



**Welche Rolle spielen Transkriptionsfaktoren bei der
Aufrechterhaltung des mesenchymalen Zustandes
und der Chemotherapierespons von *WT1* mutanten
Wilms-Tumoren**

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Artur Brandt
aus Schtschutschinsk

Düsseldorf, April 2016

Aus dem Institut für Humangenetik und Anthropologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

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

Referent: Prof. Dr. B. Royer-Pokora

Korreferent: Prof. Dr. William F. Martin

Tag der mündlichen Prüfung:

1.	Einleitung.....	1
1.1	Die humane Niere (Nephros)	1
1.2	Die Entwicklung der humanen Niere	2
1.3	Tumorgenese	4
1.4	Wilms-Tumor (WT)	6
1.4.1	Epidemiologie und Inzidenz	6
1.4.2	Klinik und Therapie	7
1.4.3	Histopathologie.....	12
1.4.4	Genetik des Wilms-Tumors.....	14
1.5	Das <i>WT1</i> -Gen.....	18
1.6	<i>WT1</i> -Protein	20
1.7	Nierenentwicklung und <i>WT1</i> -Expression	23
1.8	Das <i>CTNNB1</i> -Gen (β -Catenin)	24
1.9	Das β -Catenin Protein und seine Funktion im Wnt-Signalweg	25
1.10	<i>PAX3</i> -Expression bei Wilms-Tumoren	27
1.11	Ziel der Arbeit	28
2.	Material.....	30
2.1	Geräte	30
2.2	Software	31
2.3	Verbrauchsmaterial.....	31
2.4	Kits	32
2.5	Lösungen/Puffer	33
2.5.1	Angesetzte Lösungen und Puffer.....	34
2.6	Zellkultur.....	35
2.6.1	Zelllinien	35
2.6.2	Zellkulturmedien und Zusätze/Lösungen	36
2.6.3	Angesetzte Medien	36
2.7	Bakterienkulturen.....	37
2.8	Größenmarker	38

2.9	Vektoren und Konstrukte	38
2.10	Oligonukleotide.....	39
2.11	Antikörper	40
3.	Methoden.....	41
3.1	Zellkultur.....	41
3.1.1	Kultivieren einer Primärkultur.....	41
3.1.2	Auftauen und kultivieren von adhärenenten Zellen	42
3.1.3	Bestimmung der Zellzahl (Hämozytometer)	43
3.1.4	Kryokonservierung von Zellen	44
3.2	Virusherstellung.....	44
3.2.1	Transfektion von HEK-293FT-Zellen.....	44
3.2.2	Titerbestimmung aus lentiviralen Überstand	47
3.2.3	Virusherstellung mittels <i>Producer</i> Zelllinie	49
3.3	Immortalisierung von Wilms-Tumor-Zelllinien	50
3.4	Zelldifferenzierungsversuche	51
3.4.1	Adipozytendifferenzierung	51
3.4.2	Osteoblastendifferenzierung	52
3.4.3	Muskeldifferenzierung.....	54
3.5	Transfektion.....	54
3.6	Luciferase-Reporter-Assay	55
3.7	Immunfluoreszenz	57
3.8	DNA	58
3.8.1	DNA-Isolierung mittels QIAamp DNA Mini Kit von Qiagen	58
3.8.2	DNA-Fällung.....	58
3.8.3	Plasmidisolierung mittels Miniprep Kit (Thermo Scientific)	59
3.8.4	Plasmidisolierung mittels Midi-Präparation (Macherey-Nagel)	59
3.8.5	DNA-Konzentrationsbestimmung.....	60
3.8.6	Polymerasen-Kettenreaktion (PCR).....	60
3.8.7	Aufreinigung von PCR-Produkten.....	61

3.8.8	DNA-Sequenzierung.....	61
3.8.9	Gelelektrophorese	62
3.8.10	Gelelution mittels QIAquick Gel Extraktion Kit (Qiagen).....	63
3.9.	RNA.....	63
3.9.1	Isolierung der RNA (RNeasy Kit: Qiagen)	63
3.9.2.	Konzentrationsbestimmung der RNA.....	64
3.9.3	Qualitätsbestimmung der RNA mittels Bioanalyzer	64
3.9.4	Reverse Transkriptase (cDNA-Synthese)	65
3.9.5	cDNA-Synthese für die quantitative TaqMan Real- Time RT-PCR.....	66
3.9.6	Quantitative Real- Time RT-PCR (TaqMan).....	66
3.9.7	Herstellung einer <i>WT1</i> -(-/-)-RNA.....	68
3.9.8	Absolute Quantifizierung anhand der <i>WT1</i> -Standardkurve	70
3.10	Klonierung	70
3.10.1	Gateway-Klonierung	71
3.10.2	Herstellung eines induzierbaren <i>WT1</i> -(-/-)-Vektors	71
3.10.3	Herstellung eines konstitutiv exprimierenden <i>WT1</i> -(-/-)-Vektors.....	75
3.11	Microarray (Genexpressionsanalysen).....	76
3.12	Array-CGH/SNP	82
3.12.1	Custom-Array	87
3.13	Herstellung von chemisch kompetenten Sure2-Zellen mittels CaCl_2	88
4.	Ergebnisse.....	90
4.1	Absolute <i>WT1</i> -Quantifizierung mittels Standardkurve	93
4.2	Analyse von <i>WT1</i> -Zielgenen in der Wilms1-Zelllinie	94
4.2.1	Expressionsanalyse von transfizierten Wilms1-Zellen.....	95
4.3	<i>PAX3</i> -Knockdown und dessen Auswirkung auf die Wilms1-Zelllinie.....	102
4.4	Etablierung von immortalisierten Wilms-Tumor-Zelllinien und deren Analyse ..	109
4.4.1	Etablierung und Charakterisierung immortalisierter Wilms-Tumorzellen ...	112
4.4.2	Genexpressionsanalyse der immortalisierten Wilms1-CI.31-Zelllinie	119
4.4.3	Einfluss von <i>WT1</i> -(+/-) auf die immortalisierte Wilms1-CI.31-Zelllinie	124

4.5	Herstellung eines induzierbaren und konstitutiv exprimierenden viralen <i>WT1</i> -(-/-)-Vektors.....	126
4.5.1	Analyse des induzierbaren und konstitutiv exprimierenden <i>WT1</i> -(-/-)-Konstrukts in der Wilms1-CI.31-Zelllinie.	131
4.5.2	Expressionsanalyse der stabil transduzierten Wilms1-CI.31-Zelllinie	132
4.6	Molekularbiologische Untersuchung von Patient Wilms10	134
4.6.1	<i>WT1</i> - und <i>CTNNB1</i> -Mutationsanalyse	135
4.6.2	Etablierung der Wilms10 Zellkultur und deren weiterführende Untersuchung 137	
4.6.3	Array basierende CGH/SNP-Analyse	141
4.6.4	Custom-Array	143
4.6.5	Expressionsanalysen von Wilms10.....	144
5.	Diskussion.....	159
5.1	Analyse der Wilms1-Zelllinien.....	159
5.1.1	<i>PAX3</i> -Knockdown und dessen Auswirkung auf die Wilms1-Zelllinie	159
5.1.2	Absolute <i>WT1</i> -Quantifizierung mittels Standardkurve	160
5.1.3	Expressionsanalyse von <i>WT1</i> -transfizierten Wilms1-Zellen	160
5.2	Etablierung von immortalisierten Wilms-Tumor-Zelllinien.....	163
5.2.1	Charakterisierung immortalisierter Wilms-Tumorzelllinien.....	164
5.2.2	Genexpressionsanalyse der immortalisierten Wilms1-CI.31-Zellen.....	166
5.2.3	Einfluss von <i>WT1</i> -(+/-) auf die immortalisierte Wilms1-CI.31-Zelllinie	168
5.2.4	Expressionsanalyse von stabil transduzierten Wilms1-CI.31-Zellen.....	169
5.3	Molekulargenetische Untersuchungen von Tumorzellen des Wilms10 Patienten 171	
5.3.1	<i>WT1</i> - und <i>CTNNB1</i> -Mutationsanalyse	171
5.3.2	Etablierung der Wilms10-Zellkultur und deren weiterführende Untersuchungen 173	
5.3.3	Array basierende CGH/SNP- und Custom-Array Analyse	175
5.3.4	Expressionsanalyse von Wilms10.....	176
6.	Zusammenfassung	181

7. Abstract.....	183
8. Literaturverzeichnis.....	185

1. Einleitung

1.1 Die humane Niere (Nephros)

Die humane Niere gehört neben der Harnleiter (Ureter), der Harnblase (Vesica urinaria) und der Harnröhre (Urethra) zum Komplex der Harnorgane und ist für die Produktion und die Sekretion des Harns verantwortlich. Gemeinsam mit den Geschlechtsorganen bilden die Harnorgane das Urogenitalsystem. Dadurch, dass die Aufgaben der Niere aus Filtration, Reabsorption und Konzentration des Harns bestehen, ist sie folglich an systemischen Regulationen, wie dem Wasser- und Elektrolythaushalt und dem Säure-Basen-Gleichgewicht beteiligt (Jing Yu et al., 2012). Durch die Bildung der Hormone Renin und Erythropoetin ist die Niere auch in der Blutdruckregulation und Erythropoese involviert. Das paarige Organ liegt direkt unter dem Zwerchfell und hat eine Länge von 10-12 cm und eine Breite von 5-6 cm. Jede einzelne Niere hat eine Masse, die zwischen 120-200g schwankt. Die äußere

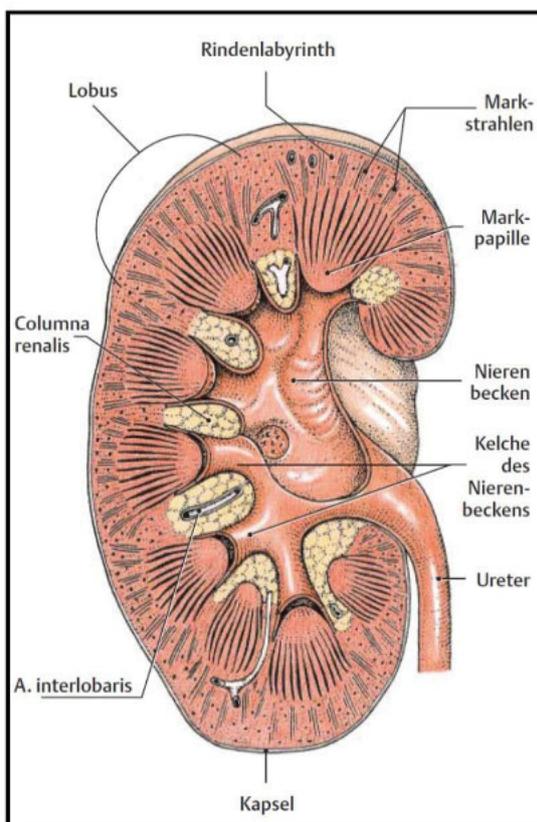


Abb. 1.1: Schematische Darstellung eines Längsschnitts durch die Niere. (Übernommen aus Kurzlehrbuch Histologie, 3. Auflage 2011)

Schicht der Niere wird als *Capsula fibrosa renis* bezeichnet. Diese Bindegewebshülle ist kaum dehnbar. Direkt anschließend folgt ein großflächiges Fettgewebe, die *Capsula adiposa*, die ihrerseits vom *Fascia renalis*, einem Faszien sack, umschlossen ist. Jede Niere setzt sich aus 6-9 identischen Einheiten zusammen, die als Nierenlappen (*Lobi renales*) bezeichnet werden. Diese wiederum sind in die Nierenrinde (*Cortex renalis*) und dem Nierenmark (*Medulla renalis*) unterteilt. Das Nierenmark wird bedingt durch seine Morphologie,

die einer Pyramide ähnelt, auch als "Markpyramide" oder "Nierenpyramide" bezeichnet. Die Nierenpapillen, die das spitze Ende der Markpyramide bilden, enden in den Nierenkelchen. Zusätzlich beherbergen die Nierenpapillen feingliedrige Ausläufer des *Ductus papillaris*, die als Harnporen definiert sind (*Pori uriniferi*). Die Gesamtheit aller Nierenkelche bildet das Nierenbecken (*Pelvis renalis* / Abb. 1.1). Der Zwischenraum der einzelnen Nierenpyramiden wird von einer ca. 1 cm breiten Rinde, der *Columnae renalis*, ausgefüllt und stellt damit die Rindensubstanz dar, welche die Nierenpyramiden umhüllt. Aus dem Nierenmark geht ein sogenannter Markstrahl hervor, der aus Anteilen der Nierentubli (*Partes rectae*) und dem Sammelrohr besteht und sich bis zur Rinde ausdehnt (Kurzlehrbuch Histologie, 2011). Das Markstrahlen umgebende Rindengewebe wird als Rindenlabyrinth bezeichnet.

1.2 Die Entwicklung der humanen Niere

Genetische Veränderungen während der Nierenentwicklung können zu einem Nierentumor (Nephroblastom) führen. Da es sich bei einem Wilms-Tumor um einen embryonalen Nierentumor handelt, ist es von immenser Bedeutung, Grundlagen über die Entwicklung einer Niere zu besitzen. Dies ermöglicht ein besseres Verständnis für die Entstehung und Zusammensetzung eines Nephroblastoms. Die gesamte Niere entwickelt sich beim Menschen innerhalb der 3. bis 36. Schwangerschaftswoche. Die Entwicklung lässt sich in drei Nierengenerationen splitten, die sich teilweise überschneiden. Der Wachstumsgradient dieser drei Nierensysteme verläuft kraniokaudal. Das bedeutet, dass als erstes die Vorniere (Pronephros) gebildet wird, anschließend folgt die Urnieren (Mesonephros) und als letztes wird die Nachnieren (Metanephros) angelegt (Solhaug et al., 2004). Alle drei Nierensysteme werden aus dem Mesoderm gebildet. Zunächst wurde angenommen, dass die Entstehung der verschiedenen Zelltypen der Niere aus dem metanephrischen Mesenchym entstehen, welches aus dem intermediären Mesoderm gebildet wird (Saxen, 1987). Neue Studien an Hühner- und Mäuseembryos haben ergeben, dass der Stromaanteil der Niere möglicherweise aus dem paraxialem Mesoderm hervorgeht (Guillaume et al., 2009). Zunächst liegt das intermediäre Mesoderm segmentiert vor, diese Einheiten werden als Nephrotome bezeichnet. Nach Auflösung dieser Segmente entsteht ein zusammenhängendes Blastem, welches den nephrogenen Strang bildet. Das unsegmentierte intermediäre Mesoderm (nephrogener Strang) liefert das Ausgangsmaterial für die Entstehung der Niere und die davon abgeleiteten Harnwege. Die ersten beiden Nierengenerationen werden nur rudimentär und zeitlich beschränkt ausgebildet. Beim Menschen erfüllt die Vorniere keine Funktion und ist am Ende der vierten Embryonalwoche vollständig degeneriert. Während dieser Zeitspanne wird der Vornierengang aus dem dorsal gelegenen Mesenchym geformt. Dagegen übernimmt die

Urnieren vorübergehend die Aufgabe der Filtration und trägt unter anderem bei Männern zur Bildung des Nebenhoden-Gangs und der Samenleiter bei (Walker et al., 2011). Einige niedere Vertebraten wie die Fische besitzen hingegen eine funktionsfähige Vorniere, bei Amphibien liegt eine funktionierende Urnieren vor. In der achten Embryonalwoche entwickelt sich die Urnieren fast komplett, bis auf den Urnierenengang (Wolff-Gang) zurück, der aus dem Vornierenengang hervorgegangen ist. Der Urnierenengang erlangt vor dem Übergang zur dritten Nieren-Generation Kontakt zu den Urnierenkanälchen und erreicht die Kloake.

