eine unterschiedliche Expression auf. In allen anderen Fällen verhalten sich die beiden Antikörper ziemlich einheitlich.

Die Antikörperfärbungen von p53 und MDR-1 verhalten sich ebenfalls analog zueinander. Ihre Expression stimmt nicht mit der von BCI-2 und IGF II überein, untereinander zeigen sie aber das gleiche Muster. Die Tumoren JHA, FG und UH konnten aufgrund mangelnden Tumormaterials nicht mit den beiden Antikörpern untersucht werden. Bei Tumor MHU war das Ergebnis nicht eindeutig. Die übrigen Tumoren zeigen bis auf zwei Ausnahmen (Co und MVS) eine positive Antikörperfärbung innerhalb der Blastemzellen.

Die Abbildung 5.13 zeigt eine Schnittserie an dem blastemreichen Tumor CO, in dem deutlich die Blastemnester zu erkennen sind. Der Antikörper gegen IGF II zeigt eine deutlich positive Reaktion, während die Antikörper gegen p53 und MDR-1 keine so eindeutige Färbung der Blastemnester hervorriefen.



Abb. 5.13: Immunhistochemischen Analyse des Tumors CO anhand von chemotherapie- und apoptoseassoziierten Proteinen

5.5 RNA-Analysen

5.5.1 cDNA-Subtraktion von Blastemzellen



Abb. 5.14: Ablauf der cDNA-Subtraktions-Methode mit vorheriger Immunhistochemie

Die cDNA-Subtraktion bietet eine Möglichkeit, zwei RNA-Populationen direkt miteinander zu vergleichen und so Faktoren zu ermitteln, die in diesen Populationen unterschiedlich exprimiert sind. Im Rahmen dieser Arbeit sollten mit Hilfe dieser Methode mögliche Hinweise auf die Chemotherapieresistenz von blastemreichen Tumoren und eventuelle Veränderungen von Tumoren, die durch die Anwendung einer Chemotherapie entstehen, ermittelt werden.

Zu diesem Zweck wurde eine Subtraktion zwischen einem chemotherapierten Tumor, dessen Blastemzellen resistent sind und einem primäroperierten Tumor durchgeführt.

Die gewonnenen differentiell exprimierten Klone wurden durch ein Differential-Screening-Verfahren weiter analysiert und unspezifische Sequenzen wurden ausgesondert. Die erhaltenen Fragmente wurden sequenziert und ihre Sequenzen gegen eine Datenbank getestet. Um sicherzustellen, daß die differentiell exprimierten Sequenzen tatsächlich aus den Blastemzellen stammen und nicht durch eine unterschiedliche Expression in den unterschiedlichen Zellen der Tumoren hervorgerufen werden, wurden, die Tumoren einer immunhistochemischen Antikörperfärbung mit dem EnVision-Schnellfärbekit der Firma DAKO unterzogen. Dieses IHC-System ermöglicht eine RNA-schonende IHC, da die Gewebeschnitte nur für eine kurze Zeit den wäßrigen Färbereagenzien ausgesetzt sind. Die *WT1* positiven Zellen wurden danach mit dem Laser Capture Mikrodissektionssystem der Firma Arcturus aus dem Gewebe dissektiert und die RNA extrahiert. Um die cDNA-Menge soweit zu erhöhen, daß eine Subtraktion möglich wurde, wurde das SMART cDNA-Amplifikationssystem der Firma Clontech benutzt.

Die differentiell exprimierten Sequenzen werden durch Hybridisierung der mit Adaptoren ligierten Tester cDNA gegen unligierte Driver cDNA ermittelt und durch einen abschließenden PCR Schritt angereichert. Das Ergebnis einer cDNA-Subtraktion ist in Abbildung 5.15 dargestellt. Die differentiell exprimierten Sequenzen der Tumoren FG in Spur 3 und NB in Spur 4 sind als Schmier zu erkennen. Als Subtraktionskontrolle wurde eine Mischung aus einem Hae III-Verdaus von ϕ X 174 DNA mit Rsa-Verdauter Skelettmuskulatur cDNA als Tester gegen eine reine Skelettmuskulatur cDNA als Driver hybridisiert, nach der subtraktiven Hybridisierung bleiben nur die Fragmente des Hae-III-verdauten Phagen übrig. Das Auftreten distinkter Banden in der aufgetragenen Kontrolle weist also auf eine erfolgreiche Subtraktion hin.



Abb. 5.15: PCR-Ergebnis einer erfolgreichen subtraktiven Hybridisierung. Spur 1: Negativkontrolle; Spur 2: Hae-III Verdau von ϕ X 174 DNA als Positivkontrolle; Spur 3: Ergebnis der in Tumor FG differentiell exprimierten Sequenzen (FG als Tester); Spur 4: Ergebnis der in Tumor NB differentiell exprimierten Sequenzen (NB als Tester); Spur 5: 1kB DNA-Leiter als Größenstandard. Die differentiell exprimierten Fragmente der jeweiligen Tester wurden in *E. coli* kloniert. Die Klone wurden gepickt und in einer 96-Well Platte mit jeweils 200µl LB-Medium mit Kanamycin in Kultur genommen. Das Insert wurde anschließend durch eine PCR mit den spezifischen Primern für die Adaptoren, die auch in der Subtraktions-PCR verwendet wurden, direkt in der Bakterienkultur nachgewiesen. Das Ergebnis einer PCR aus den Bakterienkulturen der differentiell in Tumor FG exprimierten Sequenzen ist in Abbildung 5.16 abgebildet. Der Größenstandard (ganz rechts – Spur "s" - ist auf der Abbildung nur schwach zu erkennen). Die Kulturen in Spur 14, 19, 21, 26 und 32 wurden erneut ausgestrichen, um die Mischkulturen voneinander zu separieren. In Spur 3, 6, 8, 15, 16, 18, 20, 25, 27-29 und 31 konnte kein Insert nachgewiesen werden. Insgesamt wurden 47 Klone für FG als Tester und 23 Klone für NB als Tester isoliert werden. Diese wurden in der differentiellen Screening Analyse weiter untersucht.



Abb. 5.16: PCR aus Bakterienkulturen der differentiell exprimierten Sequenzen bei Verwendung des Tumors FG als Tester. Spur s: 1kB-Leiter (Gibco) als Größenstandard; Spur 1-32 PCR-Produkte der einzelnen Klone aus Bakterienkulturen einer 96-Well-Platte. Die Kulturen in Spur 14, 19, 21, 26 und 32 wurden erneut ausgestrichen, um die Mischkulturen voneinander zu separieren. In Spur 3, 6, 8, 15, 16, 18, 20, 25, 27-29 und 31 konnte kein Insert nachgewiesen werden.

Die PCR-Produkte der erhaltenen Inserts wurden auf eine Nylonmembran gespottet. Eine Hybridisierung des Tester mit der jeweils gleichen und der entgegengesetzten subtrahierten Probe (forwärts-Probe und rückwärts-Probe) diente zur weiteren Reduktion des, durch nicht differentiell exprimierte Sequenzen hervorgerufenen, Hintergrundes. Die differentiell exprimierten Sequenzen treten dabei dadurch in Erscheinung, daß sie ein Hybridisierungsergebnis jeweils nur mit der Forwärts-Probe zeigen. Gespottete Sequenzen, die mit beiden Hybridisierungsproben reagieren, fallen bei dieser Methode als Hintergrund heraus und werden nicht weiter analysiert. In Abbildung 5.17 ist ein Dot-Blot für den Tumor FG als Tester abgebildet. Links ist die Reaktion mit der die rückwärts-Hybridisierungsprobe und rechts die mit der forwärts-Probe dargestellt. Die Punkte der differentiell exprimierten Sequenzen sind in der Abbildung rechts (forwärts-Probe) hervorgehoben. Es handelt sich dabei um die Punkte A4; A6; B7; C3; C7; E5; E6 und G3. Die restlichen Punkte stellen Hintergrundsequenzen dar und wurden nicht weiter bearbeitet.



Abb. 5.17: Rückwärts und Forwärts Hybridisierung eines Differential Screening Dot Blots. Links ist die Reaktion mit der die "rückwärts"-Hybridisierungsprobe und recht die mit der "forwärts"-Probe dargestellt. Die Punkte der differentiell exprimierten Sequenzen sind in der Abbildung rechts (Forwärts-Probe) hervorgehoben. Es handelt sich dabei um die Punkte A4; A6; B7; C3; C7; E5; E6 und G3. Bei den übrigen Punkte handelt es sich um Hintergrundsequenzen.

Die differentiell exprimierten PCR-Fragmente wurden sequenziert und einer Datenbankanalyse (http://www.hgsc.bcm.tmc.edu/SearchLauncher) zugeführt. dabei wurden 18 stärker in FG exprimierte Sequenzen und 13 stärker in NB exprimierte Klone einer Sequenzanalyse unterzogen. Insgesamt 8 Klone konnten nicht erfolgreich sequenziert werden, da die Sequenzreaktionen zu keinem Ergebnis führten (6 FG-Klone und 2 NB-Klone). Die erhaltenen 23 übrigen Sequenzen (12 für FG und 11 für NB) wurden mit der Genome Database des Baylor College (http://www.hgsc.bcm.tmc.edu/SearchLauncher) und der ENSEMBL Database (http://www.ensembl.org) verglichen. Außerdem wurde ein Sequenzvergleich mit der

NIH Datenbank für "Expressed Sequence Tags" durchgeführt (http://www.ncbi. nlm.nih.gov/dbEST/). Ein Beispiel der graphischen Darstellung einer solchen Datenbankanalyse ist in Abbildung 5.18 dargestellt. Die farbigen Balken zeigen die Alignment Scores der gefundenen Homologien. Je höher der Wert eines Alignment-Scores für eine bestimmte Homologie, desto geringer ist die Wahrscheinlichkeit, daß die eine Sequenz mit der betreffenden Länge und Zusammensetzung zufällig mit einer zweiten nicht verwandten Sequenz in einer Datenbank der angegeben Größe übereinstimmt. Für die weitere Auswertung der Subtraktionsexperimente wurden nur die Sequenzen verwendet, deren Score über 200 liegt, also hier in rot abgebildet ist.



Abb. 5.18: Graphische Darstellung eines Datenbankvergleichs für eine differentiell exprimierte Sequenz des Tumors FG. Die farbigen Balken zeigen die Alignment Scores der gefundenen Homologien. Je höher der Wert eines Alignment-Scores für eine bestimmte Homologie, desto geringer ist die Wahrscheinlichkeit, daß die eine Sequenz mit der betreffenden Länge und Zusammensetzung zufällig mit einer zweiten in einer Datenbank der angegeben Größe übereinstimmt.

Es ergaben sich sowohl Homologien zu bekannten Transkripten, wie z.B. der mRNA der α-Enolase und der mRNA des MYC-Promotor-Binding-Protein-1 (Mib-1), für im Tumor FG stärker exprimierte Gene und der mRNA für Sialomucin, als auch Homologien zu unbekannten Sequenzen. Trotz der Hintergrundreduktion waren aber auch Homologien zu genomischer DNA zu finden; außerdem zu mitochondrialen und ribosomalen mRNA-Sequenzen. Zuletzt wurden noch Sequenzen zu bisher zwar bekannten, allerdings noch nicht weiter klassifizierten cDNA Klonen und zu Bac-Sequenzen gefunden. Die Ergebnisse der Sequenzanalysen der Subtraktionsergebnisse sind in Tabelle 5.9 dargestellt.

Die mit FG benannten Klone, stellen Sequenzen dar, die in dem blastemreichen Tumor FG stärker exprimiert sind, die mit NB benannten Klone sind in dem triphasischen Tumor NB stärker exprimiert.

Klon	Sequenzhomologie
FG 1	Human chromosome 11 pac pDJ1173a5, complete sequence
FG 2	CpG island DNA, genomic Mse 1 fragment, clone 70c1 (forwärts read cpg70c1.ft1b)
FG3	unbekannt
FG 4b	H. sapiens ribosomal protein S9 (RPS)) mRNA
FG 5	Enolase 1 (alpha)
FG 6	MYC promotor binding protein 1
FG 7	unbekannt
FG 8	DPY-30-like protein
FG 9	Bac sequence from the SPG4 candidate region at CITB 978 SKB library from chromosome 2
FG 10	target of myb1 (chicken) homolog – (TOM1 gene)
FG B5/7	homo sapiens mitochondrion cDNA
FG A7/23	unbekannt
NB 9	H. sapiens U32 small nucleolar RNA gene; anti-mullerian hormone type gene, promotor region & partial cds (?)
NB 10	human mitochondrion complete genome; H. sapiens RD114/simian type D retrovirus receptor (RDR) mRNA complete cds; H. sapiens solute carrier family 1 (neutral amino acid transporter), member 5 (SLC1A5) mRNA
NB12	H. sapiens clone DJ0693M11 (komplette Länge 104148 bp)
NB-E9/38	unbekannt
NB-E5/71:	unbekannt
NB-D10/30	H. sapiens, Sialomucin CD164 mRNA
NB-F3/86:	unbekannt
NB-E3/87:	H. sapiens KIAA0438 mRNA complete cds; H. sapiens genomic DNA chromosome 6p21.3 HLA Class I region, section 13/20
NB-D6/63	H. sapiens clone UWGC: y55c138 from 6p21, complete sequence; H. sapiens mRNA
NB-B8/41:	cDNA DKFZp564P2062 partial cds

 Tabelle
 5.9:
 Sequenzhomologien
 der
 cDNA-Subtraktion
 Ergebnisse
 (http://www.ensembl.org
 /

 http://www.hgsc.bcm.tmc.edu/SearchLauncher)

5.5.2 Atlas Array Analysen

Als weiterführende Untersuchung wurden Expressionsprofile von stromareichen und blastemreichen Tumoren mit Hilfe von Makroarray-Hybridisierungen erstellt. Dadurch sollten sowohl Faktoren aufgedeckt werden, die zur Bildung der histologisch unterschiedlichen Wilms Tumorgruppen führen, als auch die für die Entwicklung chemotherapieresistenter Tumoren verantwortlichen Veränderungen im Expressionsprofil. Außerdem sollte eine entwicklungsbiologische Klassifizierung der beiden Zelltypen "Stroma" und Blastem auf Transkriptionsebene erfolgen. Die hierfür verwendeten Arrays der Firma Clontech enthalten cDNA-Sequenzen von jeweils ca. 1200 tumorassoziierten Genen, die so ausgewählt sind, daß sie möglichst keine Homologien zu anderen Sequenzen aufweisen, dadurch soll eine Kreuzreaktion mit unbekannten cDNA-Sequenzen fremder Gene ausgeschlossen werden. Auch für die Erstellung der Expressionsprofile wurden nur bestimmte Zellareale dissektiert und analysiert. Bei den blastemreichen Tumoren handelt es sich um die gleichen Zellen wie bei der cDNA-Subtraktion, auch hier wurde eine IHC mit einem WT1 Antikörper und dem Envision System durchgeführt. Die Zellen wurden anschließend dissektiert und die RNA mittels des RNA-Microprep-Kit der Firma Stratagene extrahiert. Bei den stromareichen Tumoren wurden die Gewebeschnitte einer IHC mit einem Desmin Antikörper unterzogen, um die Zellen mit Muskeldifferenzierung zu erhalten, wie schon zuvor in den immunhistochemischen Analysen. Das weitere Vorgehen entsprach dem oben genannten. Hier wurden auch bei einigen Tumoren die Desmin negativen Stromazellen (ohne Muskeldifferenzierung) dissektiert und zum Vergleich auf die gleichen Arrays hybridisiert.

Die Array-Analysen ergeben Datenmengen einer Größe, die leider nicht komplett in dieser Arbeit wiedergegeben werden kann. Die im Rahmen dieser Arbeit aufgeführten Daten stellen also nur eine Auswahl dar.

Es wurden jeweils die Desmin positiven Zellen der drei stromareichen Tumoren AB, AV und SF, außerdem Desmin negative Zellen des Tumors AB, sowie die WT1 positiven Blastemzellen der blastemreichen Tumoren SeS und CO als chemotherapiebehandelte und der blastemreiche primäroperierte Tumor FG untersucht.

95



Abb. 5.19: Ablauf der Array-Analyse

Zum Vergleich und zur Abschätzung des Fehlers, der durch Amplifikation der RNA mit der SMART-Technik entsteht, wurde die RNA des Tumors FG aufgrund seiner sehr homogenen Struktur als Kontrolle aus pulverisiertem Tumormaterial isoliert und unamplifiziert markiert und hybridisiert. Eine genaue Übersicht über die durchgeführten Hybridisierungen ist in Tabelle 5.10 dargestellt.