Die Nachnieren entsteht durch die Interaktion von verschiedenen Gewebe- bzw. Zellkomponenten. Als erstes entsteht die Ureterknospe, die aus dem Urnierenengang auswächst und mit dem benachbarten metanephrischen Mesenchym (MM) interagiert (Wallner et al., 1997). Die Ureterknospe ist eine Ausstülpung, die als funktionsfähige Einheit nach der Degeneration der Urnieren übrig bleibt (Developmental Biology, 8. Auflage) und aus dem kaudalen Abschnitt des Urnierenengangs hervorgeht. Durch die Ureterknospe die in das metanephrische Mesenchym (metanephrisches Blastem) einwächst, wird dieses zur Kondensation angeregt, was eine Differenzierung zu Epithel nach sich zieht (Mesenchym-Epithel Übergang). Das metanephrische Mesenchym regt im Gegenzug die Ureterknospe zum Wachstum und zur Verzweigung an (Michos et al., 2009; Davies, 2002). Der dafür verantwortliche Faktor ist GDNF (*glial cell line-derived neurotrophic factor*), der zu der Familie der GFL (*GDNF-family of ligands*) gehört (Davies und Fisher, 2002).

Der nicht induzierte Anteil des Mesenchyms formt das Stroma. Aus den epithelialen Strukturen des induzierten metanephrischen Mesenchyms werden die Nierentubuli und Glomeruli gebildet. Dabei lagert sich das metanephrische Mesenchym zunächst um die Spitze der Ureterknospe an und durchläuft verschiedene Zwischenformen, von *renal vesicle* und *comma-shaped bodies* zu *S-shaped Body*, um im Anschluss das Epithel der Tubuli und Glomeruli zu generieren (Vainio and Lin 2002) (Abb. 1.2). Jeder einzelne Tubulus fusioniert während seiner Ausbildung am distalen Ende mit einem Sammelrohr, welches in die Harnleiter (Ureter) mündet. Am proximalen Ende eines Tubulus entsteht die Bowman-Kapsel, die zusammen mit dem Glomerulus das Nierenkörperchen bildet. Die Funktion vom Nierenkörperchen besteht in der Filtration des Blutes. Dies wird durch einen speziellen Zelltyp, den Podozyten, der in der Bowman-Kapsel lokalisiert ist, ermöglicht. Bei der Filtration vom Blut werden selektiv die Bestandteile des Blutes zur Henle-Schleife geleitet. Über die Henle-Schleife werden zahlreiche Elektrolyte ins Blut rückresorbiert. Als funktionelle Grundeinheit gilt das Nephron, welches sich aus der Bowman-Kapsel, dem Glomerulus und dem Nierentubulus zusammensetzt. Die Bildung neuer Nephrene vollzieht sich bis zur 32. Schwanger-

schaftswoche mit anschließendem Längenwachstum der Tubulusabschnitte. Nach Beendigung der Embryogenese werden keine weiteren Nephrone gebildet (Zilles und Tillmann, Anatomie, 2010).

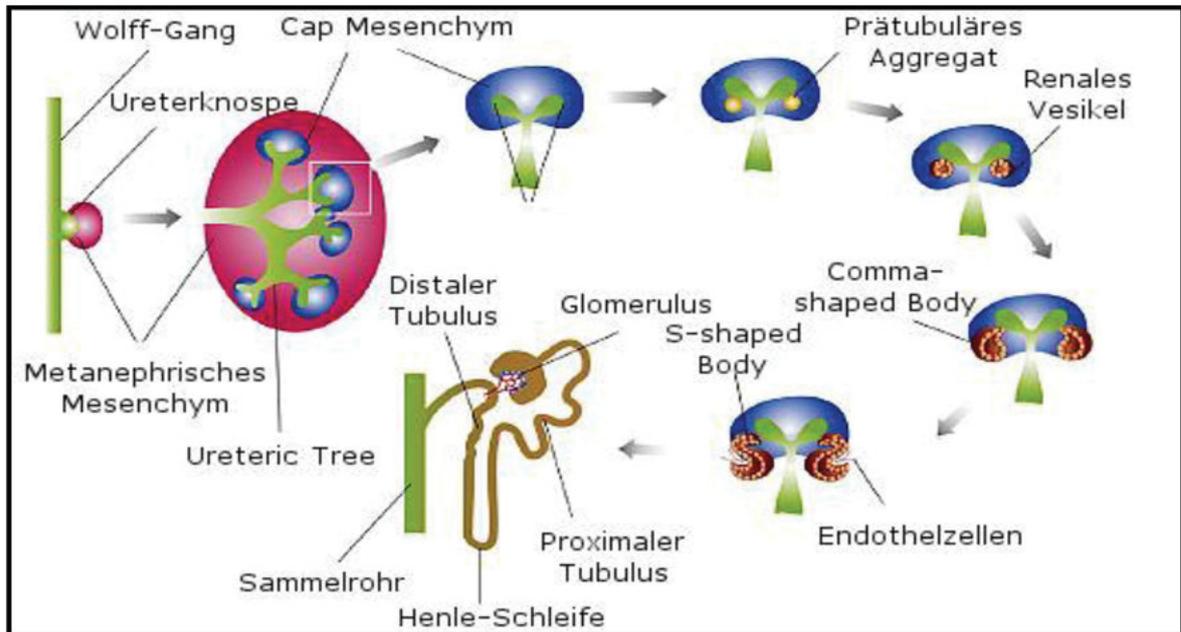


Abb. 1.2: Schematische Darstellung von verschiedenen morphologischen Stadien während der metanephrischen Nierendifferenzierung (Verändert und entnommen von Walker und Bertram, 2011).

1.3 Tumorgenese

Neben Herz-Kreislauf-Erkrankungen sind Tumorerkrankungen die zweithäufigste Todesursache in den westlichen Industriestaaten. Medizinisch wird jede Art von abnormalem Wachstum (Wucherung) einer Zellmasse als Tumor definiert, dabei spielt weder der Auslöser noch die Lokalisation dieser Wucherung (z.B. eine Entzündung) eine Rolle. Dies führt zu Dutzend verschiedener Klassifikationen von Tumortypen. In Deutschland lag 2010 die Anzahl an tumorbedingten Neuerkrankungen bei 477.300, wovon 218.258 (45,7%) Menschen an den Folgen einer Tumorerkrankung starben (Robert Koch-Institut, 2010).

Charakteristisch für einen Tumor ist ein dereguliertes Zellwachstum, welches zur Neubildung (Neoplasie) von Körpergewebe führt. Bei einem unkontrollierten Wachstum von Körperzellen liegt in der Regel eine Störung im genetisch gesteuerten Gleichgewicht von Zellteilung (Zellzyklus) und programmierten Zelltod (Apoptose) vor (Hanahan und Weinberg, 2011). Grundlegend werden Tumore in maligne (bösartige) und benigne (gutartige) unterteilt, die sich in Differenzierung und Wachstum unterscheiden. Tumore, die zu der Klasse der benignen gehören, wachsen sehr langsam und überschreiten das betroffene Organ nicht. Hingegen wachsen die malignen Tumore invasiv und können durch Metastasierung

andere Organe befallen (Entwicklungsbiologie, 1999). Maligne Tumore wachsen in der Regel klonal, d.h. sie entstammen einer genetisch veränderten malignen Ursprungszelle. Mit der *multiple hit theory* hat Ashley 1969 aufgezeigt, dass die Entstehung von Tumoren auf mehrere hintereinander folgende Mutationsereignisse zurückzuführen ist. Es werden zwei Gruppen von Genen identifiziert, die durch Mutationen ihre ursprüngliche Funktion verlieren und deswegen eine entscheidende Rolle bei der Tumorentstehung spielen. Bei diesen Genen handelt es sich um sogenannte Proto-Onkogene und Tumorsuppressorgene (Molecular Cell Biology, 2000, 4. Auflage).

Beim Proto-Onkogen handelt es sich um eine Genvorstufe, die erst durch eine Mutation in diesem Gen die Tumorentwicklung aktiv fördert und in dieser veränderten Form als Onkogen bezeichnet wird (Anderson et al., 1988). Proto-Onkogene kodieren in der Regel für Wachstumsfaktoren, Transkriptionsfaktoren und Rezeptortyrosinkinasen (The Cell, A Molecular Approach, 2000, 2. Auflage). Mutationen in diesen Genen gehen oft mit einem Funktionsgewinn einher (*gain of function*). Des Weiteren sind genetische Veränderungen in diesen Genen dominant, d.h. ein mutiertes Allel ist ausreichend, um an der Entstehung bzw. Progression von Tumoren mitzuwirken. Ein bekanntes Proto-Onkogen ist das *BCL-2*-Gen, es wirkt anti-apoptotisch und eine Überexpression trägt zur Bildung eines B-Zell-Lymphoms bei (Hockenbery et al., 1990). Ein weiteres Beispiel ist das *HRAS*-Gen. Regulär liegt seine Funktion in der Regulation der Zellteilung. Mutationen in diesem Gen können zu einer dauerhaften Aktivierung und dadurch zur Progression von Blasen- und Lungenkrebs führen (Feinberg et al., 1983).

Bei den Tumorsuppressorgenen führt hingegen deren Funktionsverlust zur Ausbildung eines Tumors. Da diese Gene rezessiv sind, kommt es erst zur Tumorbildung, wenn beide Allele des Gens mutiert sind und somit inaktiv vorliegen. Ein Beispiel hierfür ist unter anderem das *WT1*-Gen (Kim et al., 1999), welches in einigen Subtypen vom Wilms-Tumor mutiert vorliegt. Beim Ausfall des kompletten WT1-Proteins wird der MET-Übergang (Mesenchym-Epithel-Transition), der während der Nierenentwicklung nötig ist, fehlerhaft bzw. rudimentär ausgeführt (Sampson et al., 2014).

Eines der bekanntesten Tumorsuppressorgene ist das *p53*-Gen. Eine der vielen Funktionen von diesem liegt in der Regulation der Apoptose. Liegen irreparable DNA-Schäden vor, fungiert das p53-Protein als ein Kontrollmechanismus und induziert direkt oder indirekt die Apoptose. Liegen beide Genkopien inaktiv vor, kann die Apoptose nicht eingeleitet werden und es kommt zur Ausbildung eines Tumors (Saha et al., 2014).

1.4 Wilms-Tumor (WT)

Ein Wilms-Tumor oder Nephroblastom wird als ein maligner embryonaler Misch tumor der Niere definiert (Wims, 1899), der zu den häufigsten Nierentumoren im Kindesalter zählt. Erstmals beschrieben und charakterisiert von dem deutschen Arzt und Pathologen Dr. Carl Max Wilhelm Wilms. In seinem Werk "Die Mischgeschwülste der Niere", beschreibt Wilms 1899 die ersten von ihm untersuchten Fälle von Nierentumoren bei Kindern und sieht in der embryonalen Entwicklungsstörung einen möglichen Grund für die Entstehung des Wilms-Tumors.

1.4.1 Epidemiologie und Inzidenz

Mit 7% gehört das Nephroblastom zu den häufigsten soliden Tumoren im Kindesalter. Die Inzidenz des Wilms-Tumors liegt bei 1/10.000 Kindern unter 15 Jahren (Al-Hussain et al., 2014). Bei 5% der Wilms-Tumor Patienten sind beide Nieren betroffen, hier wird von einem bilateralen Wilms-Tumor gesprochen. Bei Mädchen wird ein Nephroblastom etwas häufiger als bei Jungen diagnostiziert, so liegt das Verhältnis für unilaterale Wilms-Tumore bei 0.92 : 1.00 und für bilaterale Wilms-Tumore bei 0.60 : 1.00 (SEER Cancer Statistics Review, 1975-2011). Des Weiteren gibt es Unterschiede in der Inzidenz zwischen verschiedenen ethnischen Gruppen und geographischen Regionen. Die Auswertung von gemeldeten Nephroblastom-Fällen ergibt, dass die Rate in asiatischen Ländern unterhalb der Rate in den USA und Europa liegt (Breslow et al., 1993). Das Hauptmanifestationsalter des Wilms-Tumors liegt zwischen dem zweiten und dritten Lebensjahr (Royer-Pokora et al., 2013). Dabei liegt das Durchschnittsdiagnosealter von unilateralen Wilms-Tumoren im 44. Monat und von bilateralen Wilms-Tumoren im 31. Monat nach der Geburt. Hinzu kommt, dass die Patienten mit einem Wilms-Tumor in 5 bis 10% der Fälle zusätzlich genetische Syndrome oder angeborenen Anomalien aufweisen (Vujanic, 2009). Das Auftreten eines Wilms-Tumors nach dem 15. Lebensjahr ist sehr selten und kommt nur in 0.2/1.000.000 Fällen vor. Bis heute sind ungefähr 300 Fälle von Wilms-Tumoren bei Erwachsenen dokumentiert (Terenziane et al., 2004; Kusuma et al., 2006). Es wird angenommen, dass die genetischen Veränderungen, die zur Entstehung eines Wilms-Tumors bei Erwachsenen führen, sich von denen, die im Kindesalter diagnostiziert werden, unterscheiden. Hierzu zählen chromosomale Veränderungen, wie die uniparentale Disomie und Mikrodeletionen von Genen, die an der Organogenese beteiligt sind (Karlsson et al., 2011).

1.4.2 Klinik und Therapie

Üblicherweise ist das erste Anzeichen für einen Wilms-Tumor eine asymptotische Schwellung von abdominaler Masse, die durch den Tumor selbst verursacht wird. Im Rahmen einer Vorsorgeuntersuchung (U3 und U4) werden ca. 10% der Nephroblastome durch eine Palpation bei zunächst völlig symptomfreien Kindern diagnostiziert (Gutjahr et al., 1990). In 20 bis 30% der betroffenen Fälle treten abdominale Schmerzen, Fieber, Anämie, Hämaturie und Hypertension auf (Green, 1985). Klinische Begleiterscheinungen wie Erbrechen, Hernie, Nausea und Pleuraerguss sind nur selten mit dem Wilms-Tumor assoziiert, hingegen ist neben der asymptotischen Tumorschwellung, die Hämaturie mit 15% das zweithäufigste klinische Symptom (Tab. 1.1).

Symptome	Häufigkeit in %
Asymptomatische Tumorschwellung	61,6
Hämaturie	15,1
Vorsorgeuntersuchung	9,2
Obstipation	4,3
Gewichtsverlust	3,8
Harnwegsinfektion	3,2
Diarrhoe	3,2
Diagnose bei Trauma	2,7
Nausea, Erbrechen, Schmerz, Hernie, Pleuraerguss, hoher Blutdruck	Selten

Tab. 1.1: Erstsymptome bei Diagnose eines Nephroblastoms (entnommen aus Gutjahr et al., 1990).

Bei 5 bis 10% der Patienten mit Wilms-Tumor tritt dieser bilateral oder multizentrisch auf. Die unilateralen WT kommen dementsprechend bei 90 bis 95% der Patienten vor (Knudson und Strong 1972). Patienten, die mit einem genetischen Syndrom wie z.B. dem ICN-Syndrom (isoliertes Kongenitales nephrotisches-Syndrom) vorbelastet sind, haben eine höhere Prädisposition einen bilateralen Wilms-Tumor auszubilden als Patienten ohne kongenitale Anomalien. Dennoch ist festzuhalten, dass bei 85% der Patienten mit WAGR (Wilms-Tumor, Aniridie, Genitalfehlbildungen, mentale Retardierung Syndrom) oder BWS (Beckwith-Wiedeman-Syndrom) nur unilaterale Tumore vorzufinden sind (Huff 1998; Porteus et al.,

2000). Durch das invasive Potenzial können Wilms-Tumore nicht nur lokal, sondern auch außerhalb der Niere vorliegen. Die lokalen Wilms-Tumore kommen in den Strukturen des Nierenhilus vor und können in die Nierenkapsel eindringen. Sie zeigen auch die Tendenz in die Nierenvene zu invadieren, was zur Thrombenbildung in der *Vena cava inferior* führt. In manchen Fällen erreichen sie den rechten Vorhof des Herzens. In bis zu 15% der Fälle sind lokale und entfernte Lymphknoten befallen. Größtenteils sind Metastasen in der Lunge und der Leber vorzufinden. In seltenen Fällen dehnen sich die Metastasen bis zum Knochen und Gehirn aus.

Für eine detaillierte Diagnose bei Kindern mit Verdacht auf einen Wilms-Tumor, kommen verschieden bildgebende Verfahren zum Einsatz, die dazu beitragen, einen operativen Eingriff besser zu planen. Die Ultraschalluntersuchung wird als erste Methode zur Aufklärung eines Falls empfohlen, da dieses Verfahren keine radioaktive Belastung nach sich zieht und die Darstellung des Abdomens und der *Vena cava inferior* ermöglicht. Ein weiteres diagnostisches Verfahren ist die Computertomographie (CT), diese liefert eine höhere Auflösung der untersuchten abdominalen Strukturen sowie der Lymphknoten. Weitere bildgebende Verfahren, die immer mehr in den Fokus der Routinediagnostik rücken, sind die Magnetresonanztomographie (MRT) und Positronen-Emissions-Tomographie (PET). Neben den bildgebenden Verfahren ist auch die Messung von Katecholamine im Urin ein Bestandteil der Differenzialdiagnose.

Therapiekriterien nach NWTS und SIOP

Die Grundlage für heutige Therapiestudien bilden die seit den 1970er durchgeführten prospektiven Studien der *National Wilms-Tumor Study* (NWTS) und der *International Society of Pediatric Oncology* (SIOP) sowie der Gesellschaft für Onkologie und Hämatologie (GPOH) (Green et al., 1995; Graf et al., 2000). Basierend auf diesen Studien wird der Wilms-Tumor international in fünf Stadien eingruppiert. Durch abweichende Kriterien zwischen den Studien werden einzelne Stadien differenziell definiert. So liegt der Fokus bei NWTS mehr auf der Tumorausbreitung, hingegen berücksichtigt die SIOP-Studie mehr die Resektabilität des Gewebes. Ein weiterer Unterschied liegt in der Einteilung von befallenen Lymphknoten, die NWTS fasst alle betroffenen abdominalen Lymphknoten in dem III Stadium zusammen (Tab. 1.2). In der SIOP-Studie wird zwischen lokalen (Stadium II) und extraregionalen Befall von Lymphnoten (Stadium III) differenziert. Unilaterale WT, die keine Metastasen ausbilden, werden dem Stadium I-III zugewiesen. Sind Metastasen vorzufinden, wird der WT dem Stadium IV zugeordnet. Ein bilateraler Wilms-Tumor wird grundsätzlich dem Stadium V zugewiesen.

Ein wesentlicher Unterschied in der Therapiestrategie zwischen NWTS und SIOP liegt in der Rangfolge der durchgeführten Maßnahmen zur Behandlung der Wilms-Tumore. Die NWTS bzw. mittlerweile COG (Children's Oncology Group) Richtlinien, die in Nord-Amerika angewandt werden, sehen als ersten Schritt eine Nephrektomie vor, mit anschließender Chemotherapie und je nach Stadieneinteilung zusätzlich eine Strahlentherapie (Jereb et al., 1994). Die darauffolgende Chemotherapie wird anhand der vorliegenden Zusammensetzung (histologische Komponente) des Tumors ausgerichtet.

Stadium I	Tumor ist auf die Niere begrenzt, (Tumorkapsel), keine Penetration der Nierenkapsel oder Befall von renal sinus Gefäßen, vollständige Entfernung möglich.
Stadium II	NWTS Tumor mit Infiltration des extrarenalen Raums mit vollständiger Resektion oder Biopsie bzw. lokal auf die ipsilaterale Flanke begrenzte Tumoraus-saat bei Tumorrup-tur (minor spillage). Tumorthromben in Gefäßen außerhalb der Niere, die zusammen mit dem Tumor reserzierbar sind.
	SIOP Tumor mit Infiltration des extrarenalen Raums mit vollständiger Resektion und/oder Befall der regionalen Lymphknoten.
Stadium III	NWTS Tumor unvollständig reserziert oder rupturiert mit großflächiger Tumoraus-saat (major spillage) und/oder Befall abdominaler Lymphknoten oder Tu-morpenetration durchs Peritoneum. Transsektion der Tumorthromben.
	SIOP Tumor unvollständig reserziert oder rupturiert oder intraoperativ biopsiert und/oder Befall abdominaler Lymphknoten.
Stadium IV	Hämatogene Fernmetastasen z.B. in der Lunge, Leber, Knochen und/oder Gehirn (Zentralnervensystems) oder Metastasen der Lymphknoten außerhalb des Abdomens und/oder der Bauchhöhle.
Stadium V	Bei der Diagnose liegt ein bilateraler Wilms-Tumor vor.

Tab. 1.2: Stadieneinteilung des Wilms-Tumors nach NWTS und SIOP Kriterien (verändert übernommen von Royer-Pokora und Schumacher 2001 und ergänzt nach Metzger und Dome 2005).

Verschiedene histologische Subtypen des Wilms-Tumors (triphasisch, blastemreich, epithelreich und stromareich) sprechen unterschiedlich gut auf eine Chemotherapie an. Wilms-Tumore, die einen hohen Anteil an Blastem- oder Epithelzellen aufweisen, zeigen im

Vergleich zu stromareichen Wilms-Tumoren eine höhere Sensitivität gegenüber der angewandten Chemotherapie auf (Beckwith und Palmer, 1978, Tab.1.3). Eine mögliche Erklärung für eine Chemotherapieresistenz von stromareichen Tumoren kann an der transduzierenden Eigenschaft von Stromazellen sein, welche durch die Chemotherapie hervorgerufen wird (Royer-Pokora und Schumacher, 2001). Auch wenn nach einer präoperativen Behandlung des Tumors dieser nicht mit einer Volumenreduktion reagiert, geht dies nicht mit einer schlechteren Prognose einher (Royer-Pokora et al., 2008).

Nach den SIOP Kriterien die in Europa zum Einsatz kommen, wird zunächst durch eine neoadjuvante Therapie (präoperative Chemotherapie) versucht, das Volumen des Tumors zu minimieren, um die operative Entfernung des Tumors zu erleichtern. Im Gegensatz zu Patienten mit einem unilateralen Wilms-Tumor wird bei Patienten mit einem bilateralen WT eine Nierenerhaltende Operation befürwortet. Dies wird nur in den Fällen in Betracht gezogen, bei denen der Tumor sehr klein ist und vollständig entfernt werden kann, ohne nachweisliche Krebszellen am Rande des untersuchten Gewebes (Ritchey 2005). Nach der Bestimmung des Stadiums und der Histologie findet in manchen Fällen zusätzlich eine postoperative Chemo- bzw. Strahlentherapie statt (Ludwig et al., 1992). Neben dem Tumorstadium und dem histologischen Subtypen gehört das präoperative Tumolvolumen mit zu den wesentlichen prognostischen Parametern (Graf et al., 2000). Wird ein Nephroblastom dem Stadium I zugeordnet, liegt eine niedrige Malignität vor und wenn das Erkrankungsalter unter sechs Monaten liegt, wird keine präoperative Chemotherapie am Patienten durchgeführt. Die Behandlung endet nach der Operation.

Chemotherapeutika

Zu den wichtigsten Standardtherapeutika bei der Behandlung eines Nephroblastoms gehören Actinomycin D (Dactinomycin) und Vincristin, die in den Stadien I bis III beim intermediär malignen Nephroblastom eingesetzt werden. Diese werden über einen Zeitraum von vier Wochen verabreicht. Patienten, die eine geringe bis keine Volumenreduktion des Tumors zeigen oder eine ungünstige Histologie aufweisen bzw. die Klassifikation des Tumors in das I und II Stadium fällt, erhalten noch zusätzlich Doxorubicin (Tongaokar et al., 2007). Patienten, die einen Rückfall (Rezidiv) erleiden oder gar keine bis minimale Resonanz auf die gängigen Chemotherapeutika zeigen, werden mit Cyclophosphamide, Ifosfamide, Carboplatin und Etoposide behandelt (Gommersall et al., 2005). Eine 6-wöchige neoadjuvante Therapie bestehend aus Actinomycin D, Vincristin und Doxorubicin bekommen Patienten mit initialen Metastasen (Stadium IV). Bei Wilms-Tumor Patienten mit einem bilateralen Nephroblastom (Stadium V) erfolgt die individualisierte präoperative Chemotherapie mit Vincristin und Actinomycin D. Die Dauer einer Chemotherapie richtet sich nach dem Zeitpunkt,

bis eine nierenerhaltende Operation durchführbar ist, überschreitet aber nicht die Dauer von 12 Wochen.

Wilms-Tumor vor und nach Chemotherapie		
Subtypen	(SIOP) Anteil [%] mit präoperativer Chemotherapie	(NTWS) Anteil [%] ohne präoperativer Chemotherapie
Triphasisch	38,2	45,5
Blastemreich	7,7	32,8
Epithelreich	3,9	7,2
Stromareich	14	3,8
Regressiv	36,2	0

Tab. 1.3: Histopathologische WT Subtypen mit und ohne präoperativer Chemotherapie (Beckwith und Palmer 1978; Weirich et al., 2001)

Wirkungsweise der Zytostatika

Actinomycin D gehört zu der Gruppe der zytotoxisch wirkenden Antibiotika. Es hemmt die RNA-Synthese, indem es an die DNA bindet und somit die RNA-Polymerase daran hindert, die mRNA zu synthetisieren. Doxorubicin ist ebenfalls ein Zytostatikum, welches zur Stoffgruppe der Anthracycline gehört. Durch seine Interkalation in die DNA und der Bindung an die Topoisomerase II wird die DNA- sowie RNA-Synthese gehemmt. Das Zytostatikum Vincristin ist ein sogenannter Mitosehemmer, es bindet an das Protein Tubulin und inhibiert damit die Ausbildung von Mikrotubuli. Diese wiederum sind während der Zellteilung für eine gleichmäßige Verteilung der homologen Chromosomen verantwortlich. Alle drei Zytostatika wirken damit besonders auf sich schnell teilende Tumorzellen.

Durch die immer weiter fortlaufenden Studien (NWTs/COG und SIOP), die das Ziel verfolgen, eine optimierte Behandlung der Patienten zu gewährleisten, liegt heute die Überlebensrate bei Patienten mit einer niedrigen bis intermediären Malignität bei 90% (Graf und Reinhard, 2003). Mit einer entsprechenden Konstellation aus Diagnosealter, Tumorgewicht, histologischem Subtyp und Stadium wird eine Überlebensrate bis zu 98% erreicht (Dome et al., 2006; Hamilton et al., 2011). Prognostisch ungünstig bleiben weiterhin Metastasen sowie Nephroblastome mit einer hohen Malignität, die mit einer diffusen Anaplasie assoziiert sind oder es sich dabei um einen blastemreichen Wilms-Tumor handelt. Auch die Assoziation eines Wilms-Tumors mit einem Syndrom nimmt Einfluss auf die Prognose. Kinder

mit einem WT und Beckwith-Wiedemann-Syndrom sprechen hervorragend auf die Routinebehandlung an (Porteus et al., 2000). Bei Patienten mit einem WAGR-Syndrom wird in der Regel der Wilms-Tumor erfolgreich behandelt, trotzdem zeigen diese Patienten eine verminderte Überlebensrate aufgrund einer späteren Nierenerkrankung auf (Breslow et al., 2003).

1.4.3 Histopathologie

In der Regel wird bei Kindern zwischen dem 6. Monat und dem 16. Lebensjahr keine primäre Tumorbiopsie vorgenommen, wenn eine klare bildgebende Diagnose eines Wilms-Tumors vorliegt. Der histopathologische Befund wird erst nach einer präoperativen Chemotherapie erhoben und ist neben der im Vorfeld durchgeführten Stadieneinteilung nach NWTS und SIOP maßgeblich an der Bestimmung des malignen Potentials des Wilms-Tumors beteiligt. Die histologische Differenzierung des embryonalen Nierentumors erfolgt gemäß der Stockholm-Klassifikation (Vujanic et al., 2002) in drei Kategorien: In einen niedrigen, einen intermediären und einen hohen Malignitätsgrad (Tab. 1.4). Aus histologischem Blickwinkel handelt es sich bei einem Wilms-Tumor um eine Entwicklungsstörung der Niere während der Nephrogenese, die durch eine entartete Differenzierung embryonaler Zellen aus dem metanephrogenen Blastem hervorgerufen wird (Mierau et al., 1987). Aufgrund des gestörten Differenzierungszustandes arretieren die Blastemzellen in einem frühen Stadium ihrer Differenzierung. Zusätzlich fangen die unreifen, terminal nicht differenzierten Blastemzellen an, unkontrolliert zu proliferieren. Dies führt zur Bildung und dem Wachstum einer entarteten Zellmasse, dem Wilms-Tumor (Beckwith et al., 1990). Mit einer Frequenz von 40% wird bei Kindern mit einem Wilms-Tumor eine Nephroblastomatose (Nephrogene Reste) diagnostiziert (Stone et al., 1990), die als Vorstufe eines Wilms-Tumors gilt (Glylys-Morin et al., 1993).

Klassifikation der Nierentumore im Kindesalter			
Tumoren nach präoperativer Chemotherapie	Low risk-Gruppe (niedrige Malignität)	Intermediate risk- Gruppe (Standardrisikotyp)	High risk – Gruppe (hohe Malignität)
	Mesoblastisches Nephrom	Nephroblastom-epithelialer Typ	Nephroblastom-blastemreicher Typ
	Zystisches, partiell differenziertes Nephroblastom	Nephroblastom-stromareicher Typ	Nephroblastom mit diffuser Anaplasie
	Komplett nekrotisches Nephroblastom	Nephroblastom-Mischtyp	Klarzellensarkom der Niere (CCSK) (Sonderfall)
		Nephroblastom-regressiver Typ	Rhabdoidtumor der Niere (MRTK) (Sonderfall)
		Nephroblastom mit fokaler Anaplasie	

Tab. 1.4: Klassifikation der Nierentumore im Kindesalter, SIOP (entnommen von Vuljanic et al., 2002).