Tumor	Filter	Zellen	Amplifikation	Chemo	Hybr.	Ехро
AB	1.2	Desmin⁺	SMART	ja	4	5h; 20h
AB	1.2	Desmin	SMART	ja	3	5h; 20h
AV	1.2	Desmin⁺	SMART	ja	4	5h; 20h
SF	1.2	Desmin⁺	SMART	ja	4	5h; 20h
СО	1.2	$WT1^+$	SMART	ja	4	20h
SeS	1.2	$WT1^+$	SMART	ja	4	5h; 20h
FG	1.2	$WT1^+$	SMART	nein	4	1h; 5h
FG	1.2	total RNA	keine	nein	4	1h; 5h

Tabelle 5.10: Übersicht über die durchgeführten Array Hybridisierungen an stromareichen und blastemreichen Wilms Tumoren. Hybr.: Anzahl der Hybridisierungen; Chemo: Chemotherapie; Expo: Expositionszeiten; 1.2: Atlas Human Cancer Array 1.2; Zellen: Markierung der verwendeten Zellareale durch Immunhistochemie mit den angegebenen Antikörpern. Desmin⁺: Zellen, die Desmin exprimieren; Desmin⁺: Stromazellen ohne Desminexpression; WT1⁺: WT1 exprimierende Blastemzellen; total RNA: RNA aus pulverisiertem Tumormaterial, ohne IHC Färbung.

Eine Verifikation der Array Ergebnisse erfolgte exemplarisch an einigen besonders interessant und auffällig erscheinenden Genen mittels einer immunhistochemischen Untersuchung.

In Abbildung 5.20 wird ein Beispiel einer Array Analyse eines stromareichen Tumors anhand der Hybridisierung der Desmin positiven und Desmin negativen Zellen auf den Atlas Human Cancer 1.2 Array gezeigt.

Beim Vergleich mit dem bloßen Auge sind zwar einige Unterschiede zu erkennen, eine quantitative Auswertung muß aber zusätzlich mit spezieller Software erfolgen. Jede Hybridisierung wurde dafür mindestens 3 mal mit neu isolierter und amplifizierter RNA durchgeführt und wenn möglich mit zwei unterschiedlichen Expositionszeiten auf Imaging-Plates am Phosphorimager überprüft und anschließend statistisch ausgewertet. Die Mittelwerte der einzelnen Tumoren zu den verschiedenen Zeiten wurden zum besseren Vergleich einer Clusteranalyse unterzogen.



Abb. 5.20: Atlas Human Cancer 1.2 Array Beispiel Tumor AB links: Hybridisierung der Desmin positiven Zellen; rechts Hybridisierung der Desmin negativen Zellen. Exemplarische Unterschiede sind durch die schwarzen Markierungen hervorgehoben.

5.5.2.1 Unterschiede zwischen blastemreichen und stromareichen Tumoren

Ein Ziel der Clusteranalysen lag darin, Gruppen von Genen zu finden, deren Expressionsprofil eine Unterscheidung zwischen blastemreichen und stromareichen Wilms Tumoren zuläßt. Eine Teilbereich der Clusteranalyse, in dem man diese Auftrennung deutlich erkennen kann, ist in Abbildung 5.21 dargestellt.



Abb. 5.21: Clusteranalyse mit besonderem Augenmerk auf Unterschiede zwischen blastemreichen und stromareichen Wilms Tumoren. Rote Bereiche zeigen höher exprimierte Gene; grüne Bereiche zeigen Gene mit verminderter Expression. BR: blastemreich SR: stromareich

In der Clusteranalyse ist deutlich zu sehen, daß die mRNA für das WT1 Protein in den blastemreichen Tumoren stärker exprimiert wird, als in den stromareichen. Auch andere cDNAs, wie die für Cyclin D2, Sentrin und den Arginin/Serin-reichen Splicing Faktor 7 zeigen Unterschiede in ihrem Expressionsmuster zwischen blastemreichen und stromareichen Tumoren. Für eine exemplarische Verifikation wurde WT1 ausgewählt. Das Ergebnis der Clusteranalyse von *WT1* läßt sich durch eine immunhistochemische Analyse bestätigen (Abb. 5.22)



Abb. 5.22: Immunhistochemische Bestätigung der WT1 Array Ergebnisse, der stromareiche Tumor AB ist WT1 negativ blaue Färbung), während die Blastemzellen des Tumors CO deutlich eine positive Antikörperreaktion zeigen (erkennbar durch die braune Färbung).

Das Expressionsprofil für das cytoplasmatische Intermediärfilament Vimentin zeigt hingegen eine gleiche Expressionsstärke in beiden Tumorgruppen (Abbildung 5.23). Lediglich in dem stromareichen Tumor AV ist es schwächer exprimiert. Dieser Tumor zeigt auch in anderen Bereichen häufig Expressionsunterschiede im Vergleich zu den anderen stromareichen Tumoren.



Abb. 5.23: Clusteranalyse des Expressionsprofiles für das cytoplasmatische Intermediärfilament Vimentin. BR: blastemreiche Tumoren; SR: stromareiche Tumoren.

Größere zusammenhängende Cluster von mRNAs, die in stromareichen Tumoren durchweg stärker exprimiert sind als in blastemreichen, waren nicht zu beobachten. Es zeigten sich aber die Expressionsmuster einzelner Proteine, die in stromareichen Tumoren stärker exprimiert wurden. Das Delta-Like-Protein (DLK) und der Cyclin abhängige Kinase-Inhibitor p21/WaF1/CIP1, verdienen eine nähere Betrachtung. Während DLK in den stromareichen Tumoren fast durchweg deutlich stärker exprimiert wird als in den blastemreichen, ist es bei p21/WAF1/CIP1 nicht ganz so eindeutig, aber auch hier zeigt zum Beispiel der stromareichen Tumoren (Abbildung 5.24).



Abb. 5.24: Clusterergebnis von DLK und P21/WAF1/CIP1. BR: blastemreiche Tumoren; SR: stromareiche Tumoren

5.5.2.2 Unterschiede zwischen chemotherapierten und nicht chemotherapierten blastemreichen Tumoren

Um Hinweise auf chemotherapiekorrelierte Faktoren zu gewinnen, wurden die blastemreichen chemotherapierten Tumoren CO und SeS alleine mit dem blastemreichen, primäroperierten Tumor FG geclustert. Mit der ausschließlichen Betrachtung der blastemreichen Tumoren sollten Faktoren die sich aufgrund der Histologie ergaben, weitestgehend ausgeschlossen werden und nur diejenigen betrachtet werden, die mit der Chemotherapie korrelieren.

Es wurde eine Aufspaltung der Tumoren in zwei Gruppen berechnet, in der die beiden Werte der chemotherapierten Tumoren die eine Gruppe bildete, während der primäroperierte Tumor von diesen Werten abwich. In Abbildung 5.25 ist ein Bereich dieser Clusteranalyse dargestellt, in dem die Abweichung besonders deutlich wird. Ein deutlicher Unterschied zeigte sich beispielsweise in den Expressionsmustern von

CDK2, NOTCH4 und einigen Wachstumsfaktoren (PLGF1 bzw. ihren Rezeptoren (FGFR4).

388
<pre>cell division protein kinase 4: cvclin-demendent kinase 4 (CDK4): PSK-J3 cell division protein kinase 6 (CDK6): serime/threonine protein kinase PLSTIRE cR0P-demendent protein kinase beta (CGK): type I alpha cGRP-dependent protein kinase SN3-binding protein 2 KIRA0151 cadherin 5 (CDH5): vascular endothelial cadherin (VE-cadherin): 7B4 antigen sonic hedoehoor (SH0) casnase 7 (CRSP7): MCN3: ICE-like anoutotic protease 3 (ICE-LAP3); C9M-1 H-ras proto-oncomene: transforming G protein tumor necrosis factor receptor sumerfamily member 1B (TNFRSF1B): tumor necrosis factor receptor tumor necrosis factor receptor sumerfamily member 5 (TNFRSF1B): tumor necrosis factor receptor fibroblast growth factor receptor 4 (FGFR4) placental protein 11 (PP11) integrin beta 7 (ITGB7) UV excision repair protein RAD23 homolog & (RAD23%: hMR23%) CMP-N-acetylneuraminate-beta-galactosamide-alpha-2.3-sialyltransferase: beta-galactoside alpha p37 (monoallelically expressed p53-related protein) matrix metalloproteinase 12 (MP12): netalloelastase c-src kinase (CSK): protein-tyrosine kinase cyl placenta growth factor 1 (PLGF1): PLGF2</pre>
KIRAU324 neuromenic locus notch protein homolog 4 (NOTCH4) ras-related associated with diabetes protein (RRAD); ras associated with diabetes protein 1 (i cvclin-demendent protein kinase 2 (CDK2) casein kinase I gamma 2 (CKI-gamma 2) urokinase-type plasminogen activator (U-plasminogen activator; UPA) cadherin-associated protein-related protein (CAPR); alpha 2 catenin (CTNHA2); alpha N catenin

Abb. 5.25: Clusteranalyse von blastemreichen Wilms Tumoren unter besonderem Augenmerk auf chemotherapiekorrelierte Expressionsbereiche

Es ergaben sich jedoch auch Cluster von Genen, die bei blastemreichen Tumoren übereinstimmten, ohne eine Aufteilung der Tumoren in chemotherapiesensitive und chemotherapieresistente Tumoren zu erlauben (Abb. 5.26).



Abb. 5.26: Bereich der Clusteranalyse ohne Auftrennung der blastemreichen Tumoren.

5.5.2.3 Gesamteinordnung der stromareichen und blastemreichen Tumoren

Eine Gesamtansicht der Clusteranalysen aller untersuchten amplifizierten Tumoren ergab, daß die Gruppenberechnung keine deutliche Einteilung in blastemreiche und stromareiche Tumoren hervorbringt. Sowohl die stromareichen Wilms Tumoren, als auch die blastemreichen Wilms Tumoren zeigen fast ebenso viele Unterschiede innerhalb der Klasse von Tumoren wie Gemeinsamkeiten, und stellen daher recht uneinheitliche Gruppen da (Abbildung 5.27).

Laut Clusterberechnung einer Gruppe von 125 Genen sind die blastemreichen Tumoren CO und FG am nächsten "verwandt", der blastemreiche Tumor SeS wird in eine Gruppe mit dem stromareichen Tumor SF eingeordnet. Die Verzweigung des Baumes trifft sich hier allerdings erst nahe an der Verzweigung zur nächst größeren Gruppe, die eine Einordnung zusammen mit den beiden übrigen blastemreichen Tumoren anzeigt. Die stromareichen Tumoren AB und AV werden ebenfalls erst kurz vor der Grundlinie des Verzweigungsbaumes in eine Gruppe einsortiert (siehe hervorgehobenes Kästchen in Abb. 5.27).



Abb. 5.27: Gesamtansicht der Clusteranalyse von blastemreichen und stromareichen Wilms Tumoren. Der Baum, in dem die Einteilung der einzelnen Gruppen angezeigt wird, ist zur Verdeutlichung noch mal vergrößert dargestellt (rot umrandetes Kästchen). Die geclusterten Gene sind in Tabelle5.11 nochmals zur besseren Lesbarkeit nach ihrer Sortierung auf dem Atlas Array geordnet dargestellt.

Auf den folgenden Seiten ist eine Tabelle von cDNA-Sequenzen, die im Rahmen dieser Clusterung untersucht wurden dargestellt (Tabelle 5.11). Die Sortierung erfolgte nach ihrer Anordnung auf dem Atlas Human Cancer 1.2 Array. Die

angegeben Werte entsprechen den normalisierten Mittelwerten der untersuchten Tumoren. Die einzelnen Werte wurden nach der Reichweite ihrer Streuung zur Analyse durch das Clusteranalyse-Programm ausgewählt.

Label	Name	Mittel SF	Mittel FG	Mittel AV	Mittel AB	Mittel CO	Mittel SeS
A01h	interferon-inducible protein 9-27	19,2	191,0	1,0	44,7	182,8	21,4
A02n	metallothionein III (MT3); brain growth inhibitory factor (GIFB)	2,5	1,6	6,4	92,8	5,4	3,2
A03g	c-myc-binding protein MM-1; prefoldin 5 (PFDN5; PFD5)	65,8	445,4	2,1	2,8	273,8	53,2
A03j	cyclin-dependent protein kinase 2 (CDK2)	89,1	1,0	4,7	22,3	7,5	25,1
A04j	cell division protein kinase 4; cyclin-dependent kinase 4 (CDK4); PSK-J3	1,6	5,8	1,0	11,1	15,7	50,7
A06g	matrix metalloproteinase 10 (MMP10); stromelysin 2 (STMY2; SL2); transin 2	1,3	1,0	18,3	1,0	2,8	-49,1
A06h	neurogenic locus notch protein homolog 4 (NOTCH4)	20,3	1,0	1,5	12,1	84,2	2454,6
A07i	cyclin D2 (CCND2)	1,3	82,7	1,0	1,4	76,4	10,9
A08g	tissue inhibitor of metalloproteinase 3 (TIMP3); Sorsby fundus dystrophy pseudoinflammatory protein (SFD)	1,5	46,8	4,7	4,0	47,7	13,5
A09b	nucleoside diphosphate kinase B (NDP kinase B; NDKB); expressed in non-metastatic cells 2 protein (NME2); myc purine-binding transcription factor (PUF); NM23B	19,3	117,7	3,9	38,7	85,4	25,2
A09I	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (CDKN1A); melanoma differentiation-associated protein 6 (MDA6); CDK-interacting protein 1 (CIP1); WAF1; SDI1	1,6	1,0	2,2	169,3	11,2	8,1
A10b	nucleoside diphosphate kinase A (NDKA); NDP kinase A; tumor metastatic process-associated protein; metastasis inhibition factor NM23 (NM23-H1)	37,7	83,2	1,0	5,6	67,9	19,3
A10h	von Hippel-Lindau-binding protein 1 (HIBBJ46; VHL-binding protein 1; VBP1)	2,5	4,5	2,0	64,3	3,8	7,9
A10k	cyclin-dependent kinase regulatory subunit 1 (CKS1)	2,5	47,8	2,7	3,0	18,2	5,6
A10m	CDC10 protein homolog	2,4	66,1	2,6	1,8	34,5	2,9
A11a	Wilms' tumor protein (WT33; WT1)	3,2	67,7	1,1	1,9	59,8	8,0
A11f	putative oral tumor suppressor protein; DOC-1	1,0	138,4	1,0	1,3	57,5	3,1
A13e	ras homolog gene family member A (RHOA; ARHA); aplysia ras-related homolog 12 (ARH12; RHOH12)	1,0	53,4	1,8	5,5	48,6	-4,1
A14a	cadherin1 (CDH1); epithelial cadherin (E-cadherin; CDHE); uvomorulin (UVO); CAM 120/80	1,6	1,0	284,5	1,4	3,6	-11,0
A140	erbB3 proto-oncogene; HER3	86,9	10,5	1,3	70,9	55,4	70,3
A14e	H-ras proto-oncogene; transforming G protein	1,0	1,7	6,4	1,0	7,9	42,1
BUZa	TIDroblast adenine hucleotide translocator 2 (ANT2)	2,5	84,4	1,5	63,1	78,4	16,9
DU2I	protein prosphatase 2C gamma	1,0	4,5	2,7	1,3	5,0	48,0
BU2M	ATD synthese sources factor (priteshandrick (CC)	153,0	139,8	1,0	206,2	101,2	71,9
B04a	A I P synthase coupling factor 6 mitochondrial (F6)	122,6	65,4	3,8	104,0	94,2	44,3
BU4C	6; MAPKK6; MAP2K6; PRKMK6); MAPK/ERK kinase 6 (MEK6); SAPKK3	1,1	2,5	1,0	43,1	0,5	7,7
B04j	ras homolog gene family member C (RHOC; ARHC); ARH9; H9	1,4	41,0	1,0	16,1	27,7	7,0
B05b	SH3-binding protein 2	1,3	1,0	1,5	2,5	5,1	46,3
B05I	calmodulin (CALM; CAM)	4,4	103,7	1,0	1,0	62,3	14,4
B08a	c-src kinase (CSK); protein-tyrosine kinase cyl	11,9	1,3	1,0	1,5	11,4	62,0
B08c	cAMP-dependent protein kinase I alpha regulatory subunit (PRKAR1); tissue-specific extinguisher 1 (TSE1)	70,5	77,9	1,0	11,0	86,8	30,5
B12m	guanylate kinase (GMP kinase)	2,7	59,2	1,2	2,3	21,6	16,3
B13I	ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (RAC1); ras- likeprotein TC25	42,5	15,8	1,0	1,0	25,5	16,2
B13J	(GNGT10; GNG10) upe	2,4	5,2 1.0	1,0	02,3 3.4	9,4	-1,3
C01f	activator 1 40-kDa subunit (A1 40-kDa subunit); roplication	64 8	18.6	1 1	70,4 70,1	30.2	7,5 40 6
C01h	factor C 40-kDa subunit (RFC40); RFC2	46.3	32.9	1.3	362.4	80.9	216.3
	hamster cells 1 (XRCC1)	.0,0	52,0	.,0	<u>сс</u> ,-т	00,0	,0
C01m	zinc finger protein 22; KOX15	1,5	111,1	1,0	1,7	65,9	11,4
C02a	tumor necrosis factor receptor superfamily member 1A (TNFRSF1A); tumor necrosis factor receptor 1 (TNFR1); tumor necrosis factor alpha receptor (TNFAR); CD120A antigen	2,1	15,8	3,4	56,4	26,3	8,7