ILNR und PLNR

Nephrogene Reste sind prä maligne Läsionen, die diffus oder multifokal auftreten (Bove und McAdam 1976). Entsprechend ihrer Lokalisation in der Niere werden diese in intralobare und perilobare Reste eingeteilt (Lonergan et al., 1998). Intralobare nephrogene Reste (ILNR) werden mit einer frühen Störung der Embryogenese der Niere in Verbindung gebracht. Sie weisen eine heterogene Histologie auf, die hauptsächlich aus Stromazellen besteht und werden oft bei Patienten mit einem sporadischen Wilms-Tumor diagnostiziert. Die ILNR sind im Nierenlappen, im Sinus renalis oder in den Wänden des Sammelrohrsystems vorzufinden. Das Vorkommen der ILNR ist unter anderem mit Missbildungen des Urogenitaltrakts und mit WAGR sowie dem Denys-Drash-Syndrom assoziiert (Beckwith, 1998).

Perilobare nephrogene Reste (PLNR) sind nur in der Peripherie des Nierenlappens vorzufinden und bilden eine Masse, die deutlich von der Niere abgegrenzt ist. Die Lokalisation dieser nephrogenen Reste in der Peripherie geht mit einer späten Störung der Nierenentwicklung einher und weist eine homogene Histologie auf, bestehend aus Blastem- oder embryonalen Epithelzellen. Patienten, deren Wilms-Tumor aus PLNR hervorgegangen ist, leiden oft an Hemihypertrophie und dem Beckwith-Wiedemann-Syndrom (BWS) (Norman et al., 2006).

Zusammensetzung

Die histologische Klassifikation der Wilms-Tumore in verschiedene Subtypen spielt eine entscheidende Rolle bei der Prognose und somit bei der jeweiligen Behandlung. Charakteristisch für die meisten Wilms-Tumore ist eine triphasische Histologie, bestehend aus primitiven Blastem, differenzierten Epithel (Tubuli) und dem Stroma (mesenchymale Komponente) (Abb.1.1). Die verschiedenen Gewebe- bzw. Zelltypen können in ihrer Zusammensetzung stark variieren, sodass auch mono- sowie biphasische Wilms-Tumore vorzufinden sind, bei denen nur ein oder zwei Bestandteile eines Zelltyps dominieren. Abhängig von der Zusammensetzung der zellulären Komponenten wird der Wilms-Tumor in vier Subtypen unterteilt. Sind alle Zellkomponenten zu gleichen Anteilen vorhanden, handelt es sich um einen triphasischen Tumor bzw. einen Mischtyp. Macht eine der drei Zellkomponenten mehr als zwei Drittel des Tumors aus, wird dieser Tumor entweder als blastemreicher, epithelreicher oder stromareicher Wilms-Tumor definiert. Das Stromagewebe eines Wilms-Tumors ist oft aus verschiedenen Zelltypen zusammengesetzt, dazu zählen undifferenzierte mesenchymale Zellen und verschiedene differenzierte Zellarten, wie die quergestreifte Muskulatur, Knochen-, Knorpel- und Fettzellen (Royer-Pokora et al., 2010).

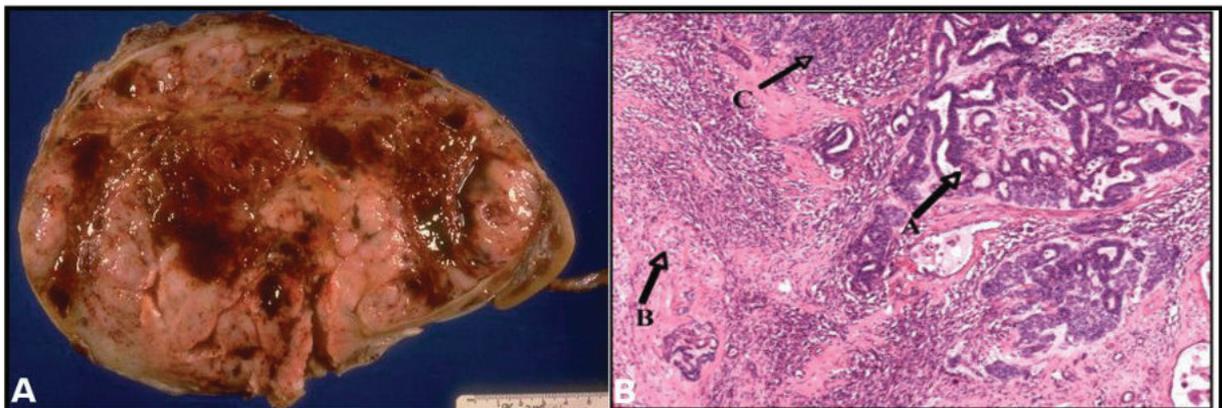


Abb. 1.1: Wilms-Tumor makroskopisch (A) und histopathologisch (B) A: Wilms-Tumor mit einem Restnierenstück und Ureter (rechts im Bild). B: Dargestellt ist ein histologischer Schnitt durch einen triphasischen Wilms-Tumor. Die einzelnen Buchstaben mit Pfeilen markieren die einzelnen Areale der verschiedenen Gewebetypen A: Epithelzellen (Tubuli), B: Stromazellen, C: Blastemzellen (entnommen von Thevendran et al., 2010).

1.4.4 Genetik des Wilms-Tumors

Die Entstehung des Wilms-Tumors sowie vieler anderer Tumore hängt mit genetischen Veränderungen zusammen, die in der Regel Gene betreffen, die für die Regulation von Zellwachstum, Differenzierung und Proliferation zuständig sind. Zunächst wurde 1969 von Ashley mit der *multiple Hit Theory* postuliert, dass die Tumorentstehung auf mehrere hintereinander folgende Mutationen zurückzuführen ist. Um das frühe Manifestationsalter des

Retinoblastoms sowie sein bilaterales Auftreten zu verstehen, wurde von Knudson und Strong 1972 das *Two Hit* Modell etabliert, welches auf epidemiologischen Beobachtungen von unilateralen und bilateralen und deren Verknüpfung zu sporadischen und hereditären Retinoblastomen beruht (Knudson, 1971). Später wurde es auf die Entstehung des Wilms-Tumors übertragen (Knudson und Strong, 1972).

Das *Two-Hit* Modell

Dieses Modell beschreibt die Tumorentstehung (Retinoblastom/Wilms-Tumor) anhand von zwei hintereinander folgenden Hits (Mutationen), die in einem Tumorsuppressorgen (TSG) stattfinden, sodass beide Allele dieses Gens inaktiv sind (Comings, 1973). Beim ersten Hit findet eine somatische oder germinale Mutation statt. Germinale Mutationen können über die Keimbahn vererbt werden oder entstehen in einer sehr frühen Phase der Zygotenbildung und liegen dann in jeder Körperzelle vor. Schlussfolgernd daraus existiert auch in jeder Nierenzelle die Mutation und eine weitere somatische Mutation (zweiter Hit) in einer beliebigen Zelle der Niere reicht aus, um ein Nephroblastom zu bilden. Patienten mit einer Keimbahnmutation bilden häufiger einen bilateralen oder multizentrischen Wilms-Tumor aus, der früher auftritt. Bei der Entstehung von sporadischen Tumoren müssen zwei genetische Veränderungen in derselben Nierenzelle stattfinden. Dieses Ereignis ist sehr selten und trägt in den meisten Fällen zur Bildung eines unilateralen Wilms-Tumors bei, der zu einem späteren Zeitpunkt auftritt (siehe 1.4.1).

Mechanismen und assoziierte Gene

Molekulargenetische Ursachen für einen zweiten Hit ist neben der bereits erwähnten Mutation der Verlust der Heterozygotie (*LOH: Loss of heterozygosity*). Verschiedene Mechanismen führen zu einem LOH, davon ausgehend, dass auf einem Chromosom bereits ein Gen mutiert vorliegt. Folgenden Konstellationen können zum Verlust der Heterozygotie führen:

- das Chromosom ohne Mutation geht verloren
- der Verlust des Chromosoms ohne Mutation mit anschließender Duplikation des Chromosoms, auf dem sich das mutierte Gen befindet
- eine mitotische Rekombination proximal von der Mutation
- eine unabhängige zweite Mutation im gleichen Gen auf dem zweiten Chromosom (Royer-Pokora et al., 2001).

WT1-Gen

Eines der ersten Gene, das mit der Entstehung vom Wilms-Tumor in Zusammenhang gebracht wurde, ist das Wilms-Tumor-Gen 1 (*WT1*), welches auf dem Chromosom 11 (11p13) lokalisiert ist. Somatische und germinale Veränderungen im *WT1*-Gen sind mit interlobaren nephrogenen Resten (ILNR) sowie mit einer stromareichen oder triphasischen Histologie eines Wilms-Tumors assoziiert (Geller, 2008). Patienten mit sporadischen Wilms-Tumoren haben in 20% der Fälle eine Mutation im *WT1*-Gen. Zusätzlich liegt eine Korrelation zwischen *WT1*-Mutationen bei stromareichen Wilms-Tumoren und weiteren Syndromen, wie dem Deny-Drash-Syndrom (DDS) und dem WAGR-Syndrom vor (Schumacher et al., 1997). Bei letzterem ist ein Allel des *WT1*-Gens deletiert, bei Patienten mit DDS liegt eine konstitutionelle Mutation im *WT1*-Gen vor (Jeanpierre et al., 1998; Fischbach et al., 2005). Bis zu 5% der Wilms-Tumor Patienten zeigen eine Keimbahnmutation im *WT1*-Gen auf (Diller et al., 1998; Huff, 1998). Hingegen weisen Patienten mit einem bilateralen WT in 16% der Fälle eine *WT1*-Keimbahnmutation auf und nur bei 3% der betroffenen Patienten sind Familienmitglieder betroffen. Unabhängig von den beteiligten Genen, die zur Entstehung eines Wilms-Tumors führen, sind nur 1 bis 2% erblich ((Breslow et al., 1996)). Neben *WT1* sind weitere Gene an der Entstehung eines Wilms-Tumors beteiligt. Dazu gehören unter anderem das β -Catenin (*CTNNB1*)-, das *p53*- und das *WTX*-Gen.

CTNNB1-Gen

In bis zu 15% der Wilms-Tumore liegt eine tumorspezifische (somatische) *CTNNB1*-Mutation vor. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass in nahezu 50% der Wilms-Tumore mit *WT1*-Mutation auch eine *CTNNB1*-Mutation vorliegt (Koesters et al., 1999; Maiti et al., 2000). In einer Studie von Royer-Pokora ließ sich bei allen *WT1*-assoziierten Wilms-Tumoren auch in allen eine *CTNNB1*-Mutation nachweisen (Royer-Pokora et al., 2008). Mutationen im *CTNNB1*-Gen führen zu einem konstitutiv aktivierten Wnt-Signalweg. Da *CTNNB1*-Mutationen weder in normalen Nierenzellen noch in nephrogenen Resten vorzufinden sind, bedeutet es, dass *CTNNB1*-Mutationen zu einem späteren Stadium der Wilms-Tumor Entstehung stattfinden.

p53-Gen

Das Tumorsuppressorgen *p53* liegt zu 75% in allen Wilms-Tumoren mit diffuser Anaplasie mutiert vor. Die Kombination aus beiden Befunden stellt einen prognostischen Marker für

ungünstige Histologie dar. Wilms-Tumore, die eine günstige prognostische Tumorphistologie zeigen, können sich im Verlauf der Tumorgenese durch den Verlust der p53-Funktion durch eine Mutation zu einem anaplastischen Wilms-Tumor transformieren, was mit einer schlechten Prognose korreliert. Damit ist das *p53*-Gen ein wichtiger prognostischer Marker eines Wilms-Tumors, der einen Einfluss auf die Behandlung hat (Bardeesy et al., 1994; Jadali et al., 2011).

WTX-Gen

Ein weiteres identifiziertes Gen, welches bei der Tumorgenese des Wilms-Tumors eine Rolle spielt, ist das *WTX*-Gen. Es ist auf dem X-Chromosom (Xq11.1) lokalisiert und liegt bei ca. 30% der Wilms-Tumore durch eine somatische Mutation inaktiviert vor (Rivera et al., 2007). Eine *WTX*-Inaktivierung tritt häufig zu einem späten Zeitpunkt während der Wilms-Tumorgenese auf, sodass es keinen ersichtlichen Effekt auf die klinische Prognose hat (Wegert et al., 2009). Zwar wurde angenommen, dass durch die späte Manifestation während der Tumorentstehung *WTX*-Mutationen nicht in nephrogenen Resten vorkommen, weiterführende Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass sowohl in ILNR, als auch in PLNR *WTX*-Mutationen vorliegen (Fukuzawa et al., 2010). Eine aktive Rolle übernimmt das *WTX*-Protein im Wnt-Signalweg, indem es ein Komplex mit AXIN1, β -TRCP2 und APC bildet und die proteolytische Degradation des CTNNB1-Proteins fördert (Jenkins et al., 2009). *WTX*-Mutationen liegen sowohl assoziiert mit *WT1*- und *CTNNB1*-Abberationen aber auch isoliert vor (Ruteshouser et al., 2008).

IGF2 und H19 in Verbindung mit LOI

Über 80% der Wilms Tumore zeigen einen LOH (loss of heterozygosity) oder ein LOI (loss of imprinting) von 11p15 (Satoh et al., 2006) auf. In der Region 11p15.5 befindet sich eine Domäne, auf der die beiden Gene *IGF2* und *H19* lokalisiert und genetisch vorgeprägt sind (Algar et al., 2007). Das *IGF2*-Gen (*insulin-like growth factor II*) kodiert für einen embryonalen Wachstumsfaktor und ist nur paternal exprimiert (paternales Allel liegt aktiv vor). Vom *H19*-Gen wird eine nicht kodierende RNA exprimiert, welche als Tumorsuppressor fungiert und nur vom maternalen Allel exprimiert wird. Die Deregulation von *IGF2* und *H19* wurde bei Patienten mit dem Beckwith-Wiedemann-Syndrom beobachtet und mit der Entstehung des Wilms-Tumors bei diesen Patienten in Verbindung gebracht (Breslow et al., 1993; De-Baun und Tucker, 1998). Ein LOI von *IGF2* zu einer aberranten Aktivierung der *IGF2*-Expression auf dem üblicherweise inaktivierten maternalen Allel führen. In manchen Fällen ist

ein LOI mit dem Verlust des maternalen Allels und einer Duplikation des paternalen Allels (uniparentale paternale Duplikation) assoziiert, was zu einer starken Expression von *IGF2* führt. Die Hypermethylierung des maternalen *H19*-Allels und somit dessen verminderte Expression führt zu einer Überexpression des *IGF2*-Gens. Die Veränderungen in der Prägung von Genen zählen zu den häufigsten genetischen Defekten bei sporadischen Wilms-Tumoren (Vuononvirta et al., 2008).

1.5 Das *WT1*-Gen

Das humane Wilms-Tumor-Gen 1 (*WT1*) ist auf dem kurzen Arm von Chromosom 11 (Genlokus 11p13) lokalisiert und erstreckt sich über einen Bereich von 50 kb. Es setzt sich aus 10 kodierenden Exons zusammen (Abb.1.3) und kodiert für ein 3 kb großes Transkript (Call et al., 1990; Gessler et al., 1990). Die Identifizierung der inaktivierten Form des *WT1*-Gens (durch Mutationen) bei Wilms-Tumoren führte zur dessen Charakterisierung als Tumorsuppressorgen mit der Funktion eines Transkriptionsfaktors. Der *WT1*-Promotor hat drei Transkriptionsstartpunkte, ist sehr GC-reich und enthält weder TATA- noch CCAAT-Boxen (Hoffmann et al., 1993). Es sind zwei alternative Spleißstellen bekannt, die zur Synthese von vier *WT1*-Haupttranskripten beitragen. Beim ersten alternativen Spleißvorgang ist das Exon 5 involviert, welches für 17 Aminosäuren (AS) kodiert. Durch das Spleißen kommt es zur An- oder Abwesenheit dieser Aminosäuren. Die zweite Spleißstelle ist am 3'-Ende von Exon 9 lokalisiert und generiert eine mRNA, die entweder die drei Aminosäuren (AS), Lysin (K), Threonin (T) und Serin (S) enthält oder nicht. Die Lokalisation der drei Aminosäuren zwischen dem dritten und vierten Zinkfinger führt zu einer Distanzveränderung zwischen den beiden Zinkfingern. Diese wiederum hat einen Einfluss auf die DNA-Bindungsspezifität des *WT1*-Proteins. Bei Anwesenheit der drei Aminosäuren KTS wird die Bindung des Proteins vermindert (Pelletier et al., 1991). Die meist verbreitete *WT1*-mRNA Variante enthält sowohl das Exon 5 sowie den kodierenden Abschnitt für die drei Aminosäuren KTS (+17aa und +KTS). Hingegen ist das Expressionslevel der *WT1*-Isoform, die weder Exon 5 noch die Gensequenz für KTS enthält (-17aa und -KTS), am geringsten (Haber et al., 1991). Das Spleißen von Exon 5 wird differenziell in einer spezie-, gewebe- und entwicklungspezifischen Weise reguliert, hingegen bleibt das Verhältnis von 2:1 der +KTS/-KTS Isoform in allen Zelltypen konstant (Wagner et al., 2003; Yang et al., 2007). Alternationen im Mengenverhältnis der +KTS-Isoform sind mit der Entstehung des Frasier-Syndroms verbunden (Klamt et al., 1998). Auch bei sporadischen Wilms-Tumoren konnte eine Imbalance der vier Hauptisoformen nachgewiesen werden und zeigt damit, dass ein Ungleichgewicht der Isoformen einen eindeutigen Einfluss auf die Tumorgenese hat (Baudry et al., 2000).

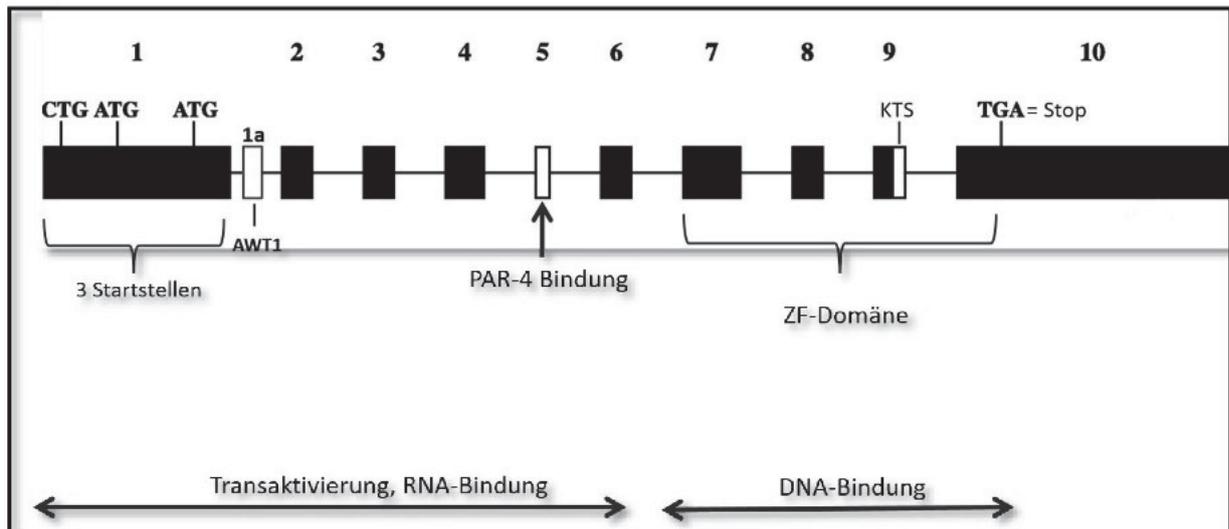


Abb. 1.3: Struktur des WT1-Gens. Übersicht der verschiedenen Entstehungsmöglichkeiten, die zur Bildung der 32 WT1-Isoformen führen. Das alternative Exon 1a sowie das an dem alternativen Spleißvorgang beteiligte Exon 5 und die KTS-Sequenz von Exon 9 sind als weißer Kasten hervorgehoben. (Verändert übernommen von Discenza und Pelletier, 2004).

WT1-Expressionsmuster

Die *WT1*-Expression beschränkt sich während der Embryogenese nicht alleine auf die Niere, sondern ist ebenso in adulten Geweben vorzufinden, wie auch in Bereichen des Urogenitalsystems und des zentralen Nervensystems. Außerdem wird es während der Hämatopoese im Knochenmark und den Lymphknoten exprimiert (Ramani und Cowell, 1996; Baird und Simmons, 1997). Die Expression von *WT1* ist nicht nur auf bestimmte Gewebe- bzw. Zelltypen beschränkt, sondern auch zeitlich limitiert. Bei der Nephrogenese erfolgt die Expression von *WT1* in den kondensierenden metanephritischen Blastemzellen, die an der Ureterknospe akkumulieren. Das *WT1*-Expressionslevel steigt an, was dazu führt, dass sich die Zellen teilen und differenzieren. In den Vorläuferstrukturen "*comma-shaped bodies*" und "*s-shaped bodies*" und den Podozytenzellen ist die höchste *WT1*-Expression vorzufinden. Mit dem Ende der Nephrogenese und dem Beginn der Filtrationsfunktion der Glomeruli wird die *WT1*-Expression eingestellt und nur noch in den Podozyten der adulten Niere beibehalten (Scholz und Kirschner, 2005). Das *WT1*-Protein hat eine entscheidende Schlüsselfunktion während des Mesenchym zu Epithel Übergangs und übernimmt damit eine essentielle Funktion bei Differenzierungsvorgängen während der Urogenitalentwicklung (Royer-Pokora und Schumacher 2001). Wie wichtig ein intaktes *WT1*-Gen ist, wurde an *WT1*-defizienten Mäusen veranschaulicht. Diese Mäuse starben intrauterin und ihnen fehlten die kompletten Nieren und Gonaden. Zusätzlich zeigten sie schwerwiegende Urogenitalfehlbildungen (Kreidberg et al., 1993). Dass *WT1* auch eine entscheidende Rolle während der Herzentwicklung spielt, haben Untersuchungen an konditionellen *Wt1^{KO}*-Mäusen gezeigt. Dabei

wurde gezielt das *Wt1*-Gen in epikardialen Vorläuferzellen deletiert, was zu einer verminderten Proliferation vom Myokardium und zu einer gestörten Bildung des koronalen Plexus führte. Des Weiteren war das Epikardium des Herzens nicht mehr in der Lage, den Epithel-Mesenchym Übergang (EMT) zu vollziehen. Die mesenchymalen Zellen bilden die Grundlage für verschiedenen Zelltypen, wie die Kardiomyozyten, glatten Muskelzellen, Fibroblasten und Endothelzellen, die an der Entwicklung des Herzens beteiligt sind (Gise et al. 2011). Dass *WT1* nicht nur eine entscheidende Funktion während der normalen Embryogenese übernimmt, sondern auch eine essentielle Rolle bei der Tumorgenese spielt, wird am Beispiel des Wilms-Tumors deutlich. Bei 5 bis 10% der sporadischen Wilms-Tumore ohne assoziierte Fehlbildung liegt das *WT1*-Gen mutiert vor (Call et al., 1990; Gessler et al., 1990). Der Großteil der identifizierten *WT1*-Mutationen lässt sich bei stromareichen Wilms-Tumoren finden. Bei blastem- und epithelreichen Subtypen des Wilms-Tumors haben *WT1*-Mutationen eher eine untergeordnete Bedeutung (Schumacher et al., 1997).

1.6 WT1-Protein

Durch die Kombination aus verschiedenen Prozessierungsereignissen, wie RNA-Editing, alternatives Spleißen (Haber et al., 1991) oder vier möglichen Transkriptionsstartstellen, (Scharnhorst et al., 1999) entstehen 32 mögliche WT1-Proteinisoformen. Eine der vier Transkriptionsstartstellen generiert eine verkürzte WT1-Proteinisoform, die bislang nur in Prostatakrebszellen, Brustkrebszellen und Leukämien nachgewiesen werden konnte (Dechukhum et al 2000). Diese Bandbreite an verschiedenen Prozessierungsereignissen führen dazu, dass das Molekulargewicht der synthetisierten WT1-Proteine zwischen 36 und 62 kDa liegt (Dallosso et al., 2004). Das Molekulargewicht der vier Hauptisoformen, die durch das alternative Spleißen von Exon 5 und KTS generiert werden, liegt zwischen 52 und 54 kDa (Scharnhorst et al., 1999). Die strukturelle Zusammensetzung des WT1-Proteins entspricht einem Transkriptionsfaktor mit einem Zinkfinger-Motiv (ZF) vom Cys₂-His₂-Typ am carboxyterminalen Ende. Diese ZFs werden von den Exons 7-10 kodiert (Haber et al., 1991) (Abb.1.4), ihre Funktion besteht aus der Interaktion mit GC-reichen DNA-Abschnitten (Nakagama et al., 1995) der Bindung an RNA (Scharnhorst et al., 2001). Auch Protein-Protein Wechselwirkungen konnten nachgewiesen werden (Spraggon et al., 2007). Ebenso befinden sich innerhalb des Zinkfinger-Motivs zwei Signalelemente, die für die Kernlokalisierung wichtig sind. Das erste Signal befindet sich innerhalb des ersten ZFs, das Zweite im zweiten und dritten ZF (Bruening et al., 1996). Die Aminosäuresequenz innerhalb der ZF-Domäne weist eine hohe Homologie zu anderen ZF-Proteinen auf, wie beispiels-

weise dem EGR1-Protein (*early growth response gene*) (Rauscher, 1993). Die aminoterminalen Region des WT1-Proteins setzt sich aus einem Glutamin/Prolin-reichen Abschnitt zusammen, indem sich zwei funktionelle Abschnitte überlappen. Ein Segment davon ist für die Homodimerisierung zuständig, das andere für die Regulation der Transkription (Schanhorst et al., 2001; Madden et al., 1993). Der glutamin- prolinreiche Bereich wird vom Exon 1 bis 5 kodiert.

WT1-KTS\+KTS Isoform

Deutliche funktionelle Unterschiede konnten zwischen den WT1+KTS und -KTS Proteinisoformen identifiziert werden. Die WT1-KTS Isoform ist in der Lage, an GC-reiche (5'-GCGTGGGAGT-3') und (5'-GCGGGGGCG-3') sowie TC-reiche (TCC)_n DNA-Sequenzen zu binden und fungiert somit als regulatorische Einheit der Transkription (Wang et al 1993; Nakagama et al., 1995). In Abhängigkeit vom Zellzyklus, Zelltyp und Promotor übernimmt die WT-KTS Isoform eine inhibierende oder aktivierende Funktion (Rauscher, 1993; Lee und Haber, 2001). Zur Identifikation von WT1-KTS Zielgenen wurden spezielle Promotor-Reporter-Konstrukte verwendet, welche die Bindungseigenschaft von WT1-KTS an die GC-reiche Sequenzen zu binden, genutzt hat. Dabei haben Analysen gezeigt, dass unter anderem die *MDR-1*, *C-myc* und *RAR-α* Gene reprimiert werden (Goodyer et al., 1995; Hewitt et al., 1995; McCoy et al., 1999). Ebenso wurden auch Gene identifiziert, deren Transkription durch WT1-KTS aktiviert wird, wozu unter anderem *p21*, *Bcl-2*, *Wnt-4* und *AREG* gehören (Englert et al., 1997; Heckman et al., 1997; Sim et al., 2002; Lee et al., 1999). Weiterführende *in vitro* Untersuchungen haben gezeigt, dass WT1-KTS die *AREG*, *EREG*, *CX3CL*, *IL-11*, *Sf1*, *Dax1* und *MIS* Gene reguliert, die an der Nieren- sowie Gonadenentwicklung beteiligt sind (Kim et al., 2007; Wagner et al., 2003).

Liegt bei WT1-Proteinen die KTS Sequenz vor, sinkt deren Bindungsaffinität an eine GC-reiche DNA-Sequenz, die zum Verlust der Transkriptionsregulation führt. Stattdessen wird der WT1+KTS Isoform eine Beteiligung an der RNA-Prozessierung zugeschrieben, die anhand von *two-hybrid*-Analysen bestätigt werden konnte. Diese haben aufgedeckt, dass WT1 mit dem Spleißfaktor U2AF65 assoziiert ist und somit bei der prä-mRNA Prozessierung zu reifer mRNA beteiligt ist (Davie et al., 1998). Zudem wurden an spezifischen Wt1-Knockout-Mäusen gezeigt, dass das Fehlen der WT1-KTS und WT1+KTS-Isoform zu unterschiedlichen Defekten des Urogenitalsystems führt (Hammes et al 2001).

Daher ist anzunehmen, dass die beiden WT1-Isoformen entscheidend für die Entwicklung des Urogenitalsystems sowie der Niere sind, ihre Aufgabenbereiche überlappen sich teilweise, sind aber dennoch klar voneinander zu unterscheiden. (Wells et al., 2010). Während

der humanen embryonalen Nierenentwicklung werden alle vier WT1-Isoformen gleichermaßen stark exprimiert. Dieses Expressionsverhältnis verschiebt sich bei der adulten Niere zu Gunsten der WT1 +Exon5/-Exon5 Isoformen um den Faktor 2. Dass die WT1 Isoform +Exon5 nicht essentiell für die Embryogenese ist, konnte anhand von Mäusen gezeigt werden, bei denen die Wt1 +Exon5 Isoform ausgeschaltet wurde. Diese Mäuse haben sich normal entwickelt, waren lebensfähig und fertil sowie ohne ersichtliche Fehlbildungen des Urogenitalsystems (Natoli et al., 2002). Dass die WT1-Isoform +Exon5 eine regulatorische Funktion besitzt, wird durch die Bindung an Par-4 deutlich, die über die Sequenzabfolge von Exon5 ermöglicht wird (Richard et al., 2001). Daher ist es anzunehmen, dass die Funktion von WT1 +Exon5 eher im Zellzyklusarrest oder in der Inhibierung der Apoptose liegt (Reddy und Licht, 1996; Scharnhorst et al., 2001). Die Expression des WT1-Proteins beschränkt sich nicht nur auf das Urogenitalsystem bzw. die fetale Niere und später auf die Podozyten der adulten Niere, sondern ist auch in Stammzellen des Knochenmarks vorzufinden. Des Weiteren konnte während der Entwicklung der Retina und des Diaphragma sowie in dem frühen Proepicardium, dem Epicardium und dem subepicardialen Mesenchym eine Expression des WT1-Proteins nachgewiesen werden (Wagner et al., 2002; Moore et al., 1998).