C02k	ets transcription factor: NERE2	24	13	327.8	10	61	0.0
C02k	n73 (monoallelically expressed n53-related protein)	2,7	1,5	10	29	19.5	128.0
C03a	tumor necrosis factor recentor superfamily member 1B	174 1	10.4	1,0	190.0	59.8	426.7
CUJa	(TNFRSF1B): tumor necrosis factor receptor 2 (TNFR2): tumor	174,1	10,4	1,0	130,0	55,0	420,7
	necrosis factor beta receptor (TNFBR); CD120B antigen						
C03n	E4BP4	1,0	3,2	3,4	50,6	11,6	3,9
C04e	casper. a FADD- and caspase-related inducer of apoptosis	2,2	1,0	218,5	1,4	1,0	3,4
	(CASH-alpha + CASH-beta); FLAME-1; FLICE-like inhibitory						
C04f	protein activator 1.37-kDa subunit: replication factor C.37-kDa subunit	24	18.0	46	16	22.0	87.3
0041	(RFC37); RFC4	۲,۲	10,0	4,0	1,0	22,5	07,5
C04h	UV excision repair protein RAD23 homolog A (RAD23A;	38,1	1,0	5,0	1,0	12,9	465,0
	hHR23A)						
C04i	endonuclease III homolog 1; HNTH1; OCTS3	384,1	313,0	1,9	239,8	284,5	159,4
C06d	sentrin; ubiquitin-like protein SMT3C; ubiquitin-homology	3,3	74,4	2,4	1,0	52,2	10,7
C06e	CC3 (CC3)	2,2	1,0	4,1	2,1	4,0	79,1
C08b	caspase 4 (CASP4); CASP5; ICH2 cysteine protease; ICH3;	1.0	1,0	1,0	49,4	2,6	-11,7
	TX protease; TY protease; ICE(REL) III	1 -	, -	, -	- 1	, -	,
C08g	mutL protein homolog1 (MLH1; hMLH1); colon cancer	8,1	24,8	1,0	3,8	117,1	31,3
Cook	nonpolyposis type 2 protein (COCA2)	00 7	10.1		04.0	00.0	05.5
CU9D	caspase 6 (CASP6); MCH2-alpha; MCH2-beta	32,7	12,4	4,1	64,3	38,2	25,5
Ciue	DNA polymerase alpha catalytic subunit (POLA)	39,1	1,4	2,4	2,3	5,0	109,6
C110	INFIDITOR OF ADOPTOSIS PROTEIN 2 (NIAP2; IAP2); IAP NOMOLOG B; INFR2-TRAE signaling complex protein 2: MIHC	1,1	5,6	6,0	116,2	8,3	-0,5
C11h	torsina: DYT1	1.1	2.0	62.7	1.3	4.8	9.0
C11k	signal transducer and activator of transcription 4 (STAT4)	1.4	10.0	6452.2	1.8	10.4	-4.9
C11m	putative regulatory protein TGF-beta-stimulated clone 22	115.5	32.8	1.0	235.7	59.9	12.1
• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •	homolog (TSC22)	,-	,-	.,.	,-	,-	,.
C12b	caspase 10 (CASP10); MCH4; ICE-like apoptotic protease 4	4185,9	240,4	1,8	2166,0	1267,4	2297,9
C12a	(ICE-LAP4); FADD-like ICE 2 (FLICE2)	20.7	1.0	2.0	1.0	4.0	2.2
CIZC	PK-alpha): protein kinase B (PKB)	39,7	1,0	2,0	1,0	4,2	-3,3
C13b	caspase 1 (CASP1): IL1-beta convertase (IL1BC): IL1-beta-	13.3	2.5	1.6	1.0	1.0	-22.6
	converting enzyme (ICE)	-) -	, -	, -	, -	, -	7 -
C13f	G22P1; Ku 70-kDa subunit (KU70); 70-kDa thyroid autoantigen	52,9	52,3	1,0	8,6	62,6	32,9
C12h	(ILAA) ALKE homolog protoin	1.0	1.0	250 1	1.0	1 2	2.2
C12n		1,0	1,0	0 1	1,0	1,3	-2,2
CTSN	basic-leucine zipper transcription factor MAFG	1,0	1,0	2,1	1,8	2,9	48,Z
C14i	jun activation domain binding protein	2,8	44,4	1,0	1,0	51,8	-4,6
D02b	histone deaceytlase 2 (HD2)	1,5	48,8	2,5	1,2	30,8	4,0
D06b	nonhistone chromosomal protein HMG17	63,7	131,4	1,0	59,1	138,0	32,1
D06k	tyrosine kinase receptor tie-1	6,2	8,8	2,0	1,0	8,2	55,5
D06m	cytosolic superoxide dismutase 1 (SOD1)	8,1	199,8	28,5	180,1	228,8	62,1
D07b	high mobility group protein HMG2	1,0	45,0	9,7	1,0	47,8	1,3
D07h	tumor necrosis factor receptor superfamily member 5	1,0	1,0	4,5	1,4	8,8	115,0
D07n	(INFRSF5); CD40 antigen	6 9	217	2.0	0 1	01.0	10.0
	interformer (IFN servers) reserves here subusity IFN	0,0	31,7	2,0	0,4	40.0	10,0
Duoj	gamma accessory factor 1 (AF1). IFN-gamma transducer 1	0,01	1,3	1,0	42,1	12,9	41,2
	(IFNGT1)						
D09d	alpha1 catenin (CTNNA1); cadherin-associated protein	4,4	86,3	2,8	3,2	56,9	9,7
D09e	beta 1 catenin (CTNNB); cadherin-associated protein	2,0	119,8	3,8	2,3	52,5	7,6
D09h	insulin-like growth factor 2 receptor (IGF2R); cation-	2,0	50,0	1,0	1,0	47,2	-16,9
Dite	independent mannose-6-phosphate receptor (MPIR)	0.0	0.4	4.0	F0 7	07	4.0
Dila	neterochromatin protein nomolog 1 (HP1)	2,0	6,4	1,0	56,7	8,7	-4,0
Dila	NCAM 140-kDa isoform (NCAM140) + NCAM	1,1	1,0	51,2	1,0	4,3	7,2
	phosphatidylinositol-linked isoform; NCAM 120-kDa isoform						
	(NCAM120)						
D14a	CENP-F kinetochore protein	9,4	39,4	2,6	3,7	32,4	7,6
D14i	cysteine-rich fibroblast growth factor receptor 1 (CFR1); Golgi	2,3	76,0	1,0	2,1	51,7	1,8
E024	membrane sialoglycoprotein MG160; GLG1	1.0	1.0	1.0	1.0	60	60 1
EUSK	pracental protein i i (FFTT)	1,0	1,0	1,U 202.9	1,0	0,0	70
⊑04g	Ivmphocyte maturation factor 40-kDa subunit (CLMF n40). NK	1,0	1,9	J9J,0	۷,۷	5,9	7,9
	cell stimulatory factor subunit 2 (NKSF2)						
E04k	PRSM1 metallopeptidase	1,0	1,3	449,7	1,0	1,4	-2,7
E04m	IgG receptor Fc large subunit p51 (FCRN); neonatal Fc	20,3	43,8	1,0	53,3	52,3	18,5
	receptor; IgG Fc fragment receptor transporter alpha chain						

E05c	teratocarcinoma-derived growth factor 1 (TDGF1); epidermal growth factor-like CRIPTO protein 1 (CR1); CR3; CRIPTO-1 growth factor (CRGF); teratocarcinoma-derived growth factor 3 (TDGF3)	353,9	74,7	1,0	318,7	184,1	235,9
E06m	complement component 5 (C5)	1,4	1,0	1,0	51,1	1,2	-0,6
E07c	small inducible cytokine subfamily B member 10 (SCYB10); interferon gamma-induced protein 10 (INP10: IP10)	1,0	1,6	1,0	82,4	6,9	7,1
E07m	HLA-DR antigen-associated invariant subunit	1.2	10.2	3.2	47.0	15.6	4.6
F07n	procollagen II alpha 1 subunit (COI 2A1)	15.2	21.6	42	72.9	16.7	11.4
E081	ubiquitin-conjugating enzyme E2 32-kDa complementing	22	14.6	130.2	5.0	17.6	_1 0
2001	protein; ubiquitin-protein ligase; ubiquitin carrier protein; CDC34	2,2	14,0	150,2	5,5	17,0	-1,0
E09d	B-cell growth factor 1 (BCGF1); 12-kDa BCGF	141,8	35,5	1,0	105,6	36,2	20,6
E09m	membrane-bound & secreted immunoglobulin gamma heavy chain (IgG3) + immunoglobulin lambda heavy chain (IgG1L) + immunoglobulin kappa heavy chain (IgG1K) + immunoglobulin C1 Ea fragment (IgC1)	1,0	5,6	3,5	47,4	9,8	0,0
E10b	pleiotrophin (PTN); osteoblast specific factor 1 (OSF1); heparin-binding neurite growth-promoting factor 1 (HBNF1; NEGF1) ; heparin-binding growth-associated molecule (HB- GAM); heparin-binding growth factor 8 (HBGF8)	112,6	98,5	1,0	362,0	85,6	53,9
E10c	placenta growth factor 1 (PLGF1); PLGF2	1,2	1,0	3,8	1,0	9,1	42,4
E10m	MHC class II HLA-DR-beta (DR2-DQW1/DR4 DQW3)	1,8	5,9	5,3	51,8	9,0	2,2
E11g	wingless-related MMTV integration site 13 protein (WNT13)	1,6	1,0	1,7	5,7	3,6	199,7
E11I	CD59 glycoprotein; membrane attack complex inhibition factor (MACIF); MAC inhibitory protein (MACIP); MEM43 antigen; protectin; membrane inhibitor of reactive lysis (MIRL); HRF20; 155 artigon	2,5	54,9	1,0	1,0	39,8	22,4
F12c	delta-like protein (DLK)	155.6	33	10	129 1	82	37.1
F12e	sonic hedgehog (SHH)	13.2	1.5	53	17	21 1	243.4
E12i	matrix metalloproteinase 1 (MMP14): MMP-X1: membrane-	21.6	1,0	860.6	3.9	3.0	-5.4
	type matrix metalloproteinase 1 (MT-MMP1)	,•	.,.	000,0	0,0	0,0	0,1
E13a	transforming growth factor beta (TGF-beta; TGFB)	934,3	1333,2	1,0	1465,0	961,4	358,8
E13n	collagen VI alpha 3 subunit (COL6A3)	1,0	1,8	61,0	1,4	5,1	3,5
E14f	interleukin 10 (IL10); cytokine synthesis inhibitory factor (CSIF)	124,1	48,1	4,5	43,2	87,4	160,5
E14h	wingless-related MMTV integration site 8b protein (WNT8B)	24,7	41,1	4,0	2,3	52,1	312,8
F01i	nuclear pore complex protein 358 (NUP153); 358-kDa nucleoporin; RAN-binding protein 2	46,0	4,5	1,0	47,2	5,3	11,8
F02i	lymphoid-restricted homolog of SP100 protein (LYSP100)	53,2	1,0	1,7	3,0	5,7	14,4
F021	leukocyte interferon-inducible peptide	182,7	29,8	2,5	329,9	96,3	68,7
F03a	collagen XVI alpha 1 subunit (COL16A1)	97,3	2,1	2,0	7,1	7,5	12,7
F03c	arachidonate 5-lipoxygenase	1,0	1,0	378,2	1,0	6,6	1,2
F03h	cardiac ventricular myosin light chain 2	49,5	1,0	1,0	303,9	2,3	17,1
F04b	heparan sulfate proteoglycan (HSPG2)	1,0	1,0	388,9	3,4	1,9	-0,3
F04g	vimentin (VIM)	88,3	134,5	2,4	125,3	406,4	102,7
F05a	laminin alpha 4 subunit (laminin A4; LAMA4)	7,2	120,6	1,0	2,3	146,6	19,2
F05b	interferon-gamma IEF SSP 5111	42,9	37,7	1,0	7,3	34,4	18,6
F05d	L-lactate dehydrogenase M subunit (LDHA)	46,2	24,0	7,6	88,9	29,9	16,9
F05e	ornithine decarboxylase	1,0	51,7	1,5	1,0	29,3	9,0
F05j	CMP-N-acetylneuraminate-beta-galactosamide-alpha-2.6- sialyltransferase; beta-galactoside alpha-2.6-sialyltransferase (alpha-2.6-ST); sialyltransferase 1 (SIAT1); B-cell CD75 antigen	1,5	1,0	2,0	1,0	1,0	64,4
F06d	L-lactate dehydrogenase H subunit (LDHB)	42,2	78,9	2,2	132,0	85,0	21,2
F07g	myosine light chain 1 slow-twitch muscle B/ventricular isoform (MLC1SB)	49,0	1,0	1,8	119,5	2,8	4,1
F07h	GTP-binding nuclear protein RAN (TC4)	7,2	45,0	71,8	16,5	67,9	7,1
F07i	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (HNRNPK); dC- stretch-binding protein (CSBP); transformation-upregulated nuclear protein	13,0	182,4	1,0	5,5	296,9	104,8
F08j	HSC70-interacting protein; progesterone receptor-associated P48 protein	2,6	36,3	1,0	1,6	42,3	1,3
F08I	KIAA0151	8,6	2,4	3,1	1,3	9,0	49,0
F09k	aspartyl-tRNA synthetase (ASPRS); aspartate-tRNA ligase	3,9	24,3	4,4	93,1	10,8	6,7
F10h	dual-specificty A-kinase anchoring protein 1	67,4	5,2	1,2	1,0	7,2	14,6
F10i	arginine/serine-rich splicing factor 7; splicing factor 9G8	5,2	118,7	1,1	1,0	75,8	18,8
F11a	tenascin (TN); hexabrachion (HXB); cytotactin; neuronectin; GMEM; miotendinous antigen; glioma-associated extracellular	58,7	25,5	1,0	66,7	35,7	25,1
F11c	matrix antigen uridine diphosphoglucose pyrophosphorylase; UTP-glucose-1-	27,9	14,5	1,0	44,5	30,4	9,4

	phosphate uridylyltransferase						
F11h	CRM1 protein	4,6	41,1	1,9	1,7	51,7	15,9
F12j	elongation factor 1 alpha (EF1-alpha; EF1A)	755,1	2546,6	1,0	741,4	2186,7	611,0

Tabelle 5.11: Daten der in der Clusteranalyse untersuchten Gene, nach der Anordnung (Label) auf dem Atlas Human Cancer 1.2 Array sortiert. Spalte 3,4, 5, 6, 7 und 8 zeigen die jeweiligen normalisierten Mittelwerte der Arrayauswertung der jeweiligen Tumoren durch das AIDA-Array Auswertungsprogramm

5.5.2.4 Vergleich amplifizierter und unamplifizierter cDNA anhand des Tumors FG

Um zu untersuchen, ob und wie durch die SMART-cDNA-Amplifikation die ursprüngliche RNA Zusammensetzung verfälscht wird, sollte ein Tumor sowohl mit SMART amplifiziert, als auch unamplifiziert und direkt markiert, auf die Atlas Human Cancer 1.2 Arrays hybridisiert werden. Da die RNA-Ausbeute aus mikrodissektiertem Material zu gering für eine direkte Markierung, ohne Amplifikation ist, muß RNA für die nicht amplifizierte Kontrolle aus pulverisiertem Gesamttumormaterial eingesetzt werden. Der ausgewählte Tumor FG zeichnet sich durch die große Homogenität der Gewebeschnitte aus, die fast ausschließlich Blastemzellen zeigen. Daher kann erwartet werden, daß das Ergebnis durch die Verunreinigung mit RNA anderer Zellen nicht stark verändert wird.