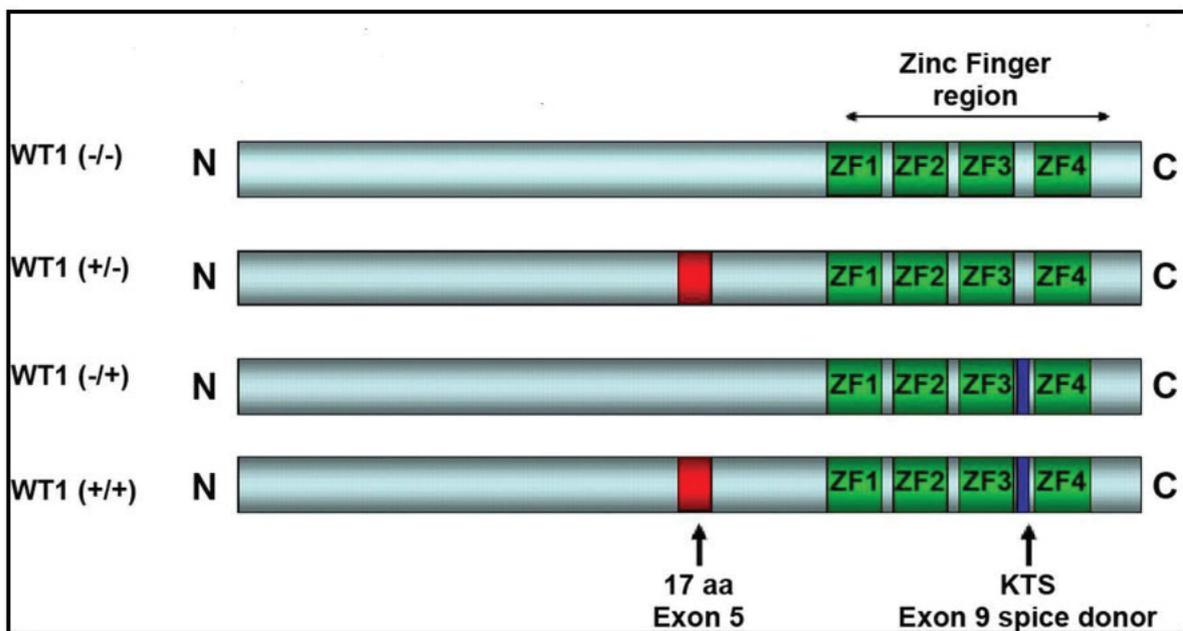


Abb. 1.4: Die WT1-Proteinisoformen. Die vier Hauptisoformen, die durch das alternative Spleißen von Exon 5 und KTS von Exon 9 entstehen. (Übernommen von Morrison et al., 2007).

1.7 Nierenentwicklung und WT1-Expression

Die Expression von WT1 während der Embryogenese ist aufgrund der unterschiedlichen zeitlichen sowie gewebespezifischen Regulationen der Expression sehr komplex. Dem WT1-Protein werden mindestens zwei Funktionen während der Nierendifferenzierung zugeschrieben. Wenn die Zellen differenzieren zu Epithel induziert WT1 zum einen den Auswuchs der Ureter aus dem Mesonephros, zum anderen sorgt es für das "Überleben" bzw. für die Aufnahme und Weitergabe von Signalen, die von der Ureterknospe ausgehen, damit das umgebende Blastem nicht die Apoptose einleitet (Mrowka und Schedl, 2000).

Es konnte gezeigt werden, dass WT1 während aller drei Nierengenerationen bei Säugetieren exprimiert wird (Armstrong et al., 1993; Rackley et al., 1993). Bereits an Tag neun der embryonalen Entwicklung (E9) einer Maus konnte eine WT1-Expression entlang der Urogenitalleiste bis zum degenerierenden Pronephros und dem Mesonephros detektiert werden (Rackley et al., 1993). Der früheste Zeitpunkt bei humanen Embryos, bei denen die WT1-Expression ermittelt werden konnte, lag in der 7. Schwangerschaftswoche (Mundlos et al., 1993; Pritchard-Jones et al., 1990). Hier wurde die WT1-Expression in den Podozyten des Glomerulus vom Mesonephros (Urniere) nachgewiesen. Bei der Ausbildung vom Metanephros (Nachniere) ist zu beachten, dass die beginnende Differenzierung vom metanephrischen Mesenchym unabhängig von WT1 ist, da es zu diesem Zeitpunkt nur schwach in dem unkondensierten metanephrischen Blastem exprimiert wird (Donovan et al., 1999; Armstrong et al., 1993). Ein enormer Anstieg der WT1 Expression ist während der Mesenchym zu Epithel Transition (MET) in dem kondensierenden Mesenchym zu verzeichnen sowie während der Ausbildung der renalen Vesikel und *comma-shaped bodies*. Solche Übergänge von Mesenchym zu Epithel sind in verschiedenen Organen zu beobachten (Birchmeier et al., 1995). Das höchste Expressionslevel erreicht WT1 im proximalen Teil vom *S-shaped body*, aus dem im Anschluss die Podozyten des Glomerulus gebildet werden. Diese bilden die einzige Zellpopulation in der ausdifferenzierten Niere, in der WT1 weiterhin exprimiert wird (Grubb et al., 1994).

Bei Untersuchungen an WT1-Knockout Mäusen kam es zu keinem Auswuchs der Ureterknospe und das metanephretische Blastem ging in die Apoptose über (Kreidberg et al., 1993). Untersuchungen an Organkulturmodellen haben offen gelegt, dass es auch bei der Kombination aus WT1-defizienten Blastem mit wildtypischer Ureterknospe zur Apoptose des Blastems kommt (Mrowka und Schedl, 2000). Damit wird deutlich, dass neben der Initiation der Nierendifferenzierung, WT1 auch eine antiapoptotische Wirkung auf die Blastemzellen der Niere ausübt.

1.8 Das *CTNNB1*-Gen (β -Catenin)

Das *CTNNB1*-Gen ist auf Chromosom 3 (Genlokus 3p33-p21.3) lokalisiert und erstreckt sich über 41,02 kBp genomischer DNA (Kraus et al., 1994). Das Gen setzt sich aus maximal 16 Exons zusammen, wobei das längste Transkript, mit einer Größe von 3737Bp, aus 15 Exons besteht. Die Promotorregion besteht aus einer TATA-Box und ist zudem GC-reich (Nollet et al., 1996). Mutationen im *CTNNB1*-Gen sind häufig in Sequenzabschnitten vorzufinden, die für Aminosäuren kodieren, die wiederum eine wichtige Rolle bei der Phosphorylierung des CTNNB1-Proteins haben. Auf der DNA-Ebene wird dieser wichtige regulatorische Abschnitt von Exon 3 des *CTNNB1*-Gen kodiert (Abb. 1.5 A). Dass Mutationen im *CTNNB1*-Gen mit der Wilms-Tumorentstehung assoziiert sind, wird das erste Mal von Koester et al., 1999 beschrieben. Dabei konnte ermittelt werden, dass bei 10-15% der Wilms-Tumore eine Mutation im *CTNNB1*-Gen vorliegt. Ebenso wurde eine Korrelation zwischen *WT1*- und *CTNNB1*-Mutationen in Wilms-Tumoren aufgedeckt (Maiti et al., 2000). In zwei unabhängigen Studien wurden Wilms-Tumore auf *WT1*- und *CTNNB1* Mutationen untersucht. In der ersten Studie wurde ein Kontingent an 71 Wilms-Tumore Proben untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass bei allen 18 Wilms-Tumoren mit *WT1*-Mutationen ebenfalls eine *CTNNB1*-Mutation vorliegt (Royer-Pokora et al., 2008). In der zweiten Studie wurden 23 Wilms-Tumore auf *WT1*, *WTX* und *CTNNB1* Mutationen untersucht. Auch hier konnte gezeigt werden, dass *CTNNB1*-Mutationen nur in Verbindung mit *WT1*-Mutationen vorkommen (Ruteshouser et al., 2008). Die Mutationen, die im *CTNNB1*-Gen vorgefunden werden, sind meistens Missense-Mutationen oder kleinere Deletionen, die ein Codon bzw. eine Aminosäure betroffen haben (Koester et al., 1999; Ruteshouser et al., 2008). Das häufige Aufkommen von Mutationen im Exon 3 des *CTNNB1*-Gens führt zur Klassifikation dieses Sequenzabschnittes als *Hotspot* Region (Abb.1.5 A). Mutationen in dieser *Hotspot* Region bewirken, dass das CTNNB1-Protein nicht phosphoryliert werden kann, was zur Folge hat, dass es nicht ubiquitinyliert wird und somit nicht dem Proteasom zum Abbau zugeführt wird. Daraus resultiert eine Stabilisierung und konstitutive Aktivierung des CNNB1-Proteins. Dies führt zu einer dauerhaften Aktivierung von CTNNB1-Zielgenen.

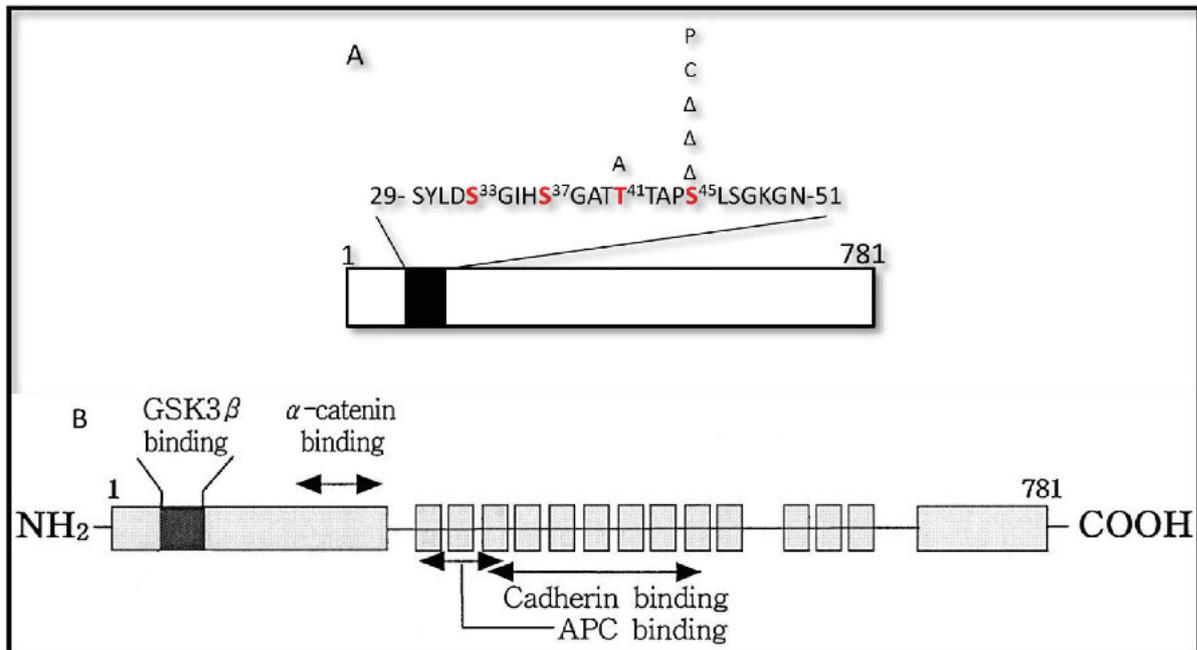


Abb. 1.5: A: Schematische Darstellung des β -Catenin Protein. Der schwarze Abschnitt markiert den Bereich, in dem die häufigsten Mutationen stattfinden (Sequenzabschnitt von Exon 3). Rot hervorgehobene Buchstaben stehen für potentielle Aminosäuren, die von GSK-3 β phosphoryliert werden. Hochgestellte Buchstaben zeigen den Austausch einer Aminosäure an der entsprechenden Position. Δ : Deletion des Codons 45 (Modifiziert übernommen aus Koester et al., 1999). **B. Darstellung der β -Catenin Bindungsdomänen.** Zu sehen sind die Bindungsstellen für GSK-3 β , α -Catenin, APC und Cadherin (übernommen von Park et al., 1999).

1.9 Das β -Catenin Protein und seine Funktion im Wnt-Signalweg

Das 92 kDa große β -Catenin Protein wird ubiquitär exprimiert und erfüllt zwei wesentliche Funktionen in einer Zelle. Zum einen ist es am Zell-Zell-Kontakt (Adherent junctions), zum anderen am kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signaltransduktionsweg involviert (Kikuchi, 2000). Für die Verbindung zweier Zellen miteinander geht das β -Catenin zunächst mit dem zytoplasmatischen Abschnitt des E-Cadherins eine Bindung ein, um anschließend durch eine weitere Bindung mit α -Catenin den gesamte Komplex mit dem Zytoskelett zu vernetzen (Hinck et al 1994). Das nicht gebundene freie im Zytoplasma befindliche β -Catenin übernimmt im Wnt-Signalweg die essentielle Funktion als Regulator der Signalkaskade. Dadurch ist es an zahlreichen Entwicklungsereignissen, wie der Differenzierung, der Morphogenese und der Proliferation während der Embryogenese beteiligt. Auch bei der Aufrechterhaltung und Erneuerung von Stammzellen (Homöostase) im adulten Gewebe spielt der Wnt-Signalweg eine wichtige Rolle (Logan und Nusse, 2004; Kikuchi et al., 2006). Initiiert wird der Wnt-Signalweg durch ein sezerniertes WNT-Protein, welches an den Komplex aus dem FZD-Transmembranrezeptor (Frizzled) und LRP5/6 Corezeptor bindet (Kikuchi et al., 2007). Daraufhin wird Dishevelled (Dsh) an die Plasmamembran rekrutiert und phos-

phoryliert. Die anschließende Bindung von Dishevelled an Axin führt dazu, dass der Multiproteinkomplex bestehend aus APC/AXIN und GSK3 β (*glycogen synthase kinase-3 β*) inaktiviert wird. Das zytoplasmatische Level an β -Catenin in der Zelle wird durch die Proteasom vermittelte Degradation niedrig gehalten. Der Abbau von β -Catenin wird vom GSK-3 β /APC/AXIN-Komplex gesteuert. Durch die Inaktivierung von diesem regulatorischen Komplex kann die unphosphorylierte Form des β -Catenin-Proteins im Zytoplasma und im Zellkern akkumulieren (Logan und Nusse, 2004; Kikuchi et al., 2007). Anschließend interagiert das β -Catenin im Zellkern mit dem Transkriptionsfaktor TCF/LEF (*T-cell-specific factor/lymphoid enhancer factor*), was zur Aktivierung von Wnt-Zielgenen führt (Hurlstone und Clevers, 2002). Die Differenzierung der Niere während der Embryogenese ist von einem funktionsfähigen Wnt-Signalweg abhängig. Es konnte belegt werden, dass es bei dem Verlust eines WNT-Gens zu dramatischen Defekten in der Niere kommen kann (Majumdar et al., 2003). Liegt kein freier Wnt-Ligand vor, wird keine Signalkaskade aktiviert, was dazu führt, dass der intrazelluläre Komplex APC/AXIN/GSK3 β das β -Catenin phosphoryliert (Abb. 1.6).

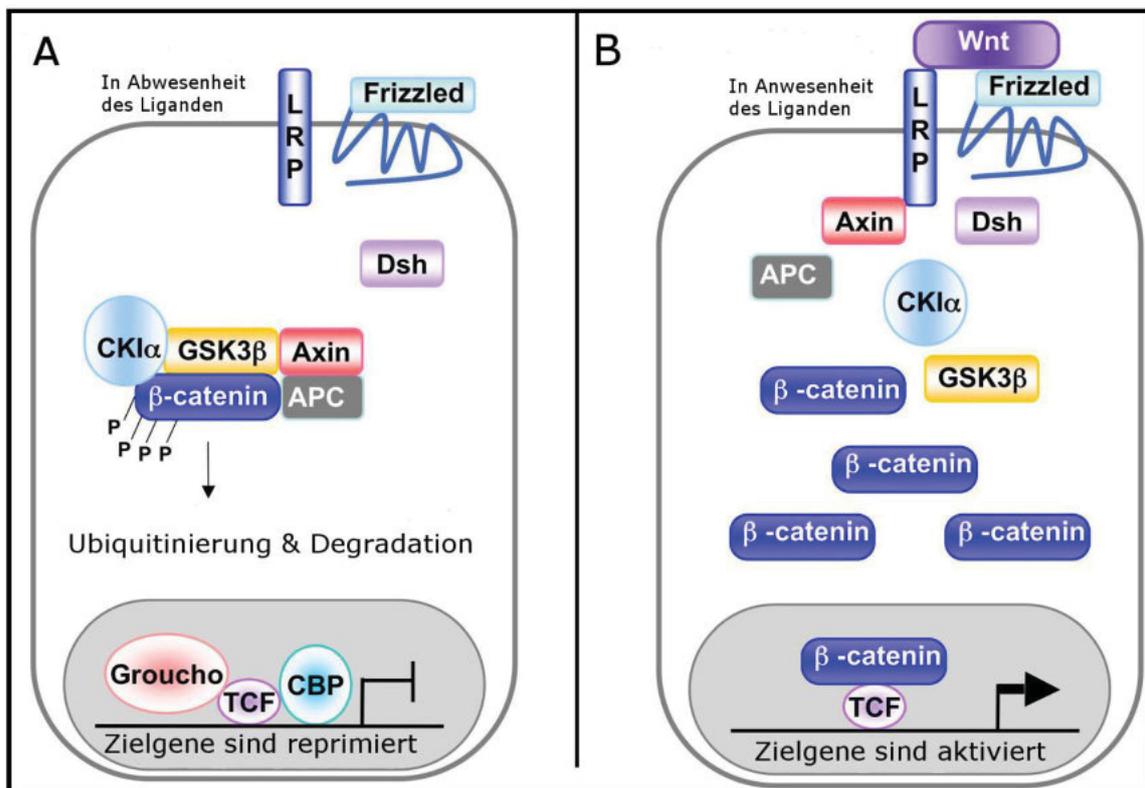


Abb.1.6: Illustrierung des kanonischen Wnt/ β -Catenin Signaltransduktionswegs. A: Wnt-Signalweg ist ohne einen Wnt-Liganden inaktiv und das β -Catenin wird im Proteasom abgebaut. **B:** Wnt-Signalweg liegt aktiv vor, durch die Bindung eines extrazellulären Wnt-Liganden (übernommen von Eisenmann, 2005).

Durch die nachfolgende Ubiquitinierung von β -Catenin durch die E3-Ubiquitin-Ligase wird das β -Catenin-Protein im Proteasom abgebaut (Aberle et al., 1997). Durch Mutationen in den Aminosäuresegmenten, die wichtig für die Phosphorylierung von β -Catenin sind, entzieht es sich der Phosphorylierung durch den APC/AXIN/GSK3 β -Komplex und kann dadurch nicht dem Proteasom zugeführt werden. Dadurch kommt es zu einer konstitutiven Aktivierung des Wnt-Signalwegs. Mutationen im *CTNNB1*- und *WT1*-Gen in Wilms-Tumoren deuten darauf hin, dass ein dauerhaft aktiver Wnt-Signalweg ebenfalls zur Entstehung eines Wilms-Tumors führt (Ruteshouser et al., 2008; Fukuzawa et al., 2007). In Kombination treten diese beiden Mutation überwiegend im stromareichen Wilms-Tumorsubtyp auf (Royer-Pokora et al., 2008).

1.10 *PAX3*-Expression bei Wilms-Tumoren

Das *PAX3*-Gen ist auf Chromosom 2, in 2q35 lokalisiert (Ishikiriyama, 1993). Es besteht aus 10 Exons, die sich über 100 kbp genomischer DNA ausstrecken. Der Promotor beinhaltet eine TATA- und zwei CCAAT-Boxen sowie mehrere CAP (*Catabolite Activator Protein*)-Bindungsstellen (Barber et al., 1999; Okladnova et al., 1999). Das *PAX3*-Gen gehört zu der Familie der *Paired-Box*-Gene und kodiert für einen Transkriptionsfaktor, der aus unterschiedlichen funktionellen DNA-Bindungsdomänen, wie der Paired-Domäne (PD), der Homöo-Domäne (HD) und der Transaktivierungs-Domäne (TA) besteht (Parker et al., 2004). Während der Embryogenese ist es an der Regulation verschiedener Entwicklungsprozesse beteiligt, wie der Myogenese, der Melanogenese und der Neurogenese (Collins et al., 2009; Wang et al., 2006; Adams et al., 2014). Die *PAX3* Expression ist im primitiven Streifen vom Mesoderm (paraxialem Mesoderm), in undifferenzierten Somiten, in der Muskulatur der Extremitäten, dem Neuralrohr und der Neuralleiste vorzufinden (Goulding et al., 1994). Genetische Veränderungen im *PAX3*-Gen sind beim Menschen mit dem Waardenburg-Syndrom vom Typ 1 und 2 (WS) assoziiert. Eine Überexpression von *PAX3* inhibiert die Apoptose und stimuliert gleichzeitig die Migration der Tumorzellen (Hirai et al., 2010). Das *PAX3*-Protein übernimmt während der embryonalen Nierenentwicklung auch eine Funktion, diese wird durch die Expression im Stroma-Bestandteil des metanephrogenen Mesenchyms deutlich, die anschließend in der perinatalen Periode nicht mehr detektierbar ist. Zudem konnte eine ektopische *PAX3*-Expression bei Wilms-Tumoren mit dem myogenen Phänotyp nachgewiesen werden (Hueber et al., 2009). Die Expression von *PAX3* ist nur bei Wilms-Tumoren mit *WT1*-Mutation zu beobachten. Dies deutet auf eine direkte oder indirekte Regulation von *PAX3* durch *WT1* hin. Somit besteht ein Zusammenhang zwischen Wilms-Tumoren mit myogenen Phänotyp und deren Expression von *PAX3*. Anhand eines

Mausmodells konnte eine *PAX3*-Expression im Stromakompartiment während der Nierenentwicklung detektiert werden. Diese Ergebnisse lassen die Annahme zu, dass die Stromazellen der Niere dem paraxialen Mesoderm entstammen (Hueber et al., 2009).

1.11 Ziel der Arbeit

Die grundlegenden Bestrebungen dieser Dissertation liegen in der Untersuchung vom wildtypischen *WT1* als Transkriptionsfaktor in einem *WT1*-defizienten *in vitro* Wilms-Tumorzellkulturmodell. Hierfür wird die DNA-bindende *WT1*-(+/-)-Isoform transient in die Wilms1-Tumorzelllinie transfiziert, um anschließend mit Hilfe von Genexpressionsuntersuchungen deren Auswirkung auf die Regulation verschiedener Signalwege zu untersuchen. Im Hinblick auf die reguläre Funktion von *WT1* während der Nierenentwicklung ist eine initiale Induktion der Differenzierung nach der Transfektion zu erwarten.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist es den Langzeiteffekt von *WT1* auf die Wilms1-Tumorzelllinie zu analysieren. Dafür soll die primäre Wilms1-Zelllinie mit dem großen SV40 T-Antigen und der humanen Telomerase (*hTERT*) immortalisiert werden. Die anschließende biologische Charakterisierung der immortalisierten Wilms1-CI.31-Zelllinie in Form von Mutationsanalysen, die Messung des Wnt-Signalwegs sowie verschiedenen Differenzierungsexperimente sollen die Identität dieser Zelllinie verifizieren. Im Anschluss wird die immortalisierte Wilms1-CI.31-Zelllinie mit einem klonierten induzierbaren sowie konstitutiv exprimierenden *WT1*-Konstrukt transduziert. Die weitere Analyse erfolgt hier ebenfalls über Genexpressionsuntersuchungen der transduzierten Zellen.

Des Weiteren wird auch die Funktion des Transkriptionsfaktors *PAX3* in der primären Wilms1-Zelllinie untersucht, dessen ektopische Expression in dem myogenen Phänotyp eines Wilms-Tumor bereits nachgewiesen wurde. Nach einem shRNA vermitteltem Knock-down der *PAX3*-Expression in den Wilms1-Zellen werden daraufhin mit Hilfe von Genexpressionsanalysen, die dadurch verursachten Veränderungen analysiert.

Der letzte Punkt dieser Dissertation befasst sich mit einer Wilms-Tumor-Patientin, die nach der Entfernung eines triphasischen Wilms-Tumors mit darauffolgender sechsmonatigen Chemo- und Strahlentherapie eine Lungenmetastase entwickelte. Die detaillierte Beschreibung dieses Falls zeigt nicht nur die heterogene Zusammensetzung eines Wilms-Tumors, sondern soll mit Hilfe von Genexpressionsanalysen zusätzlich veranschaulichen, welchen Einfluss eine sechsmonatige Behandlung auf die tumorigenen Zellen hat. Um einen best-

möglichen und schonenden Umgang mit *WT1*-assoziierten Wilms-Tumor-Patienten zu ermöglichen, liegt der Fokus auf der Analyse der Behandlungsdauer und den damit verbundenen Auswirkungen auf die Tumorzellen im Laufe einer Therapie. Hierfür werden Genexpressionsprofile von unterschiedlich lang behandelten Patienten mit einem *WT1*-assoziierten Wilms-Tumor untersucht bzw. mit nicht therapierten Wilms-Tumoren verglichen.

2. Material

2.1 Geräte

Gerätemodell	Firma
Array Laser Scanner G250	Agilent Technologies
Brutschrank	Jouan
CO ₂ -Inkubator Heracell	Thermo Scientific
CO ₂ -Inkubator MCO-17AI	Sanyo
CO ₂ -Inkubator Telstar Bio II-A	Heraeus
Feinwaage	Sartorius
Fluoreszenzmikroskop HBO 50	Zeiss
Hybridisierungsöfen	Agilent Technologies
Kühlzentrifuge	Sorvall
Kühlzentrifuge RC3B	Thermo Scientific
Luminometer	Promega
Magnetrührer	Velp Scientifica
Minizentrifuge	National Labnet
Nano Drop ND-1000	Kisker
Q-RT-PCR-Cycler MD300P	Stratagene
PCR-Cycler	Biorad
pH-Meter 766 Calimatic	Knick
Phasenkontrast/Durchlichtmikroskop	Zeiss/Leica
Photometer Ultraspec 2000	Pharmacia Biotech
Schüttelinkubator Certomat BS-1	B. Braun Biotech International
Themomixer Block	Biozym
Tischzentrifuge 5415D	Eppendorf
Tischzentrifuge 5430	Eppendorf
Vortexer	Scientific Industries
Wärmeschrank	Binder
Wasserbad	Grant/Köllermann

2.2 Software

Die experimentelle Auswertung erfolgte durch Anwendung folgender Programme:

Programm	Firma
Genomic Workbench 7	Agilent Technologies
Citavi3	Swiss Academic Software GmbH
CLC-Main-Workbench 6	CLCBio/Qiagen
CytoGenomics	Agilent Technologies
DAVID (http://DAVID.abcc.ncifcrf.gov/)	Open Source
Excel Office 2010	Microsoft
Feature Extraction Software 8.5	Agilent Technologies
GENTle	Open Source
MetaCore/GeneGO	Thompson & Reuters
GIMP 2	Open Source
GraphPad Prism 4	Graphpad Software
ImageJ	Open Source
MxPro	Stratagene
Picture Manager Office 2010	Microsoft
Powerpoint Office 2010	Microsoft
TATAR (The Array Table Retriever)	Institut für Humangenetik (Beier)
Word Office 2010	Microsoft
Zen 2011	Zeiss

2.3 Verbrauchsmaterial

Material	Firma
Deckgläser	Shandon
Chamber Slides (4 Kammern)	BD Falcon
Centrifugal Filter Units	Millipore
ECL-Hyperfilm	Amersham/GE-Healthcare
Gewebekulturschalen	Falcon/Sarstedt
Falcon Tubes	BD Falcon
Filtersystem	Corning
Immunblot PVDF Membran (0,2 µm)	Bio-Rad
Impfnadel	Nunc

Impföse	Nunc
Küvetten	Greiner
MicroAmp® Optical 8-Cap Strips	Applied Biosystems
MicroAmp® 96-Well Reaction Plate	Sarstedt
Microarray Backings	Agilent Technologies
Perfusor-Spritze OPS 50 ml	Braun
Petrischalen	Greiner
Skalpelle	Feather
SurePrint G3 Human Genome CGH+SNP 2x400k	Agilent Technologies
Steril-Filter 0,2/0,45 µm	Corning
Whatman 3MM	Schleicher & Schuell
Whole Human Genome Microarray 4x44K Slides	Agilent Technologies
Zellkulturflaschen	Sarstedt/Falcon
Zellschaber	Sarstedt

2.4 Kits

Name	Firma
Adipogenic Assay	Lonza
Amersham ECL Western Blotting Analysis System	GE-Healthcare
BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems/Lifetechnologies
Dual-Luciferase® Reporter Assay System	Promega
Gateway® LR Clonase® II Enzyme mix	Invitrogen
Gene Expression Hybridization Kit	Agilent Technologies
GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit	Fermentas
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems/Lifetechnologies
jetPRIME®DNA tranfection reagent	Polyplus
KAPA Hifi PCR Kit	Peqlab
NucleoBond Xtra Maxi EF	Macherey-Nagel
Osteogenic Assay	Lonza
QIAamp DNA Mini Kit (50)	Qiagen

QIAquick PCR-Purification Kit	Qiagen
QIAshredder	Qiagen
Quick Amp Labeling Kit, One-Color	Agilent Technologies
RNase-Free DNase Set	Qiagen
RNA Spike-In Kit, One-Color	Agilent Technologies
RNeasy Mini Kit (250)	Qiagen
SureTag DNA Labeling Kit	Agilent Technologies
T7 RiboMAX™ Express Large Scale RNA Production System	Promega
TOPO-TA Cloning Kit	Invitrogen

2.5 Lösungen/Puffer

Lösung	Firma
Acetonitril	Sigma
Acrylamid/Bis-Acryl 30%	Bio-Rad
Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad
Brilliant II QPCR Master Mix with Low Rox	Agilent Technologies
BSA (2 mg/ml)	Bio-Rad
Cyanine-3 CTP Dye Pack One-Color	Agilent Technologies
DAPI I	Sigma
dNTP-Mix (25x) (100 mM)	Invitrogen
DMSO	Sigma
DTT (0,1 %)	Invitrogen
Entwickler (Film)	AGFA
Ethanol	Merck
FastDigest Green Buffer (10x)	Fermentas
Fixierer (Film)	AGFA
Gene Expression Wash Buffer 1	Agilent Technologies
Gene Expression Wash Buffer 2	Agilent Technologies
Glycerin	Merck
H ₂ O	Braun
jetPrime-Reagent	Polyplus
jetPrime-Buffer	Polyplus
Laemmli Sample Buffer (2x)	Bio-Rad