Das Ergebnis zeigt sowohl Unterschiede als auch Übereinstimmungen zwischen amplifizierter und unamplifizierter RNA (Tabelle 5.12). Es wurden die Bereiche der größten Unterschiede, so wie die Bereiche der Ratios zwischen 1,5 und 0,75 exemplarisch dargestellt.

Label	Name	Mittel FG unamp	Mittel FG amp	Ratio
	durch SMART überrepräsentierte Gene			
F12j	elongation factor 1 alpha (EF1-alpha; EF1A)	3,4	2495,0	733,83
A01h	interferon-inducible protein 9-27	1,0	212,3	212,31
D06b	nonhistone chromosomal protein HMG17	1,0	129,0	128,97
F05a	laminin alpha 4 subunit (laminin A4; LAMA4)	1,0	111,7	111,66
	Gleichmäßig repräsentierte Gene			
C07d	poly(ADP-ribose) polymerase (PARP; ADPRT; ADPRP; PPOL); NAD(+) ADP-ribosyltransferase; poly(ADP-ribose) synthetase	4,0	5,9	1,50
B12m	guanylate kinase (GMP kinase)	45,7	68,0	1,49
A08k	CDC-like kinase 2 (CLK2)	14,3	21,2	1,48
C09d	ionizing radiation resistance-conferring protein + death-associated protein 3 (DAP3)	10,7	15,5	1,45
F03k	regulator of G protein signaling 3 (RGS3; RGP3)	19,7	27,3	1,38
A04b	transforming growth factor beta 3 (TGF-beta3; TGFB3)	7,0	9,6	1,38
C05f	MCM2 DNA replication licensing factor; nuclear protein BM28; KIAA0030	7,4	10,1	1,36
B02j	RalB GTP-binding protein	6,5	8,6	1,33
C03j	BRCA1-associated ring domain protein 1 (BARD1)	4,0	5,3	1,33
E09m	membrane-bound & secreted immunoglobulin gamma heavy chain (IgG3) +	4,3	5,7	1,32

D14c	immunoglobulin lambda heavy chain (IgG1L) + immunoglobulin kappa heavy chain (IgG1K) + immunoglobulin G1 Fc fragment (IgG1) QX2 membrane glycoprotein	54	69	1 29
E401	UNZ membrane grycoprotein	5, 4 77 7	0,5	1,23
E10D	growth-promoting factor 1 (HBNF1; NEGF1); heparin-binding growth- associated molecule (HB-GAM); heparin-binding growth factor 8 (HBGF8)	//,/	98,6	1,27
B01k	cytohesin 2; pleckstrin homology, Sec7 & coiled/coil domains 2 homolog (PSCD2); ARNO; Sec7p-like protein (SEC7L)	11,1	13,9	1,25
C06m	B4-2 protein	4,0	5,0	1,25
C12b	caspase 10 (CASP10); MCH4; ICE-like apoptotic protease 4 (ICE-LAP4); FADD-like ICE 2 (FLICE2)	168,3	207,8	1,23
C03a	tumor necrosis factor receptor superfamily member 1B (TNFRSF1B); tumor necrosis factor receptor 2 (TNFR2); tumor necrosis factor beta receptor (TNFBR); CD120B antigen	7,4	8,6	1,16
A11f	putative oral tumor suppressor protein; DOC-1	125,5	144,6	1,15
E06g	interleukin 15 (IL15)	1,3	1,4	1,13
A09k	CDC-like kinase 3 (CLK3)	5,7	6,4	1,12
E03h	putative T1/ST2 receptor-bindng protein	5.8	6.3	1.08
B10f	serine/threonine protein kinase PK428	1.3	1.4	1.07
A10h	von Hippel-Lindau-binding protein 1 (HIBBJ46: VHL-binding protein 1: VBP1)	4.2	4.4	1.04
C11I	major histocompatibility complex enhancer-binding protein MAD3	6.1	6.3	1.03
A12i	cvclin G2 (CCNG2)	6.8	6.4	0.95
C03k	TRAF-interacting protein (I-TRAF): TRAF family member-associated NF-	5.0	4.2	0.84
F12c	kappaB activator (TANK) bifunctional purine biosynthesis protein	6.7	5.6	0.84
E03c	hepatocyte growth factor-like protein: macrophage-stimulating protein (MSP)	36.1	30.0	0.83
E08h	iagged homolog 1 (JAG1: hJ1)	11.2	92	0.82
B02c	mitogen-activated protein kinase kinase 2 (MAP kinase kinase 2; MAPKK2; MAP2K2 PRKK2): MAP2K/ERK kinase 2 (MEK2)	1,3	1,0	0,79
D08i	G protein-coupled receptor bonzo; STRL33	1,3	1,0	0,79
C05g	xeroderma pigmentosum group D complementing protein (XPD); X-ray repair- complementing defective repair in Chinese hamster cells 2 (XRCC2)	5,8	4,6	0,78
B05d	Janus tyrosine-protein kinase 2 (JAK2)	1,9	1,4	0,75
C14k	cAMP-responsive element modulator 1 alpha protein (HCREM)	9,1	6,8	0,75
	durch SMART unterrepräsentierte Gene			
D05k	colon carcinoma kinase 4 (CCK4); transmembrane receptor PTK7	67,1	1,0	0,01
F06e	trifunctional purine biosynthetic protein adenosine 3	68,4	1,0	0,01
C04c	BCL2-associated X protein membrane (BAX)	70,0	1,0	0,01
A07c	ets1 proto-oncogene	70,4	1,0	0,01
B08k	rho-GAP hematopoietic protein C1 (RGC1); KIAA0131	85,8	1,0	0,01
F10d	ribonucleoside-diphosphate reductase M1 subunit; ribonucleotide reductase	239,5	2,8	0,01
C10e	DNA polymerase alpha catalytic subunit (POLA)	87,2	1,0	0,01
D14n	semaphorin III/F (SEMA3F); semaphorin IV	91,3	1,0	0,01
F10I	KIAA0265	113,3	1,2	0,01
E04n	bone/cartilage small proteoglycan 1 (PGS1); biglycan (BGN)	112,5	1,0	0,01
C09g	xeroderma pigmentosum group G complementing protein (XPG); X-ray repair- complementing defective repair in Chinese hamster cells 5 (XRCC5)	216,1	1,6	0,01
B08m	dishevelled homolog 1-like protein (DSH homolog 1-like; DVL1L1)	188,3	1,0	0,01
B09i	receptor-type protein-tyrosine phosphatase sigma (R-PTP-sigma; PTPRS)	198,0	1,0	0,01

Tabelle 5.12: Unterschiede durch SMART Amplifikation und gleichmäßig repräsentierte Bereiche innerhalb des Tumor FG. Label: Anordnung des entsprechenden Spots auf dem Atlas Array human Cancer 1.2
6. Diskussion

Das primäre Ziel der Arbeit läßt sich in drei übergeordnete Abschnitte teilen. Erstens sollte eine molekulargenetische Charakterisierung der Faktoren erfolgen, die zur Bildung von histologisch unterschiedlichen Wilms Tumoren führen, zweitens sollten Faktoren aufgedeckt werden, die zur Entstehung von Chemotherapieresistenzen führen, drittens sollte eine entwicklungsbiologische Klassifizierung der beiden Zelltypen "Stroma" und Blastem erfolgen, die dann mit der Entstehung der unterschiedlichen Tumorgruppen in Verbindung gebracht werden sollte. Eines der Probleme bei einer solchen Einordnung und Klassifizierung der Gruppen liegt allerdings in der Heterogenität der einzelnen Tumoren. Dies ist insbesondere wichtig bei den stromareichen Tumoren, da der Begriff "Stroma" ganz unterschiedliche Zellen zusammenfaßt, deshalb kann man nicht allgemein von "Stroma" als einer einzigen Zellart sprechen, sondern diese müßte weiter unterteilt werden. Genauer betrachtet findet man in stromareichen Tumoren zwei Stromatypen mit unterschiedlichen Differenzierungseigenschaften. Ein Stromatyp zeigt eine deutliche myogene Differenzierung, diese Zellen sind zum Beispiel mit einem myogenen Differenzierungsmarker, dem Desmin anfärbbar. Die andere Gruppe der Zellen, die unter dem Begriff Stroma zusammengefaßt werden, zeigt keine myogene Differenzierung, und ist mit Desmin nicht anfärbbar. Die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit beschäftigen sich vorwiegend mit den Zellen, die eine myogene Differenzierung aufwiesen, da andere Versuche dafür sprachen, daß diese mit den tatsächlichen Tumorzellen übereinstimmen

6.1 Untersuchungen des Genoms von Wilms Tumoren

Vor Beginn dieser Arbeit war bekannt, daß in der Gesamtheit der Wilms Tumoren *WT1* Mutationen bei etwa 10 bis 15% der Fälle vorkommen. Aus den bisherigen Ergebnissen der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Royer-Pokora ließ sich zusätzlich ersehen, daß die Mutationshäufigkeit in stromareichen Tumoren deutlich höher als in den blastemreichen bei etwa 60% liegt (Schneider 1994; Figge 1995; Schumacher 1995). Bei den ebenfalls in dieser Arbeitsgruppe durchgeführten Versuchen konnte bislang in 8 analysierten blastemreichen Tumoren nur eine *WT1*-Mutation nachgewiesen werden, deshalb sollten weitere 13 blastemreiche Tumoren auf *WT1*-Mutationen überprüft werden. In die Analysen wurde auch der Promotorbereich mit

einbezogen, um festzustellen, ob der Mechanismus der Tumorentstehung eventuell auf einer Fehlregulation von WT1 beruhen könnte. Dies war insbesondere in den Tumoren interessant, in denen keine Mutation im *WT1*-Gen nachweisbar war.

6.1.1 Mutationsanalyse des WT1-Gens und seiner Promotorbereiche

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine Mutationsanalyse bei einem Kollektiv von 13 blastemreichen WT durchgeführt. Dabei konnte weder eine weitere Mutation im Gen noch in seinem Promotor gefunden werden. Dies erhöht die Zahl der insgesamt untersuchten blastemreichen WT auf 21, die Mutationshäufigkeit innerhalb der bisher analysierten blastemreichen Tumoren beträgt daher unter 5%. Die einzige gefundene Mutation war eine Missense Mutation in Exon 2. Die Mutationen im WT1-Gen der stromareichen Tumoren sind meist Nonsensmutationen, also solche, die zu einem Kettenabbruch führen. Dadurch fehlt dem Protein ein Teil der oder die Gesamte Zink Finger Domäne, so daß eine Bindung an DNA vermutlich nicht mehr stattfinden kann, dies bedeutet, daß ein eventuell synthetisiertes verkürztes Protein seine Rolle als Transkriptionsfaktor nicht mehr erfüllen kann. Im Gegensatz dazu ist der funktionelle Effekt der einzigen Mutation der blastemreichen Tumoren unklar. Mutationen im Promotorbereich der blastemreichen Tumoren konnten ausgeschlossen werden. Hier wurden lediglich in 7 Fällen Polymorphismen beobachtet, die jedoch schon vorher beschrieben wurden (Figge 1995), 3 Tumoren waren heterozygot für einen Polymorphismus des Promotorbereiches 4, 2 für den des Promotorbereiches 2 und ebenfalls zwei für den Polymorphismus im Promotorbereich 1, über die Funktionen und Auswirkungen der gefundenen Polymorphismen ist bisher wenig bekannt, vermutlich führen sie aber nicht zu einer veränderten Regulierung des Gens, die eventuell eine Überexpression von WT1 zur Folge hätte. Dieser Mechanismus wird zum Beispiel für überregulierte Coexpression von WT1 mit dem Apoptosehemmer BCI-2 in rhabdoiden Zellinien beschrieben (Mayo, Wang et al. 1999).

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß weder eine Mutation des *WT1*-Gens noch eine Mutation des Promotorbereiches von WT1 als Hauptfaktor für die Entstehung eines blastemreichen Wilms Tumors anzunehmen ist, vielmehr exprimiert diese Subklasse ein anscheinend normales WT1-Protein. Ein kompletter Verlust des WT1-Proteins, so wie es das "Two-Hit-Modell" von Knudson postuliert, kann also wohl nur als Erklärung für das Entstehen stromareicher, und einiger triphasischer Tumoren angenommen werden und wenn überhaupt, dann nur in wenigen Ausnahmen für die Entstehung von blastemreichen Wilms Tumoren.

6.1.2 LOH-Analysen von WT-assoziierten Loci

Die LOH-Analyse ist eine Methode, mit deren Hilfe der Verlust von Tumor Dispositionsgenen nachgewiesen werden kann. Dies impliziert, daß ein Allel bereits inaktiviert ist, und das zweite Allel im Zuge der Tumorentwicklung durch unterschiedliche Mechanismen ausgeschaltet wird, was für einen eventuellen hereditären Tumor spricht. Ein häufiger Mechanismus dafür ist eine Deletion des Locus, es kann aber auch zu einem kompletten Chromosomenverlust oder einer Translokation kommen. Sind die normalen Zellen (z.B. Blutzellen) für den entsprechenden Marker heterozygot, ist dieser Locus für diese Analyse informativ. Durch die gezielte Auswahl der LOH-Marker, kann die Position eines mutmaßlichen Tumorsuppressorgens eingeengt werden.

Zur Klärung der Frage, welche anderen chromosomalen Regionen an der Entstehung von Wilms Tumoren beteiligt sind, wurden verschiedene Loci untersucht, bei denen schon früher eine Assoziation des Auftretens von LOH-Ereignissen, mit der Bildung eines Wilms Tumors hergestellt wurde.

LOH auf dem kurzen Arm von Chromosom 1 wird mit verschiedenen malignen Erkrankungen in Verbindung gebracht, wie Neuroblastom, dem Colonkarzinom, Brustkrebs etc., diese LOH-Ereignisse betreffen jedoch stets unterschiedliche Loci (Schwab, Praml et al. 1996). Auch befinden sich mindestens zwei Tumorsuppressorgene auf 1p, diese liegen jedoch nicht an derselben Stelle, die LOH in Wilms Tumoren zeigen (Takeda, Homma et al. 1994). Es konnte jedoch eine hohe Frequenz an LOH-Ereignissen auf einem anderen Locus von 1p bei Wilms Tumoren entdeckt werden (Steinberg, Freud et al. 2000).

Cytogenetische Untersuchungen und LOH-Analysen von Chromosom 7p lassen vermuten, daß sich in diesem Bereich ein Tumorsuppressorgen befindet, das eine Rolle in der Wilms Tumor Entstehung spielt (Grundy, Pritchard et al. 1998).

Eine Verbindung zwischen LOH auf Chromosom 22 und einer malignen Erkrankung konnte bisher für renale rhabdoide Tumoren hergestellt werden (Schoffield et al. 1996). Das entsprechende Tumorsuppressorgen ist mittlerweile kloniert und identifiziert (Sevenet, Lellouch-Tubiana et al. 1999). Die bei Wilms Tumoren deletierte Region stimmt aber nicht mit dieser überein (Klamt, Schulze et al. 1998).

Sowohl LOH-Ereignisse auf Chromosom 11 als auch auf Chromosom 16 in Wilms Tumoren deuten auf eine fatale Diagnose hin (Klamt, Schulze et al. 1998). Eine Betrachtung speziell in Bezug auf die vorhandene Histologie des jeweiligen Tumors ist auch bei diesem Locus bisher nicht beschrieben worden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob eine Verbindung zwischen dem Auftreten von LOH und der Ausbildung der unterschiedlichen Tumorhistologien gefunden werden kann. Die in der Literatur erwähnten LOH-Analysen wurden bisher stets entweder an einer Gruppe von Wilms Tumoren ohne nähere Spezifikation von Untergruppen vorgenommen, oder die LOH-Ereignisse in bestimmten Loci wurden mit dem Auftreten einer guten oder schlechten Prognose korreliert (Grundy, Telzerow et al. 1994; Klamt, Schulze et al. 1998; Ragnarsson, Eiriksdottir et al. 1999).

Zu diesem Zweck wurden LOH Analysen mit 22 Loci an insgesamt 19 Wilms Tumoren durchgeführt. Vier dieser Tumoren zeigten eine blastemreiche Histologie, neun eine stromareiche, vier waren triphasisch und zwei Tumoren zeigten eine Standardhistologie ohne bekannte Subklassifikation. Um sicherzustellen, daß ein als LOH gewertetes Ergebnis auch tatsächlich zutreffend ist und es sich nicht um ein falsch positives Ereignis handelt, wurde die Schwelle, ab der ein LOH-Ereignis als solches gewertet wurde, sehr hoch angesetzt. Damit wurde zwar riskiert, daß einige Ereignisse nicht detektiert werden konnten, jedoch wurde die Sicherheit stark vergrößert, daß als LOH aufgenommene Werte auch tatsächlich zutreffen.

Die Ergebnisse zeigten LOH-Ereignisse auf den Chromosomen 1 und 11 nur bei stromareichen Tumoren. Die Chromosomen 7 und 16 zeigten LOH-Ereignisse in allen untersuchten histologischen Gruppen. Der einzige auf Chromosom 22 untersuchte Locus wies nur in blastemreichen und triphasischen Tumoren ein LOH-Ereignis auf. Leider erwiesen sich einige der Marker bei vielen Patienten als nicht informativ, was die Zahl der für die Auswertung zur Verfügung stehenden Tumoren weiter verkleinerte. Um eine definitive Aussage treffen zu können, ob sich die Tumorhistologie mit dem Auftreten von LOH-Ereignissen in eine statistisch signifikante Relation setzen läßt, müßten sowohl die Patientengruppen, als auch die Anzahl der untersuchten Loci erweitert werden. Es läßt sich jedoch vermuten, daß LOH-Ergebnisse im Bereich der Chromosomen 1 und 11 verstärkt zur Bildung von stromareichen Tumoren führen, während die vorliegenden Ergebnisse nicht erlauben, die LOH-Ereignisse in anderen Loci direkt mit einer histologischen Subklassifikation in Verbindung zu setzen. Dieses Ergebnis stimmt auch mit dem Resultat der Mutationsanalyse überein, nach der eine Mutation des *WT1*-Gens auf Chromosom 11 vermehrt zur Bildung stromareicher Tumoren führt. Die zu Beginn aufgestellte Hypothese, nach der das Two-Hit-Modell von Knudson hauptsächlich als eine Erklärung für die Entstehung stromareicher WT angesehen werden sollte und für die anderen Subklassifikationen andere Erklärungsmodelle herangezogen werden müssen, wird hiermit also weiter bestärkt.

Um die Wirkung von LOH-Ereignissen bei triphasischen Tumoren näher zu untersuchen wäre es von Vorteil, die einzelnen Zellarten durch Mikrodissektion voneinander zu trennen und einzeln zu analysieren. Um eine solche Analyse zu ermöglichen, müßte jedoch aufgrund der geringen DNA-Mengen, die nach einer Mikrodissektion gewonnen werden, eine Amplifikation der gesamten DNA vor eine spezifische CA-Repeat-Marker PCR geschaltet werden, was aber zu einer Verfälschung des Ergebnisses durch die erste PCR führen könnte. Es wäre jedoch interessant, festzustellen, ob die Verteilung der LOH-Ereignisse in den unterschiedlichen Zelltypen der triphasischen Tumoren mit der Verteilung von LOH-Ereignissen in den Zelltypen der anderen Tumorgruppen übereinstimmt. Wäre dieses der Fall, würde die Vermutung bestätigt, daß bestimmte Loci, an denen LOH gefunden wurde jeweils für eine ganz bestimmte histologische Ausrichtung des Tumor verantwortlich zu machen wäre.

6.2 Etablierung der Methode der komparativen genomischen Hybridisierung (CGH)

Die CGH ist eine Methode, die es ermöglicht, eine cytogenetische Untersuchung an soliden Tumoren durchzuführen, deren Zellen nur schwer oder gar nicht in Kultur zu nehmen sind. Zellen, die mitotisch aktiv sind, müssen außerdem nicht unbedingt repräsentativ für den Tumor sein. Die Bedeutung der CGH ergibt sich dabei aus der Tatsache, daß für eine genomweite Untersuchung auf Chromosomenaberrationen im Gegensatz zu Untersuchungen wie beispielsweise der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) keine vorherigen Kenntnisse über genetische Veränderungen oder die Herstellung einer Vielzahl aufwendiger Sonden notwendig sind. In der CGH

wird direkt aus dem Tumor isolierte DNA verwendet, und somit die Notwendigkeit einer Inkulturnahme der Zellen entbehrlich. Die CGH kann dabei Deletionen und Amplifikationen der einzelnen Chromosomenbereiche nachweisen. Ein Nachweis einer Insertion oder einer reziproken Translokation ist nicht möglich, da nur das Verhältnis der hybridisierten DNA-Mengen von Tumor zu Kontroll DNA detektiert wird.

Auch an Wilms Tumoren wurden bereits erfolgreiche CGH-Analysen durchgeführt (Steenman, Redeker et al. 1997; Hing, Lu et al. 2001).

Für die Durchführung einer erfolgreichen CGH-Analyse müssen unterschiedliche Faktoren erfüllt sein. Eine der wichtigsten Grundvoraussetzungen ist die gute Markierung der DNA. Der entscheidende Vorteil der CGH mit direkter Fluoreszenzmarkierung der Tumor und der Kontroll DNA im Gegensatz zu der Biotin/Digoxigenin-gekoppelten Markierung mit anschließender Methode der Detektion über fluoreszenzmarkierte Antikörper ist daher die Kontrollierbarkeit dieses Schrittes durch die Eigenfluoreszenz der Nukleotide. Diese Überprüfung ist bei der indirekten Markierung nicht möglich. Zwar kann auch hier der erfolgreiche DNase Verdau durch den Auftrag auf ein Ethidiumbromidgel überprüft werden, jedoch muß dies nicht zwangsläufig auch einen gelungenen Einbau der markierten Nukleotide bedeuten. Ein weiterer Vorteil der direkten Markierung liegt neben dem geringeren Zeitaufwand die ebenfalls verminderte Fehlerhäufigkeit der direkten Markierung. Bei der indirekten Markierung erfolgt die Detektion über die Inkubation mit einem Brückenantikörper gegen Biotin bzw. gegen Digoxigenin, der anschließend durch einen weiteren Antikörper, der mit FITC bzw. TRITC markiert ist, detektiert wird. Der Vorteil dieser Methode ist sicherlich eine Verstärkung des erhaltenen Signals gegenüber der direkten Markierung. Allerdings liegt genau darin auch einer der möglichen Nachteile der Methode: ein fehlerhaft zu Beginn aufgetretenes Ungleichgewicht in der Markierung würde durch diese Signalverstärkung ebenfalls verstärkt und dadurch zu einer größeren Ungenauigkeit führen.

Der zweite wichtige Punkt für eine effektive Durchführung der CGH ist die Herstellung einwandfreier Metaphasenpräparate. Eine Testreihe an unterschiedlichen Testpersonen unseres Institutes machte deutlich, daß nicht jede Blut DNA gleichermaßen geeignet ist, um Lymphozytenzellkulturen anzulegen und Chromosomen daraus zu präparieren. Die Kontroll DNA sollte im Idealfall von der gleichen Person gewonnen werden, wie die Chromosomenpräparate, da sich mögliche Hybridisierungsartefakte dadurch minimieren. Andererseits ist die Gewinnung der Kontroll DNA aus Plazenta eine sehr gute Alternative, aufgrund der hohen daraus zu erzielenden DNA-Konzentrationen.

Der entscheidende Faktor vor einem Einsatz der CGH als Routinemethode sowohl in Forschung als auch in der Diagnostik ist in jedem Fall eine Standardisierung des Protokolls, da eine vergleichende Analyse eines Tumorkollektives nur auf dieser Basis erfolgen kann. Zusätzlich benötigt man für die Auswertung einer CGH-Analyse ein großes Maß an cytogenetischer Erfahrung, da eine Karyotypisierung der Chromosomen anhand einer DAPI-Färbung Grundlage der korrekten Auswertung darstellt. Weil sich diese Form der Karvotypisierung als deutlich komplizierter erweist, als beispielsweise eine Karyotypisierung auf Grundlage einer G-Bänderung, ist sie von unerfahrenen Cytogenetikern schwer durchführbar. Leider war es nach der erfolgreichen Etablierung der Methode nicht mehr möglich, im Rahmen dieser Arbeit eine Untersuchung an einer geeignet großen Gruppe von Tumoren durchzuführen und auszuwerten. Ziel weiterführender Untersuchungen sollte es aber in jedem Fall sein, eine CGH-Analyse an Gruppen von stromareichen und blastemreichen Wilms Tumoren im Vergleich durchzuführen, um die Palette der möglichen Analysen zur Klassifizierung dieser histologischen Gruppen auch auf die Cytogenetik auszuweiten und somit abzurunden.

6.3 Untersuchung der Proteinexpression in Wilms Tumoren

Die Proteinausstattung der unterschiedlichen Tumoren sollte weitere Anhaltspunkte für eine Klassifizierung der Tumoren liefern. Dabei war neben der Detektion und Eingrenzung chemotherapierelevanter Faktoren auch die entwicklungsbiologische Einordnung der beiden Tumorkomponenten Stroma und Blastem ein wichtiges Ziel. Die immunhistochemischen Analysen der Tumoren wurden also in zwei Richtungen verfolgt. Zum ersten wurde mit beiden Tumortypen ein Vergleich angestellt, in dem entwicklungsstadienspezifische Proteine miteinander und mit ihrer Expression im Laufe der normalen Nierenentwicklung verglichen werden sollten; zum anderen tumorassoziierte wurden Faktoren an nicht therapierten und an chemotherapieresistenten blastemreichen Tumoren untersucht, um zu überprüfen, ob man dadurch Hinweise auf die Entstehungsmechanismen der blastemreichen Tumoren und die Bildung von Chemotherapieresistenzen gewinnen könnte.

6.3.1 Entwicklungsbiologische Einordnung von Stroma und Blastem anhand immunhistochemischer Analysen

Es erfolgte zunächst eine Datenbanküberprüfung (Kidney Development Database 2001; http://golgi.ana.ed.ac.uk/kidhome.html) der Proteinexpression im Verlauf der normalen Nierenentwicklung. Aus den erhaltenen Ergebnissen wurden einige Faktoren ausgewählt, die eine möglichst genaue Unterscheidung zwischen den unterschiedlichen Entwicklungsstadien erlaubten. Mit den für diese Proteine spezifischen Antikörpern wurde eine immunhistochemischen Analyse des Tumorkollektivs durchgeführt. Dabei wurden Serienschnitte untersucht, in denen jeweils einem Schnitt die spezifischen Tumorzellen an durch einen zelltypspezifischen Antikörper markiert wurden. Bei den blastemreichen Wilms Tumoren wurde dafür ein WT1-Antikörper verwendet und bei den stromareichen Wilms Tumoren ein Antikörper gegen den Muskelmarker Desmin. Die Ergebnisse sind nur für die Zellen dargestellt, die für den zur Identifizierung verwendeten Antikörper positiv waren.

Das Ergebnis erlaubt nur zum Teil eine Einordnung der Zelltypen in den Entwicklungsverlauf während der Nierenentwicklung. Auf jeden Fall ist aber eine deutliche Trennung zwischen den WT1-positiven Zellen der blastemreichen Tumoren und den Desmin-positiven Zellen der stromareichen Tumoren zu erkennen, die den Unterschied der Differenzierung der Stromazellen im Gegensatz zu den Blastemzellen verdeutlicht. Während der frühen Nierenentwicklung werden die Proteine Collagen I, Fibronectin und Vimentin recht stark exprimiert, zu Beginn der Kondensation und Epithelialisierung, der die Bildung der S-förmigen Körperchen folgt, wird die Expression dieser Proteine abgeschaltet und statt dessen werden verstärkt Collagen IV und Laminin gebildet. Das immunhistochemische Muster der stromareichen Tumoren zeigt eine deutliche Expression von Collagen IV und Laminin, allerdings sind sowohl Fibronectin als auch Vimentin ebenfalls stark exprimiert. Eine Expression von Collagen I ist nicht oder nur schwach zu erkennen. Diese Kombination des Proteinexpressionsmusters läßt eine etwaige Einordnung der Stromazellen zum Zeitpunkt der späten Stammzellbildung bzw. der frühen Epithelialisierung vermuten. Bei der Betrachtung der Marker, die in "Stroma"-Zellen exprimiert werden, zeigt sich, daß es sich nicht um Zellen innerhalb einer normalen Nierenentwicklung handelt, da eine Expression von Desmin in der normalen Niere zu keinem der erwähnten Zeitpunkte zu beobachten ist, vielmehr liegt offenbar eine gestörte Differenzierung in Muskelzellen vor. Welche der entwicklungsstadienspezifischen Faktoren nun als Hinweis auf die entwicklungsbiologische Klassifizierung gewertet werden können, und welche als Folge der zum Tumor führenden Entwicklungsstörung verändert auftreten, bleibt zu untersuchen.

Die Blastemzellen, zeigen ein im Gegensatz zu den Stromazellen stark unterschiedliches Proteinmuster. Hier sind lediglich Vimentin, in einigen Fällen Fibronectin und in wenigen Ausnahmen Laminin exprimiert. Die übrigen Proteine (Collagen I und IV, sowie in den meisten Fällen Laminin) zeigen keine Expression. Das Expressionsmuster, das sich durch die immunhistochemische Analyse darstellt, deutet ziemlich sicher auf ein früheres Entwicklungsstadium der Blastemzellen, etwa zum Zeitpunkt der beginnenden Stammzellbildung oder früher hin. Möglicherweise handelt es sich um noch wenig differenzierte induzierte Zellen, die je nach dem Stand der Differenzierung zum Zeitpunkt der Tumorentnahme genauen unterschiedliche Differenzierungsmarker präsentieren.

Eine genaue Betrachtung der Proteinexpression bei den blastemreichen Tumoren wird durch die häufig sehr schlecht erhaltene Histologie der untersuchten Gefrierschnitte massiv erschwert. Eine definitive Aussage über die entwicklungsbiologische Einordnung wäre in einigen Fällen vermutlich durch die Verwendung von Paraffinschnitten möglich. Diese standen für die Erstellung dieser Arbeit jedoch nicht zur Verfügung.

Als weiterer Punkt erfolgte eine Betrachtung der Expression von Cytokeratin in den blastemreichen Tumoren. Uninduzierte Zellen des metanephritischen Mesenchyms exprimieren noch kein Cytokeratin. Die Expression von Cytokeratin deutet vielmehr auf eine bereits erfolgte Induktion und eine beginnende epitheliale Differenzierung des Gewebes hin, in diesen Zellen sollte eine cytoplasmatische Lokalisation des Cytokeratins zu erkennen sein (Holthofer, Miettinen et al. 1984). Cytokeratin ist in den chemotherapierten blastemreichen Wilms Tumoren sehr deutlich exprimiert und auch in einigen primäroperierten Tumoren. Zwei primäroperierte Tumoren zeigen keine positive Antikörperreaktion. Da die Blastemzellen der chemotherapierten Tumoren chemotherapieresistent sind, stellt sich bei diesem Befund die Frage, ob die Bildung von Cytokeratin deshalb mit dem Vorhandensein einer Chemotherapieresistenz assoziiert werden kann, oder ob es sich eventuell um eine Umdifferenzierung der Blastemzellen durch die Chemotherapie handelt. Auch die Möglichkeit, daß in der Gruppe der blastemreichen Tumoren unterschiedlich weit differenzierte Stadien vorhanden sind, ist nicht auszuschließen. Die Behandlung der Tumoren mit Chemotherapeutika könnte auch darauf einen Einfluß haben. Diese Frage kann aufgrund der geringen Größe des Patientenkollektivs leider nicht erschöpfend geklärt werden. Eine vergleichende Betrachtung der Cytokeratinexpression in chemotherapierten und primäroperierten Wilms Tumoren in einem größeren Patientenkollektiv wäre zur Klärung dieser Fragestellung notwendig.

6.3.2 Immunhistochemische Überprüfung von chemotherapieresistenz- und apoptoseassoziierten Proteinen an blastemreichen Tumoren

Chemotherapieresistente Tumoren mit blastemreicher Histologie stellen eine Gruppe von Tumoren mit extrem schlechter Prognose dar. Die Blastemzellen sind noch weitgehend undifferenzierte Zellen, die sich durch eine starke Proliferation auszeichnen, dadurch sind Blastemzellen für gewöhnlich für eine Chemotherapie sehr sensitiv. Gerade aus diesem Grunde ist das Vorhandensein von vorwiegend blastemreichen Arealen bei einem chemotherapierten Tumor ein äußerst negativ zu wertendes Zeichen. Ein Grund hierfür ist auch die makroskopische Beschaffenheit eines blastemreichen Tumors. Während stromareiche Tumoren meist eingekapselt und auf die Niere beschränkt vorliegen, können blastemreiche Tumoren durch das Fehlen einer Kapsel und die hohe Proliferationsrate (eine Verdopplung des Tumors kann in nur 7 Tagen erfolgen) ungehindert in die Niere einwachsen. In Verbindung mit Chemotherapieresistenz kann es also sehr schnell zu chemotherapieresistenten Rezidiven kommen.

Um Hinweise auf die Entstehung von Chemotherapieresistenz in blastemreichen Wilms Tumoren zu bekommen, wurden spezielle chemotherapieresistenz- und apoptoseassoziierte Proteine auf eventuelle Überexpression untersucht. Ausgangspunkt dabei war die Analyse der Proteinexpression von BCI-2 und IGF II. Hinweise auf eine Hemmung der Apoptose in Wilms Tumor Zellen und somit einer Erhöhung der Chemotherapieresistenz durch Überexpression von BCI-2 und IGF II

118

wurden in der Promotionsarbeit von V. Schumacher (Schumacher 1998) bei stromareichen Tumoren mit einer Mutation im WT1-Gen gefunden. Durch die apoptosehemmende Wirkung dieser Gene kann es zur Tumorbildung kommen, deshalb spricht man auch von Protoonkogenen. Die Expression von BCI-2 und IGF II wurde schon früher mit erhöhter Chemotherapieresistenz entweder in myeloischen Leukämien (Maung, MacLean et al. 1994) oder in Myelomzellinien (Xu, Gardner et al. 1997) in Verbindung gebracht. Ob dieser Mechanismus auch für blastemreiche Wilms Tumoren in Frage kommt, sollte hier überprüft werden. Auch hier kam die schlechte Histologie der blastemreichen Tumorgefrierschnitte erschwerend hinzu. Eine genaue Bestimmung der Proteinlokalisation war häufig nicht möglich. Es zeigte sich zwar in fast allen blastemreichen Tumoren mit einer Ausnahme eine starke Expression von IGF II, die BCI-2 Expression konnte aber teilweise nicht deutlich gemacht werden, oder es war nicht zu erkennen, ob sich das positive Ergebnis tatsächlich auf die Blastemzellen beschränkte, oder durch eine unspezifische Antikörperreaktion hervorgerufen wurde. Auch hier würde eine erneute Überprüfung der Ergebnisse an Paraffinschnitten möglicherweise bessere Erkenntnisse bringen.

Des weiteren wurden Untersuchungen mit p53 und MDR-1 durchgeführt. P53 spielt Apoptoseinduktion. ebenfalls eine große Rolle bei der So haben Gentherapieexperimente gezeigt, daß die Bereitstellung eines funktionellen p53-Proteins in anaplastischen WT Zellinien zu einer verminderten Lebensfähigkeit und zu einer erhöhten Apoptose der Zellen führt (Delatte, Hazen-Martin et al. 2001). Im Zusammenhang mit einer ungünstigen Histologie von Wilms Tumoren werden Mutationen im *p*53-Gen mit einer schlechten Prognose der Patienten in Verbindung gebracht (Beniers, Efferth et al. 2001). Die beiden Proteine MDR1 und p53 werden mit einer verminderten Sensitivität der untersuchten Wilms Tumoren für Chemotherapeutika korreliert (Mayo, Wang et al. 1999; Ramachandran, Melnick et al. 2000). Im Rahmen dieser Untersuchung sollte auch nach Hinweisen auf eine eventuelle Bedeutung beiden der der Faktoren bei Bildung von chemotherapieresistenten, blastemreichen WT gesucht werden. Auch hier ergaben sich große Probleme bei der Auswertung durch die schlechte Histologie der Gefrierschnitte von blastemreichen Wilms Tumoren. Ein einheitliches Muster der Proteinexpression konnte nicht ermittelt werden. Eine Ergebnisüberprüfung an Paraffinschnitten könnte auch hier nähere Aufschlüsse bieten. Der Nachweis von

p53 in zumindest einigen der blastemreichen Tumoren deutet möglichwerweise auf eine Mutation des p53-Gens hin. Mit dem hier gewählten Antikörper kann zwar nicht immunhistochemisch nachgewiesen werden, ob das Protein mutiert ist, aber das Wildtyp-Protein von p53 ist normalerwiese zu instabil, um auf diese Weise nachgewiesen zu werden. Der Nachweis von p53 ist also als ein Hinweis zu werten, der auf eine Beteiligung dieses Faktors bei der Entstehung von blastemreichen Wilms Tumoren hindeutet. Ein Zusammenhang zwischen der Expression von p53 und der erhöhten Expression eines "Multidrug resistance releated Protein" (MRP1) vor allem in Epithel und Blastemzellen bei Wilms Tumoren wird schon bei Efferth und Mitarbeitern (Efferth, Thelen et al. 2001) vermutet. Andere Untersuchungen bringen eine Mutation im p53-Gen lediglich mit der Entstehung von anaplastischen Wilms Tumoren und einer schlechten Prognose in Verbindung (Hing, Lu et al. 2001). Eine weitere Untersuchung von p53 in Bezug auf seine Beteiligung an dem Entstehen von blastemreichen Tumoren und der verminderten Chemotherapiesensitivität der Tumoren wäre in jedem Fall interessant.

6.4 RNA-Analysen an Wilms Tumoren

Die bisherigen Untersuchungen haben gezeigt, daß eine Mutation im *WT1*-Gen meist zur Bildung von stromareichen Tumoren führt, dieses Ergebnis wird auch durch die LOH-Analysen gestützt. Durch immunhistochemische Betrachtung der Proteinausstattung der einzelnen histologischen Gruppen, konnten weitere Hinweise auf Faktoren gefunden werden, die an der Entstehung von Wilms Tumoren beteiligt sein könnten. Eine Vervollständigung sowohl der entwicklungsbiologischen Klassifizierung der Zelltypen "Stroma" und Blastem, als auch der Aufdeckung der Entstehungsmechanismen von Wilms Tumoren mit blastemreicher Histologie und dem Auftreten von Chemotherapieresistenzen, sollte anhand von Analysen des Transkriptoms der einzelnen Tumorkomponenten erfolgen.

6.4.1 Laser Capture Mikrodissektion und Envision Immunhistochemie

Trotz der Einteilung der Wilms Tumoren in die histologischen Gruppen der stromareichen und blastemreichen Tumoren bleibt jeder Tumor in sich heterogen. Diese, auch in den IHC Untersuchungen deutlich zum Vorschein tretende Tatsache, machte es notwendig, für eine genaue Analyse der RNA-Ausstattung der einzelnen Zelltypen, diese voneinander zu trennen, um sie einzeln betrachten zu können. Hierfür wurde eine laserbasierte Mikrodissektionsmethode (LCM) eingesetzt, mit der die einzelnen Zellareale durch den Beschuß mit einem Niedrigenergie-Infrarot-Laser an einen Transferfilm gebunden und auf diesem anschließend der RNA-Isolation zugeführt werden können.

Um sicherzustellen, daß nur die gewünschten Zellen gepickt wurden, war es nötig, zuvor eine immunhistochemische Markierung mit zelltypspezifischen Antikörpern (WT1 für Blastemzellen und Desmin für Stromazellen) durchzuführen. Da eine unmodifizierte IHC nach dem "Labelled StreptAvidin Biotin-Kit" (LSAB-Kit), wie sie für die IHC Analysen sonst standardmäßig eingesetzt wurde, schon aufgrund ihrer Dauer von ca. 2,5h, eine anschließende RNA-Isolation unmöglich machte, mußte eine modifizierte Methode eingesetzt werden. Ziel der Modifikation war, die Zeit zu verkürzen und die RNA zu schonen, um eine Degradation zu vermeiden und das Signal trotzdem nicht signifikant abzuschwächen, so daß auch an nicht eingedeckelten Schnitten, wie sie für die LCM benötigt wurden, eine Unterscheidung der Zelltypen möglich blieb. Eine Möglichkeit dafür bot die Envision-Methode der Firma DAKO, mit der die Reaktionszeit für die gesamte IHC auf unter 15 Minuten reduziert werden konnte und somit eine RNA-Isolation möglich blieb. Da jedoch auch bei der verkürzten IHC ein Qualitätsverlust der RNA nicht zu vermeiden war, wurde in allen Fällen, in denen dies möglich war (z.B. bei deutlich erkennbaren Blastemnestern, deren WT1-Expression vorher in einem Serienschnitt überprüft werden konnte), auf eine Antikörperfärbung verzichtet.

6.4.2 Detektion differentiell exprimierter Sequenzen anhand von subtraktiver Hybridisierung

Durch die Mutationsanalyse konnte eine Beteiligung von Mutationen im *WT1*-Gen an der Entstehung von Wilms Tumoren mit blastemreicher Histologie weitgehend ausgeschlossen werden. Interessant war bei dieser Gruppe von Tumoren, daß diese normalerweise chemosensitiv sind, aber einige wenige resistente Tumoren auftreten, die dann stets mit einer schlechten Prognose korreliert sind. Zur Identifikation von Faktoren, die die Resistenz von blastemreichen Wilms Tumoren bewirken, wurde die Methode der subtraktiven Hybridisierung gewählt. Diese Technik stellt eine Möglichkeit dar, bei der zwei RNA-Populationen miteinander verglichen werden

können, um so Sequenzen zu isolieren, die nur in einer der beiden Populationen exprimiert werden.

Durch den Vergleich einer RNA-Probe aus Blastemzellen eines Tumors mit präoperativer Chemotherapie mit einer RNA-Probe aus Blastemzellen eines primäroperierten Tumors, sollten diejenigen Sequenzen gewonnen werden, die mit einem Entstehen von Chemotherapieresistenz, oder direkt mit der Chemotherapie in Verbindung gebracht werden können. Die Schwierigkeit bei dieser Untersuchung lag darin, daß die zu untersuchenden Tumorgruppen nicht homogen waren. Zwar kann in der Gruppe der chemotherapierten Tumoren, davon ausgegangen werden, daß die erhaltenen Blastemzellen chemotherapieresistent sind, die Vergleichsgruppe hingegen kann hingegen sowohl nicht resistente als auch resistente Tumoren enthalten.

Die erhaltenen Ergebnisse weisen also vermutlich eher auf eine eventuelle Beziehung zur Chemotherapie selber als zu Entstehungsmechanismen für die Chemotherapieresistenz hin. Diese Vermutung wird auch dadurch verstärkt, daß sich einer der differentiell exprimierten Faktoren die Enolase cDNA, die im chemotherapierten Tumor FG differentiell exprimiert ist, bei einer Überprüfung einer Datenbank, die Chemotherapeutika zu ihrer Wirkung auf die Genexpression in behandelten Zellinien in Verbindung setzt, angegeben ist. Die Expression der wird betrachteten Datenbank Enolase laut der durch verschiedene Chemotherapeutika angehoben. Zwar zeigt die Datenbank (Scherf, Ross et al. 2000) lediglich die Wirkung von Chemotherapeutika auf ausgesuchte Zellinien, die nicht aus Wilms Tumoren gewonnen wurden, jedoch ist das Ergebnis als ein möglicher Hinweis darauf zu werten, daß die differentielle Expression der Enolase mRNA, und damit auch ihres Homologes der RNA des c-Myc-Promotor-Binding Protein 1 durch die Chemotherapie induziert sein kann.

Um weitere Aussagen über die Relevanz der differentiell exprimierten Sequenzen treffen zu können, wäre außerdem eine Erweiterung der Untersuchungsgruppe auf ein größeres Patientenkollektiv notwendig, als es im Rahmen dieser Arbeit möglich war. Ein entscheidender Nachteil der subtraktiven Hybridisierung ist, neben dem häufig auftretenden Effekt der falsch positiven Subtraktionsergebnisse der große

zeitliche Aufwand der Methode, und die Tatsache, daß jeweils nur ein einzelnes Tumorpaar miteinander verglichen werden kann. Für ein größer angelegtes Screening zweier Gruppen im Vergleich zueinander ist diese Methode dadurch nur bedingt geeignet. Abschließend ist zu cDNA-Subtraktionsanalyse zu sagen, daß die Ergebnisliste zum Zeitpunkt der Anfertigung dieser Arbeit nicht als abgeschlossen angesehen werden kann, da bei jeder neuen Datenbankuntersuchung weitere Sequenzhomologien gefunden wurden, aber immer noch unbekannte Sequenzen vorlagen. Diese sollten in weiteren Datenbankvergleichen weiter beobachtet werden.

6.4.3 Erstellung von Expressionsprofilen an Wilms Tumoren anhand von cDNA-Arrays

Eine, für den Vergleich größerer Tumorgruppen weitaus besser geeignete Methode, ist die Erstellung von RNA-Expressionsprofilen anhand von Makroarrays. Mit den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Atlas Human Cancer 1.2 Arrays bietet die Firma Clontech Nylon basierte Arrays, auf die jeweils 1176 ausgewählte Gensequenzen gespottet sind, die in Verbindung zur Krebsentstehung gebracht werden können. Laut Firmenangaben sollen Kreuzhybridisierungen aufgrund der Auswahl der Sequenzen ausgeschlossen sein.

Auch die für die Array Analysen verwendeten RNAs wurden aus mikrodissektiertem Material gewonnen. Damit wurde sichergestellt, daß die Expressionsprofile eine genaue Abbildung der RNA-Expression der gewünschten Zellart darstellen, ohne daß eine Kontamination mit umliegendem Gewebe in Kauf genommen werden mußte.

Um die Gencluster, die für die Tumorzellen aus stroma- und blastemreichen Tumoren spezifisch sind, zu identifizieren, wurde eine Clusteranalyse durchgeführt. Die dadurch erlangte Ergebnismenge kann aufgrund ihrer Größe leider nicht komplett in dieser Arbeit wiedergegeben werden.

Aufgrund der großen Datenmenge und der Array Beschaffenheit ist aber ohnehin anzunehmen, daß viele der untersuchten cDNA-Sequenzen nicht Wilms Tumor spezifisch sind und somit zu einer Verschiebung des Ergebnisses bezüglich der Klassifizierung histologischer Gruppen führen. Um eine nähere Aussage treffen zu können, müssen die Faktoren, die spezifisch für die einzelnen Gruppen erscheinen, herausgefiltert und an einem größeren Patientenpool untersucht werden, um somit eine tatsächliche Relevanz festzustellen. Die mittels der Clusteranalyse-Software ausgewerteten Daten mußten also geprüft werden, und nur die für die Zielsetzung dieser Arbeit interessant erscheinenden Daten werden im Folgenden behandelt.

6.4.3.1 Unterscheidung der Expressionsprofile zwischen Stroma und Blastem

Einige cDNAs zeigen in ihrem Expressionsmuster einen deutlichen Unterschied, zwischen den untersuchten Blastemzellen und den Stromazellen. So kann man zum Beispiel den Transkriptionsfaktor *WT1* durch seine in Blastemzellen deutlich stärker als in Stromazellen ausgeprägte Expression als guten Unterscheidungsmarker zwischen den beiden histologischen Gruppen betrachten. Diese Ergebnisse werden durch die immunhistochemischen Analysen unterstrichen. Andere Faktoren, wie zum Beispiel Vimentin sind in stromareichen und blastemreichen Tumoren gleichmäßig exprimiert, die Bedeutung solcher Faktoren liegt vermutlich eher in der Differenzierung der Zellen, als in der Pathogenese der Tumoren und weist damit auch auf die trotz aller Unterschiede gemeinsamen Schritte der Entwicklung der Zellen hin.

Die im Vergleich zu stromareichen Wilms Tumoren verminderte Expression des Notch Liganden DLK in blastemreichen Wilms Tumoren weist auf eine Störung dieses Signaltransduktionsweges bei ihrer Entstehung hin. Der Notch Signaltransduktionsweg spielt eine wichtige Rolle im Laufe der embryonalen Entwicklung; hier entscheidet sich durch ein Zusammenspiel zwischen den Membranproteinen Notch als Rezeptor und Delta als Ligand, ob embryonale Vorläuferzellen während der Entwicklung sich zu Neuroblasten oder Epithelzellen entwickeln. Eine Verbindung des Signaltransduktionsweges mit der Krebsentstehung ist bereits für eine besonders aggressive Form der Leukämie, das myeloische dysplastische Syndrom (MDS) beschrieben. In der Pathogenese des MDS spielt die Überexpression des Delta Like Protein (DLK) vermutlich eine entscheidende Rolle (Miyazato, Ueno et al. 2001). Für exogene PTEN exprimierende Krebszellen des Endometriums lassen die Ergebnisse von Microarray-Analysen eine Beteiligung einer Transaktivierung unterschiedlicher Mitglieder des NOTCH-Pathways an der

124

Tumorentstehung vermuten (Matsushima-Nishiu, Unoki et al. 2001). Auch Rangarajan und Mitarbeiter (Rangarajan, Talora et al. 2001) beschreiben ein Auftreten epidermaler Hyperplasie und eine unkontrollierte Expression multipler Differenzierungsmarker durch eine Deletion im Notch1 Gen. In primären Keratinocyten ist Notch in vitro notwendig für die Induktion der p21WAF1/Cip1 Expression, aktiviertes Notch löst also eine Wachstumshemmung der Zellen durch die Induktion der p21WAF1/Cip1 Expression aus. Da die Blastemzellen, genau wie die Keratinocyten eine embryonale Zellgruppe darstellen, die weiterer Differenzierung unterliegt und auch hier p21WAF1/Cip1 nur schwach exprimiert wird, könnte ein mechanistischer Zusammenhang gesehen werden.

Einen weiteren wichtigen Hinweis auf den Mechanismus der Entstehung von blastemreichen Tumoren, gibt die gesteigerte Expression des Protoonkogens Cyclin D2. Die onkogene Funktion von Cyclin D2 wurde schon 1994 von Sinclair et al. aufgrund seiner gesteigerten Expression bei der Immortalisierung von primären B-Lymphozyten durch den Epstein-Barr-Virus vermutet (Sinclair, Palmero et al. 1994).

In gastrointestinalen Karzinomen läßt sich eine enge Verbindung zwischen einer Überexpression von Cyclin D2 und einer schlechten Prognose erkennen. Eine gesteigerte Rolle hierbei spielt außerdem die Lokalisation des Cyclin D2 im Cytoplasma, die in immunhistochemischen Untersuchungen festgestellt wurde und durch die es zu einer gesteigerten Proliferation der Krebszellen kommt. Eine Lokalisation im Kern konnte nicht mit einer schlechten Prognose in Verbindung gebracht werden (Takano, Kato et al. 2000). Die gleiche Arbeitsgruppe fand auch in einer Untersuchung an Brustkrebs, eine gesteigerte Cyclin D2 Expression in Verbindung mit cytoplasmatischer Lokalisation in einem Drittel der analysierten Fälle. Eine sich daraus ergebende Frage, die in weiteren Untersuchungen an einem größeren Patientenkollektiv geklärt werden müßte, wäre also, ob sich die Lokalisation von Cyclin D2 im Cytoplasma der Blastemzellen auch bei Wilms Tumoren nachweisen läßt, und welchen Einfluß diese auf die Prognose des Krankheitsverlaufs haben könnte. Eine Verbindung zwischen der Expression von Cyclinen, sowie Cyclin abhängigen Kinasen (wie der in chemotherapierten Tumoren gesteigert exprimierten CDK2) mit dem Notch Signaltransduktionsweg stellen Ronchini et al. (Ronchini and Capobianco 2001) her. Sie gehen davon aus, daß Notch an der Regulation von Cyclin D1 und CDK2 beteiligt ist.

Die Regulation von Cyclin D2 steht zusätzlich in enger Verbindung mit Myc, da es sich um ein direktes Zielgen von Myc handelt (Bouchard, Thieke et al. 1999). Diese Verbindung wirft wiederum ein interessantes Licht auf die in der subtraktiven Hybridisierung gefundene differentielle Expression eines Myc-Promotor-Binding Proteins, des Myb1; auch dieser Zusammenhang sollte in weiteren Untersuchungen nicht unbeachtet bleiben.

6.4.3.2 Unterschiede zwischen chemotherapierten und nicht chemotherapierten blastemreichen Wilms Tumoren

Um mögliche Hinweise auf chemotherapiebedingte Unterschiede innerhalb der Gruppe der blastemreichen Wilms Tumoren zu erlangen, wurde ein Vergleich der Expressionsprofile aus den Atlas Array Analysen zwischen chemotherapierten und nicht chemotherapierten Tumoren durchgeführt.

Der Vergleich eines einzelnen primäroperierten Tumors FG mit zwei chemotherapierten Tumoren (Co und SeS), ist natürlich nicht geeignet, um eine definitive Aussage zu treffen, ob es sich bei den detektierten Faktoren tatsächlich um chemotherapieabhängige Unterschiede handelt. Auch hier treten aber Faktoren in Erscheinung, die stark auf eine Verbindung des Notch Signaltransduktionsweges mit der Bildung von chemotherapieresistenten Tumoren hinweisen. Notch 4 sowie die cyclinabhängige Kinase CDK2 zeigen eine in den chemotherapierten Tumoren erhöhte Expression.

6.4.3.3 Vergleich amplifizierter und unamplifizierter cDNA anhand des Tumors FG

Zur Überprüfung der Zuverlässigkeit der cDNA-Amplifikation durch die SMART-Methode sollte ein Vergleich zwischen amplifizierter cDNA und nicht amplifizierter cDNA des gleichen Tumors durchgeführt werden. Um eine genügend große Menge an RNA für eine direkte Markierung zu bekommen, wurde für den Vergleich eine aus pulverisiertem Tumormaterial gewonnene Probe verwendet. Für diesen Vergleich bot sich besonders der Tumor FG aufgrund seiner äußerst homogenen Struktur an. Diese RNA aus pulverisiertem Material wurde mit, aus Mikrodissektion gewonnenen SMART-amplifizierten Proben verglichen.

Das Ergebnis zeigte, daß durch eine Amplifikation mit SMART durchaus einige Bereiche überrepräsentiert werden, während andere unterrepräsentiert erscheinen. Allerdings sollte nicht außer acht gelassen werden, daß sich ein Problem dadurch ergeben kann, daß die unamplifizierte RNA aus einem pulverisierten Tumorstück gewonnen wurde und somit eine geringe Kontamination mit anderen Zellsorten nicht komplett auszuschließen ist. Die durch die SMART-Amplifikation auftretenden Verschiebungen müssen sich dabei nicht zwangsläufig auf das Array Ergebnis auswirken, da die Gesamtheit der Ergebnisse sich auf SMART amplifizierte Tumorproben bezieht. Die Proben sollten sich soweit sich es um Amplifikationsartefakte handelt, gleich verhalten und somit untereinander weiterhin vergleichbar sein. Auch Untersuchungen der Firma Clontech kamen zu dieser Aussage (laut Informationen des technischen Service der Firma Clontech).

Die hier möglichen technischen Probleme machen es zweifellos um so wichtiger, eine möglichst genaue Verifikation der interessanten Gene durchzuführen. Die immunhistochemische Bestätigung der Resultate stellt dabei sicherlich nur ein Standbein dar. Es bietet sich zusätzlich eine Überprüfung durch eine Realtime RT-PCR an, insbesondere, da diese Technik eine sehr hohe Sensitivität aufweist und man vermutlich mikrodissektiertes Material ohne vorherige Amplifikation einsetzen könnte und so zu genaueren Ergebnissen käme. Diese Methode stand zur Zeit der Anfertigung dieser Arbeit noch nicht zur Verfügung, Versuche in dieser Richtung sind iedoch bereits geplant. Um eine möglichst große Unabhängigkeit der Verifikationsergebnisse durch Realtime RT-PCR zu gewährleisten, sollten diese Untersuchungen nicht mit den von Clontech angegebenen Primersequenzen durchgeführt werden, die für die Herstellung der Arrays verwendet wurden, da eventuell vorhandene Artefakte hierdurch auch auf die Realtime RT-PCR übertragen werden können und so zu einer Ergebnisungenauigkeit führten.

6.5 Schlußfolgerung und Ausblick

Nachdem schon zuvor bekannt war, daß eine Mutation im *WT1*-Gen hauptsächlich für eine Entstehung von stromareichen Wilms Tumoren verantwortlich zu sein scheint, konnte hier bestätigt werden, daß für die Entstehung blastemreicher Tumoren ein anderer Mechanismus postuliert werden muß.

Die Beteiligung von *p53* und *MDR-1* sowie die Beteiligung von *BCl-2* und *IGF II* an der Entstehung der Chemotherapieresistenz von blastemreichen Wilms Tumoren konnte hier nicht eindeutig geklärt werden. Dazu bedürfte es sicherlich einer Untersuchung an einem größeren Patientenpool. Außerdem wäre eine vergleichende Untersuchung von blastemreichen Tumoren vor und nach einer Chemotherapie interessant, um die Gruppe der nicht chemotherapieresistenten Tumoren genauer zu definieren, da nur so ein direkter Vergleich zwischen chemotherapieresistenten und chemotherapiesensitiven Tumoren der gleichen Histologie vorgenommen werden kann. Auch die Frage des Differenzierungsweges und die verwandtschaftlichen Beziehungen zwischen den Tumorzellen in stromareichen und blastemreichen WT könnten auf diesem Weg näher betrachtet werden.

Die Erstellung eines Expressionsprofiles blastemreicher und stromareicher Tumoren läßt vermuten, daß eine Verbindung der Tumorentstehung und der Störung des Notch-Signaltransduktionsweges in blastemreichen Tumoren vorliegt. Eine definitive Aussage, ob dieser Mechanismus eine Rolle bei der Entstehung einer blastemreichen Histologie spielt, konnte jedoch aufgrund der geringen Größe des Patientenpools nicht gemacht werden. Auch ist nicht bekannt, wie die Expression von Notch oder am Notch-Signaltransduktionsweg beteiligten Faktoren im während Nierenentwicklung Die physiologischen Zustand der aussieht. unterschiedliche Expression der beteiligten RNAs kann möglicherweise auf das Tumorgeschehen zurückzuführen sein, es ist aber auch nicht auszuschließen, daß in unterschiedlichen Differenzierungsstadien der Stromazellen den und der Blastemzellen unterschiedliche Expressionen analysierten der Gene als physiologisch normal zu betrachten sind.

Zu den Array Analysen ist zusammenfassend zu sagen, daß sie sicherlich gute Hinweise auf die Beteiligung von verschiedenen Faktoren und Pathways bei der Tumorentstehung und bei der Ausbildung von Chemotherapieresistenzen geben können, in jedem Fall aber eine intensive Betrachtung der Einzelelemente anzuraten ist. Dabei ist nicht außer acht zu lassen, daß eine PCR-Amplifikation der cDNA, wie sie hier notwendig war, zu Verschiebungen führen kann, sie jedoch, wenn die Bedingungen für alle Untersuchungsobjekte gleich gehalten werden, einen Vergleich des Patientenkollektives untereinander nicht beeinträchtigen sollte. Die Resultate müssen jedoch mit der nötigen Vorsicht betrachtet und vor weitergehenden Aussagen und Analysen einwandfrei verifiziert werden. Ein direkter Vergleich zwischen SMART-amplifizierten und nicht SMART-amplifizierten Gruppen, oder Einzelproben sollte somit nicht direkt erfolgen.

Eine weitere Analyse der unterschiedlichen Expressionsprofile und der weiteren Unterscheidungskriterien zwischen den histologisch verschiedenen Gruppen könnte in Zukunft dazu beitragen, die Differenzierungsvorgänge und die dabei auftretenden Fehler bei der Tumorentstehung besser zu verstehen und dadurch eine genauere Klassifizierung der Tumoren (zum Beispiel durch diagnostische Microarrays) zu ermöglichen, deren Ergebnis in einer individuell besser angepaßten Chemotherapie und somit einer weiteren Steigerung der Heilungsrate von Wilms Tumoren enden könnte.

Ausblicke auf zukünftige Untersuchungen

Auf der Grundlage der erlangten Ergebnisse sollten weitere Untersuchungen durchgeführt werden. Dazu gehören zum Beispiel:

- Realtime RT-PCR Analyse der Gene, deren Beteiligung an der Entstehung der blastemreichen Tumoren aufgrund der Array-Analysen wahrscheinlich erscheint, wie zum Beispiel DLK, Notch, Cyclin D2.
- Untersuchung weiterer am Notch-Signaltransduktionsweg beteiligter Gene auf ihren Einfluß auf die Tumorentstehung.
- Verifikation und anschließende Zusammenstellung der Unterscheidungsmarker zwischen chemotherapieresistenten und chemotherapiesensitiven Tumoren zu eventuell diagnostisch verwertbaren Microarrays.

7. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Promotionsarbeit ist es, die histologisch unterschiedlichen Gruppen der Wilms Tumoren (stromareiche und blastemreiche WT) besser voneinander abzugrenzen und die Grundlagen der Entstehung von chemotherapieresistenten Wilms Tumoren aufzudecken.

Der Wilms Tumor ist ein hochmaligner embryonaler Mischtumor der Nieren, dessen Entstehung nach dem Two-Hit-Modell von Knudson (1971) durch das Auftreten zweier Mutationen im selben Tumorsuppressorgen (WT1) hervorgerufen wird. Frühere Untersuchungen konnten zeigen, daß eine Mutation des WT1-Gens nur für einen Teil der Wilms Tumoren als Erklärung ausreicht; bei diesen handelt es sich vorwiegend um Tumoren mit stromareicher Histologie. In der vorliegenden Arbeit wurden bei insgesamt 33 Patienten weitere Faktoren für die Entstehung von Wilms Tumoren. sowie Differenzierungsmechanismen von stromareichen und blastemreichen WT und Faktoren, die für den Verlust von Chemotherapiesensitivität verantwortlich sein können, mit Hilfe vielseitiger molekulargenetischer Analysen untersucht und miteinander verglichen.

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit konnten durch eine Mutationsanalyse des *WT1*-Gens und der Promotorbereiche des Gens keine weiteren Mutationen im *WT1*-Gen in blastemreichen Wilms Tumoren nachgewiesen werden.

LOH-Analysen mehrerer, bei Wilms Tumoren häufig veränderter und als potentielle Kandidatenregionen für die Lokalisation weiterer Tumordispositionsgene postulierter Regionen auf den Chromosomen 1, 7, 11, 16 und 22, zeigten eine mögliche Korrelation zwischen einem Verlust der Heterozygosität auf Chromosom 11 und 16 mit einer stromareichen Histologie. Eine Verbindung zwischen LOH der anderen Regionen und dem Auftreten einer bestimmten histologischen Subklassifikation konnte nicht nachgewiesen werden. Für genauere aussagen müßte ein größeres Patientenkollektiv herangezogen werden.

Die Etablierung der Methode der komparativen genomischen Hybridisierung war zwar erfolgreich, konnte aber bisher zu keinen neuen Erkenntnissen führen. Immunhistochemische Untersuchungen zeigten eine Trennung der stromareichen WT von den blastemreichen WT, die sich in der fehlerhaften Differenzierung der Tumorzellen in den stromareichen WT ausdrückt. Auch ist ersichtlich, daß die Gruppe der Zellen in blastemreichen Tumoren weit uneinheitlicher ist, als die der Zellen in den stromareichen Tumoren. Dies ist möglicherweise dadurch zu erklären, daß es sich hierbei um noch wenig differenzierte Zellen handelt, die je nach dem Zeitpunkt der Entnahme des Tumors unterschiedliche genauen Differenzierungsmarker entsprechend ihrer vorbestimmten noch nicht morphologisch manifestierten Differenzierungsrichtung präsentieren. Weitere immunhistochemische Analysen der blastemreichen Tumoren zeigten eine Expression von IGF II, und in einigen Fällen eine Expression von BCI-2, p53 und MDR-1. Eine weitere Untersuchung der Beteiligung dieser Gene am Auftreten der Chemotherapieresistenz wäre in jedem Fall interessant.

Für eine genaue Analyse der RNA-Ausstattung der beiden Zellarten wurden die Blastemzellen und die Stromazellen durch Laser assistierte Mikrodissektion isoliert und getrennt von dem sie umgebenden Gewebe anhand subtraktiver Hybridisierung und mittels Array-Analysen untersucht. Die Ergebnisse weisen möglicherweise auf des Notch-Signaltransduktionsweges eine Beteiligung an der Entstehung blastemreicher Tumoren hin. Auch konnten weitere Faktoren zur Unterscheidung zwischen Blastem und Stroma detektiert werden. Die Gruppe der stromareichen Tumoren zeigte sich ebenfalls wie die der blastemreichen Tumoren als in sich heterogene Gruppe und weist untereinander auch deutliche Unterschiede im Expressionsmuster auf.

Auf Grundlage der hier vorliegenden Ergebnisse sollten die histologisch verschiedenen Gruppen weitergehend klassifiziert werden, um eine genauere Einordnung in eventuell vorzuschlagende genauer definierte Untergruppen vorzunehmen und damit eine individuellere Therapie zu ermöglichen.

131

8. Literaturverzeichnis

Arrigo, S., J. B. Beckwith, et al. (1990). "Better survival after combined modality care for adults with Wilms' tumor. A report from the National Wilms' Tumor Study." <u>Cancer</u> **66**(5): 827-30.

Bardeesy, N., D. Falkoff, et al. (1994). "Anaplastic Wilms' tumour, a subtype displaying poor prognosis, harbours p53 gene mutations." <u>Nat Genet</u> **7**(1): 91-7.

Beckwith, J. B., C. E. Zuppan, et al. (1996). "Histological analysis of aggressiveness and responsiveness in Wilms' tumor." <u>Med Pediatr Oncol</u> **27**(5): 422-8.

Beniers, A. J., T. Efferth, et al. (2001). "p53 expression in Wilms' tumor: a possible role as prognostic factor." <u>Int J Oncol</u> **18**(1): 133-9.

Bouchard, C., K. Thieke, et al. (1999). "Direct induction of cyclin D2 by Myc contributes to cell cycle progression and sequestration of p27." <u>Embo J</u> **18**(19): 5321-33.

Breslow, N., J. B. Beckwith, et al. (1988). "Age distribution of Wilms' tumor: report from the National Wilms' Tumor Study." <u>Cancer Res</u> **48**(6): 1653-7.

Breslow, N., A. Olshan, et al. (1993). "Epidemiology of Wilms tumor." <u>Med Pediatr</u> Oncol **21**(3): 172-81.

Call, K. M., T. Glaser, et al. (1990). "Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus." <u>Cell</u> **60**(3): 509-20.

Coppes, M. J. and K. Pritchard-Jones (2000). "Principles of Wilms' tumor biology." <u>Urol Clin North Am</u> **27**(3): 423-33, viii.

D'Angio, G. J., N. Breslow, et al. (1989). "Treatment of Wilms' tumor. Results of the Third National Wilms' Tumor Study." <u>Cancer</u> **64**(2): 349-60.

Dao, D., C. P. Walsh, et al. (1999). "Multipoint analysis of human chromosome 11p15/mouse distal chromosome 7: inclusion of H19/IGF2 in the minimal WT2 region, gene specificity of H19 silencing in Wilms' tumorigenesis and methylation hyper-dependence of H19 imprinting." <u>Hum Mol Genet</u> **8**(7): 1337-52.

Delatte, S. J., D. J. Hazen-Martin, et al. (2001). "Restoration of p53 function in anaplastic Wilms' tumor." <u>J Pediatr Surg</u> **36**(1): 43-50.

Drummond, I. A., S. L. Madden, et al. (1992). "Repression of the insulin-like growth factor II gene by the Wilms tumor suppressor WT1." <u>Science</u> **257**(5070): 674-8.

Efferth, T., P. Thelen, et al. (2001). "Differential expression of the multidrug resistance-related protein MRP1 in the histological compartments of nephroblastomas." Int J Oncol **19**(2): 367-71.

Figge, A. (1995). "Charakterisiserung und Mutationsanalyse des WT1 Gens und seiner Kontrollregion." <u>Diplomarbeit Ruprecht-Karls Universität Heidelberg</u>.

Gessler, M., A. Poustka, et al. (1990). "Homozygous deletion in Wilms tumours of a zinc-finger gene identified by chromosome jumping." <u>Nature</u> **343**(6260): 774-8.

Grundy, P., N. Breslow, et al. (1989). "Prognostic factors for children with recurrent Wilms' tumor: results from the Second and Third National Wilms' Tumor Study." \underline{J} <u>Clin Oncol</u> **7**(5): 638-47.

Grundy, P. E., P. E. Telzerow, et al. (1994). "Loss of heterozygosity for chromosomes 16q and 1p in Wilms' tumors predicts an adverse outcome." <u>Cancer Res</u> **54**(9): 2331-3.

Grundy, R. G., J. Pritchard, et al. (1998). "Loss of heterozygosity for the short arm of chromosome 7 in sporadic Wilms tumour." <u>Oncogene</u> **17**(3): 395-400.

Hewitt, J. A., P. M. Kessler, et al. (1996). "Tissue-specific regulation of the WT1 locus." <u>Med Pediatr Oncol</u> **27**(5): 456-61.

Hing, S., Y. J. Lu, et al. (2001). "Gain of 1q is associated with adverse outcome in favorable histology Wilms' tumors." <u>Am J Pathol</u> **158**(2): 393-8.

Holthofer, H., A. Miettinen, et al. (1984). "Expression of vimentin and cytokeratin types of intermediate filament proteins in developing and adult human kidneys." <u>Lab</u> Invest **50**(5): 552-9.

Karnik, P., P. Chen, et al. (1998). "Loss of heterozygosity at chromosome 11p15 in Wilms tumors: identification of two independent regions." <u>Oncogene</u> **17**(2): 237-40.

Klamt, B., M. Schulze, et al. (1998). "Allele loss in Wilms tumors of chromosome arms 11q, 16q, and 22q correlate with clinicopathological parameters." <u>Genes</u> <u>Chromosomes Cancer</u> **22**(4): 287-94.

LeBrun, D. P., R. A. Warnke, et al. (1993). "Expression of bcl-2 in fetal tissues suggests a role in morphogenesis." <u>Am J Pathol</u> **142**(3): 743-53.

Ludwig, R. W., A. Pötter, R. (1992). "Präoperative Chemotherapie des Nephroblastoms: vorläufige Ergebnisse der Therapiestudie SIOP-9/GPO." <u>Klin</u> <u>Pädiatr</u> **204**: 204-213.

Mannens, M., R. M. Slater, et al. (1988). "Molecular nature of genetic changes resulting in loss of heterozygosity of chromosome 11 in Wilms' tumours." <u>Hum Genet</u> **81**(1): 41-8.

Matsell, D. G., P. J. Delhanty, et al. (1994). "Expression of insulin-like growth factor and binding protein genes during nephrogenesis." <u>Kidney Int</u> **46**(4): 1031-42.

Matsushima-Nishiu, M., M. Unoki, et al. (2001). "Growth and gene expression profile analyses of endometrial cancer cells expressing exogenous PTEN." <u>Cancer Res</u> **61**(9): 3741-9.

Maung, Z. T., F. R. MacLean, et al. (1994). "The relationship between bcl-2 expression and response to chemotherapy in acute leukaemia." <u>Br J Haematol</u> **88**(1): 105-9.

Mayo, M. W., C. Y. Wang, et al. (1999). "WT1 modulates apoptosis by transcriptionally upregulating the bcl-2 proto-oncogene." <u>Embo J</u> **18**(14): 3990-4003.

Mierau, G. W., J. B. Beckwith, et al. (1987). "Ultrastructure and histogenesis of the renal tumors of childhood: an overview." <u>Ultrastruct Pathol</u> **11**(2-3): 313-33.

Miyazato, A., S. Ueno, et al. (2001). "Identification of myelodysplastic syndromespecific genes by DNA microarray analysis with purified hematopoietic stem cell fraction." <u>Blood</u> **98**(2): 422-7.

National-Wilms-Tumor-Study-Comittee (1991). "Wilms' tumor: status report, 1990." j <u>Clin Oncol</u> **5**: 877-887.

Pastore, G., M. Carli, et al. (1988). "Epidemiological features of Wilms' tumor: results of studies by the International Society of Paediatric Oncology (SIOP)." <u>Med Pediatr</u> <u>Oncol</u> **16**(1): 7-11.

Plesko, I., E. Kramarova, et al. (2001). "Survival of children with Wilms' tumour in Europe." <u>Eur J Cancer</u> **37**(6): 736-43.

Ragnarsson, G., G. Eiriksdottir, et al. (1999). "Loss of heterozygosity at chromosome 1p in different solid human tumours: association with survival." <u>Br J Cancer</u> **79**(9-10): 1468-74.

Ramachandran, C., S. J. Melnick, et al. (2000). "Expression of apoptosis, cell proliferation, and drug resistance genes in pediatric Wilms' tumors." <u>Anticancer Res</u> **20**(5C): 3759-65.

Rangarajan, A., C. Talora, et al. (2001). "Notch signaling is a direct determinant of keratinocyte growth arrest and entry into differentiation." <u>Embo J</u> **20**(13): 3427-36.

Rapley, E. A., R. Barfoot, et al. (2000). "Evidence for susceptibility genes to familial Wilms tumour in addition to WT1, FWT1 and FWT2." <u>Br J Cancer</u> **83**(2): 177-83.

Ronchini, C. and A. J. Capobianco (2001). "Induction of cyclin D1 transcription and CDK2 activity by Notch(ic): implication for cell cycle disruption in transformation by Notch(ic)." <u>Mol Cell Biol</u> **21**(17): 5925-34.

Rose, E. A., T. Glaser, et al. (1990). "Complete physical map of the WAGR region of 11p13 localizes a candidate Wilms' tumor gene." <u>Cell</u> **60**(3): 495-508.

Royer-Pokora, B. (2000). "Molekulargenetische Grundlagen der Tumoren des Kindesalters - das Beispiel Wilms-Tumor." <u>Der Onkologe</u> **9-2000**(6): 819-831.

Scherf, U., D. T. Ross, et al. (2000). "A gene expression database for the molecular pharmacology of cancer." <u>Nat Genet</u> **24**(3): 236-44.

Schneider, S. (1994). "Molekulare Charakterisierung von Wilms Tumor." <u>Dissertation</u> <u>Ruprechts-Karls Universität Heidelberg</u>.

Schumacher, V. (1995). "Untersuchungen des WT1 Gens bei Denys-Drash-Syndrom und Wilms Tumor." <u>Diplomarbeit Ruprechts-Karls-Universität Heidelberg</u>.

Schumacher, V. (1998). "Molekulare Charakterisierung von Mechanismen zur Enstehung von Wilms-Tumor und Denys-Drash-Syndrom Vom Genotyp zum Phänotyp." <u>Dissertation</u>.

Schumacher, V., K. Scharer, et al. (1998). "Spectrum of early onset nephrotic syndrome associated with WT1 missense mutations." <u>Kidney Int</u> **53**(6): 1594-600.

Schwab, M., C. Praml, et al. (1996). "Genomic instability in 1p and human malignancies." <u>Genes Chromosomes Cancer</u> **16**(4): 211-29.

Sinclair, A. J., I. Palmero, et al. (1994). "EBNA-2 and EBNA-LP cooperate to cause G0 to G1 transition during immortalization of resting human B lymphocytes by Epstein-Barr virus." <u>Embo J</u> **13**(14): 3321-8.

Steenman, M., B. Redeker, et al. (1997). "Comparative genomic hybridization analysis of Wilms tumors." <u>Cytogenet Cell Genet</u> **77**(3-4): 296-303.

Steinberg, R., E. Freud, et al. (2000). "High frequency of loss of heterozygosity for 1p35-p36 (D1S247) in Wilms tumor." <u>Cancer Genet Cytogenet</u> **117**(2): 136-9.

Takano, Y., Y. Kato, et al. (2000). "Cyclin D2 overexpression and lack of p27 correlate positively and cyclin E inversely with a poor prognosis in gastric cancer cases." <u>Am J Pathol</u> **156**(2): 585-94.

Takeda, O., C. Homma, et al. (1994). "There may be two tumor suppressor genes on chromosome arm 1p closely associated with biologically distinct subtypes of neuroblastoma." <u>Genes Chromosomes Cancer</u> **10**(1): 30-9.

Xu, F., A. Gardner, et al. (1997). "Multiple myeloma cells are protected against dexamethasone-induced apoptosis by insulin-like growth factors." <u>Br J Haematol</u> **97**(2): 429-40.

9.Lebenslauf

Personalien

Name, Vornamen:	Sonner, Sandra Kirstin
Geburtsname:	Langer
Geburtsdatum:	27.12.1971
Geburtsort::	Essen
Familienstand:	verheiratet
Nationalität:	Deutsch

Schulbildung

1978 - 1982 Grundschule an der Waldlehne, Essen

1982 – 1991	BMV-Schule - katholisches Mädchengymnasium der Stadt Essen
11.06.1991	Allgemeine Hochschulreife (Abitur)

Universitärer Werdegang

WS 91/92	Beginn des Studiengangs Diplom-Biologie an der Heinrich-
	Heine-Universität Düsseldorf
11.02.1994	Vordiplom der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
03/97 - 03/98	Diplomarbeit am Institut für Parasitologie, Zoomorphologie und
	Zellbiologie der HHU
24.03.1998	Diplom der HHU Düsseldorf
11/98 – 10/01	Promotionsarbeit im Institut für Humangenetik und Anthropologie
	der Universitätsklinik Düsseldorf

Berufliche Tätigkeit

06/98 – 11/98 Tätigkeit als wissenschaftliche Hilfskraft im Institut für Rechtsmedizin der Universität zu Köln

10. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meiner Doktormutter und Betreuerin Frau Prof. Dr. Royer-Pokora für die freundliche Überlassung des Themas und die Möglichkeit, die Arbeit an ihrem Institut durchzuführen. Ihre zahlreichen Ideen, ihre Betreuung und ihre ständige Diskussionsbereitschaft haben sehr zum Gelingen der Arbeit beigetragen. Außerdem danke ich ihr für das Gutachten und die Abnahme der Prüfung.

Herrn Prof. Dr. Kunz möchte ich herzlich für das Gutachten und für seine Unterstützung danken. Sein Mitwirken bei den organisatorischen Belangen der Dissertation war sehr hilfreich. Außerdem bedanke ich mich bei ihm für das Gutachten und die Bereitschaft zur Abnahme der Prüfung.

Mein besonderer Dank gilt außerdem Frau Dr. Valérie Schumacher für ihre engagierte Unterstützung, viele wichtige Anregungen, ihr zur Verfügung gestelltes Wissen, ihre tatkräftige Hilfe und ständige Gesprächsbereitschaft. Außerdem danke ich Ihr für die konstruktive Kritik und die Korrekturen bei der Anfertigung der Dissertation.

Den Herren Prof. Dr. Heinlein, Prof. Dr. Hollenberg, Prof. Dr. Martin und Prof. Dr. Mehlhorn danke ich für die Bereitschaft zur Abnahme der Prüfung und Herrn Prof. Dr. Weiss für die Bereitschaft zur Übernahme des Prüfungsausschußvorsitzes.

Ich möchte mich auch bei all denen bedanken, die durch ihre Unterstützung und die Bereitstellung von Tumormaterial und die Aufarbeitung der Patientendaten zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben. Mein Dank gilt deshalb Herrn PD. Dr. Ludwig von der Universitäts-Kinderklinik Heidelberg, dem Leiter der SIOP 9 Studie, und seiner Mitarbeiterin A. Weirich. Dem Wilms Tumor Referenzpathologen Dr. Leuschner von der Universität Kiel.

Ich danke auch ganz herzlich den Mitgliedern der Elterninitiative der Kinderkrebsklinik Düsseldorf, durch deren großzügigen Spenden die Erstellung dieser Arbeit erst möglich geworden ist und hoffe, mit meinem Beitrag einen kleinen Schritt dazu beigetragen zu haben, ihren Kampf gegen den Krebs zu unterstützen.

Mein Dank gilt auch allen Mitarbeitern und Kollegen im Institut für Humangenetik und Anthropologie, für ihre angenehme Zusammenarbeit und viele Hilfestellungen, besonders möchte ich mich bedanken bei Dipl. Biol. M. G. Pitschke, Dr. D. Trost und den Mitarbeiterinnen in der Cytogenetik, für ihre Geduld, wenn ich immer wieder ihr Mikroskop besetzen mußte.

Zuletzt möchte ich mich ganz herzlich bei den Menschen bedanken, die durch kleinere und größere Hilfestellungen, wie Korrekturlesen, liebevolle Unterstützung und konstruktive Kritik zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, meiner Familie, meinen Freunden und ganz besonders meinem Mann Stephan Sonner.