L-Glutamin (200 mM)	Biochrom AG
Methanol	Roth
MgCl ₂ -Lösung	Invitrogen
Oligo aCGH/ChIP-on-chip Wash Buffer 1	Agilent Technologies
Oligo aCGH/ChIP-on-chip Wash Buffer 2	Agilent Technologies
Passive Lysis Buffer (5x)	Promega
Phenol: Chloroform: Isoamyl	Sigma
PBS Dulbecco (1x)	Biochrom AG
PCR-Puffer (10x)	Invitrogen
Prolong Gold antifade reagent	Life Technologies
RedSafe Intron	Biotechnology
Restore Western Blot Stripping Buffer	Thermo Scientific
RNase-freies H ₂ O	Qiagen
RT-Puffer (10x)	Invitrogen
Stabilisierungslösung	Agilent Technologies
SDS 10%	Bio-Rad
T4 DNA-Ligase Buffer (10x)	Fermentas
Triton™ X100	Sigma
Tween20	Sigma

2.5.1 Angesetzte Lösungen und Puffer

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
AN-Puffer 10x	100 mM Tris HCl pH 8,3; 500 mM KCl; 15 mM MgCl ₂ ; 0,1% Gelatine
APS (10%)	1g Ammoniumpersulfat auf 10 ml H ₂ O (-20)
Blockierlösung (IF)	4% FCS, 0,1% Tween20 in 1x PBS
Blockierlösung (IF)	4% FCS, 0,1% Tween20, 0,2% Fischgelatine in 1x PBS
CaCl ₂ -Lösung 1M	5,5g CaCl ₂ ad 50 ml
DAPI (Stammlösung)	200 µg/ml in H ₂ O
DEPC-H ₂ O	0,2% DEPC auf 1L H ₂ O
Dithiothreitol (DTT) (1 M)	5,54 g DTT ad 10 ml H ₂ O (-20°C)
HCl-Lösung (0,5 M)	1,8 g HCl ad 100 ml H ₂ O
Methylenblau (Stocklösung)	2g Methylenblau in 100 ml 70% Ethanol
Methylenblau (Arbeitslösung)	30 ml Stocklösung, 69 ml H ₂ O, 1 ml einer 1%-igen NaOH-Lösung
Natriumphosphat 1M	89g Na ₂ PO ₄ x 2 H ₂ O ad 1l, pH 7,2

Oil Red O Lösung	300 mg Oil Red Pulver in 100 ml 99% Iso- propanol
Oil Red O Arbeitslösung	30 ml Red Oil O Lösung in 20 ml H ₂ O
PBS (1x)	80 mM Na ₂ PO ₄ , 20 mM NaH ₂ PO ₄ und 100 mM NaCl pH 7,5
PBS-T	0,1% Tween20 (v/v) in 1x PBS
Permeabilisierungslösung (IF)	0,3% TritonX100 in 1x PBS
Ponceau-Färbelösung	0,1 % Ponceau S in 5 % Essigsäure
TBE (10x)	890 mM Tris-Base, 890 mM Borsäure und 20 mM EDTA

Alle Lösungen wurden mit destilliertem oder sterilem H₂O angesetzt und bei Bedarf auto-
klaviert. IF: Immunfluoreszenz.

2.6 Zellkultur

In dieser Arbeit werden von Wilms-Tumoren, die eine *WT1*-Mutation enthalten, primäre Zelllinien angelegt, näher charakterisiert und untersucht. Für diverse Experimente kommen käuflich erwerbliche Zelllinien der Firma Lonza zum Einsatz. Zusätzlich sind Zelllinien in Gebrauch, die für die Virusherstellung sowie die Bestimmung des Virustiters verwendet werden. Folgende Zelllinien werden kultiviert:

2.6.1 Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung/Herkunft
Wilms1 (MD305)	primäre Wilms-Tumor Zelllinie
Wilms1 Cl.31	immortalisierte Wilms1-Tumor-Zelllinie
Wilms6 (HIA)	primäre Wilms-Tumor-Zelllinie
Wilms6 Cl.10	immortalisierte Wilms6-Tumor-Zelllinie
Wilms10-T (ACS-T)	primäre Wilms-Tumor Zelllinie
Wilms10-T Cl.1	immortalisierte Wilms10-T Zelllinie
Wilms10-M (ACS-M)	Wilms Metastasen Zelllinie
hMSC	humane mesenchymale Stammzellen (Lonza)
hSMM	humane Muskelmyoblasten (Lonza)
HT1080	humane Fibrosarkom Zellen (Zur Verfü- gung gestellt vom Institut für Virologie, Uni- Düsseldorf)
HEK-293FT	humane embryonale Nierenzellen (Invitro- gen) für Virusherstellung

2.6.2 Zellkulturmedien und Zusätze/Lösungen

Medien	Hersteller
IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium)	Lonza
DMEM (Dulbeccos modified Eagle's Medium)	PAN-Biotech
DMEM-F12	Gibco
MSCBM (Mesenchymales Stammzellbasalmedium)	Lonza
OptiMEM® I Reduced Serum Media	Lonza
SkBM-2 (Skeletal Muscle Cell Growth Medium)	Lonza
Zusätze/Lösungen	Hersteller
Antibiotic-Antimycotic	Gibco
Bovin Serum	Gibco
FCS (Fötale Kälberserum)	Sigma
G-418 (50mg/ml)	PAA
Glutamin stabil (200mM)	PAN-Biotech
hMSC Adipogenic BulletKit	Lonza
hMSC Osteogenic BulletKit	Lonza
Horse Serum (HS)	Gibco
Hygromycin (50mg/ml)	Clontech
MEM NEAA	PAN-Biotech
MSCGM Sigle Quots	Lonza
Oil Red O	Lonza
PBS ohne Mg ²⁺ und Ca ²⁺	PAN-Biotech
Penicillin/Streptomycin Mix (100x)	PAN-Biotech
Puromycin	Merckmillipore
Sodium Pyruvate	PAN-Biotech
Trypsin/Versene (10x)	PAN-Biotech

2.6.3 Angesetzte Medien

Medium	Zusammensetzung
Adipozytendifferenzierung	20 ml MCGS; 4 ml L-Glutamin; 2 ml P/S; 2 ml β-Glycerophosphat; 1 ml Dexamethason; 1ml Ascorbinsäure; ad 250 ml Differentiation Basal Medium Adipogenese
Muskeldifferenzierung	50 ml FBS; 10 ml L-Glutamin (200mM); 0,5 ml GA-1000; 0,5 ml rhEGF; 0,5 ml Dexamethason; ad 500 ml SkBM-2
Muskeldifferenzierung (Serumreduktion)	1 ml Horse Serum; 0,5 ml P/S (100x); 0,5 ml L-Glutamin (200mM) ad 50 ml DMEM-F12

Osteoblastendifferenzierung	20 ml MCGS; 4 ml L-Glutamin; 2 ml P/S; 2 ml β -Glycerophosphat; 1 ml Dexamethason; 1ml Ascorbinsäure ad 250 ml Differentiation Basal Medium Osteogenese
Wachstumsmedium-MSCGM (für Wilms-Tumorzellen und hMSC-Zellen)	50 ml MCGS; 10 ml L-Glutamin (200mM); 0,5 ml P/S (100x) ad 500 ml MSCBM
Wachstumsmedium-DMEM (HT1080)	50 ml FBS; 5 ml P/S (100x); 5 ml L-Glutamin ad 500 ml DMEM
Wachstumsmedium-DMEM (HEK-293FT)	5 ml L-Glutamin; 5 ml Natrium Pyruvate; 5 ml MEM NEAA; 5 ml P/S; 50 ml FBS, ad 500 ml DMEM
Virales-Medium (Virusproduktion)	5 ml L-Glutamin; 5 ml FBS; 5 ml P/S; ad 50 ml IMDM
Einfrier-Medium (Kryokonservierung)	15 ml FBS; 5 ml DMSO; jeweiliges Grundmedium ohne Zusätze ad 50 ml

2.7 Bakterienkulturen

Bakterienstämme	
Name	Genotyp
One Shot MAX Efficiency DH5α (Life Technologies)	F. Φ 80/ <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (<i>r_{k-}</i> , <i>m_{k+}</i>) <i>phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 tonA</i>
Subcloning Efficiency DH5α (Life Technologies)	F. Φ 80/ <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (<i>r_{k-}</i> , <i>m_{k+}</i>) <i>phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1</i> λ -
SURE2 Superkompetente Zellen (Stratagene)	<i>endA1 glnV44 thi-1 gyrA96 relA1 lac recB recJ sbcC umuC::Tn5 uvrC e14-Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)171 F'</i> [<i>proAB+ lacI_qlacZ</i> Δ M15 <i>Tn10 Amy Cm_R</i>
Nährmedium/Lösungen	
LB-Medium	10 g Bacto Trypton; 5 g Bacto Yeast; 10 g NaCl ad 1l H ₂ O; autoklavieren
LB-Agar	10 g Bacto Trypton; 5 g Bacto Yeast; 10 g NaCl; 20 g Agar ad 1l H ₂ O; autoklavieren
SOC-Medium	Life Technologies
Ampicillin	50 mg/ml
Kanamycin	10 mg/ml

2.8 Größenmarker

DNA-Marker
O'GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder von Fermentas: 20000/10000/7000/ 5000 /4000/3000/2000/ 1500 /1000/700/ 500 /400/300/200/75

2.9 Vektoren und Konstrukte

Vektor	Beschreibung	Hersteller/Ursprung
CMV-HX1-1	<i>WT1</i> -(+/-) Expressionskonstrukt -	pUC-Vektor (CMV-Promotor) von Paul Baird zur Verfügung gestellt-Australien
M50 Super 8x TOPFlash	Acht TCF/LEF-Bindestellen	Addgene
M51 Super 8x FOPFlash	TOPFlash mutant	Addgene
MG15-luc	Mutierte p53 Bindestellen	Addgene
pBABE-hygro- <i>hTERT</i>	Kodiert Telomerase	Addgene
pCD/NL-BH	Virusherstellung	Addgene
pCZ-VSG-G	Virusherstellung	Inst. für Virologie (Prof. Dr. H. Schaal)
pENTR4	Gateway-Cloning	Invitrogen
hjpGL3-Basic	Negativ Kontrolle	Promega
pGL3-Promotor	Positiv Kontrolle CMV-Promotor	Promega
pGL4.75[hRluc/CMV]	Renilla Firefly interne Kontrolle	Promega
pipLKN	<i>WT1</i> -(-/-)-Konstrukt	pIRESpuro Vektor
plenti-CMV- <i>WT1</i> -(-/-)	<i>WT1</i> -(-/-) Expressionskonstrukt	<i>pLenti-CMV-Destination</i>
pMD2.G	Hüllenglycoprotein (VSV-G)	Addgene
pLNC-CMV-U19del89-97tsA58	Modifiziertes temperatur-sensitives T-Antigen	Parmjit Jat Institute of Neurology London
psPAX2	Verpackungsplasmid (gag/pol)	Addgene
TREAuto-V14- <i>WT1</i> -(-/-)	<i>Doxycyclin induzierbares WT1</i> -(-/-) Konstrukt	pLenti-X1-Destination

2.10 Oligonukleotide

PCR-Primer		
Gen	Primer- Name	Sequenz
<i>CTNNB1</i> Exon3 (228Bp)	bcat-fwd1	5'-GCTGATTTGATGGAGTTGGA-3'
	bcat-rev1	5'-GCTACTTGTTCTTGAGTAAA-3'
<i>WT1</i> Exon1 (350Bp)	Ex1-PCR-F	5-GCCGAGGCCAGCGCTGAACGTC-3'
	Ex1-PCR-R	5`GAGGGGGTGTCTAGAGCGGAGA 3`
<i>WT1</i> Exon8 (204Bp)	Exon-8 F	5`-GTTTCAGTCCTAGTAGGSGA-3`
	Exon-8 R	5`-CTGCCAGCAATGAGAAGTGA-3`
RT-PCR-Primer		
<i>GAPDH</i> (116Bp)	GAPDH 5'-kurz	5'-CACTGGCGTCTTCACCACCATGG-3'
	GAPDH 3'-kurz	5'-GGTTCACACCCATGACGAACATGG-3'
<i>hTERT</i>	hTERT-F	5`-AGAAAAGAGGGCCGAGCGTCTCAC-`3
	hTERT-R	5`-TGGACGTAGGACTTGCCCCTGAT-`3
TaqMan Sonden		
Gen	Sonde	Firma
<i>CTNNB1</i>	Hs00170025_m1	Applied Biosystems
<i>NKX2-5</i>	Hs00231763_m1	Applied Biosystems
<i>RER1</i>	Hs01086894_m1	Applied Biosystems
<i>WT1</i>	Hs01103754_m1	Applied Biosystems
Klonierungsprimer		
Primer-Name	Sequenz	
<i>WT1</i> -Kozak-ATG	5`-AACGAATTCACCATGGGCTCCGAC- GTGCGG-`3	
<i>WT1</i> -Stop	5`-CAACTTAAGAGTTTCGCGGTTCGAC- CTCAA-`3	

Die Oligonukleotide für die PCR und RT-PCR werden von der Firma MWG Biotech bezogen.

2.11 Antikörper

Die aufgelisteten Antikörper werden für die Immunfluoreszenz verwendet.

Primärantikörper			
Antikörper	Art	Wirt	Hersteller
Titin (H-300)	polyklonal	Kaninchen	Santa Cruz
WT1 (C19)	polyklonal	Kaninchen	Santa Cruz
Sekundärantikörper			
Antikörper			Hersteller
Anti-Maus IgG Alexa Fluor 488 o.546 markiert (monoklonal)			Invitrogen
Anti-Kaninchen IgG Alexa Fluor 488 o.546 markiert (polyklonal)			Invitrogen

3. Methoden

3.1 Zellkultur

Unter dem Begriff der Zellkultur versteht man die Kultivierung von tierischen oder pflanzlichen Zellen (höhere eukaryotische Lebewesen), die unter kontrollierten Bedingungen außerhalb eines intakten Organismus (*in vitro*) stattfindet. Dabei wird zwischen der Kultivierung von primären Zellen (Primärkultur) und immortalisierten Zelllinien unterschieden. Bei der Primärkultur werden die Zellen direkt aus einem Gewebe entnommen und zeigen meist eine limitierte Teilungsfähigkeit. Dagegen weisen Zelllinien eine stark erhöhte Lebensdauer (Zellteilungspotential) auf. Durch die Integration von regulatorischen Elementen (z.B. Telomerase) werden die Zellen immortalisiert, um somit ihr Teilungspotential aufrecht zu erhalten bzw. zu verlängern.

3.1.1 Kultivieren einer Primärkultur

Die Etablierung einer Zellkultur aus Gewebeproben eines Wilms-Tumors findet unter sterilen Bedingungen statt und erfordert eine zügige Verarbeitung des Tumorstücks. Die Aufarbeitung der Tumorprobe erfolgt mechanisch.

Anlegen einer primären Wilms-Tumor-Kultur

- Das Tumormaterial wird unter Zuhilfenahme eines Skalpell (alternativ mit einem *Tissue Chopper*) in eine Zellkulturschale, in der 1x PBS vorgelegt wird, in sehr viele kleine Stücke geschnitten
- Die Gewebestückchen werden dreimal mit 1x PBS gewaschen
- Damit sich das zerkleinerte Tumormaterial absetzen kann, wird es in einem geringen Volumen frischen Mediums aufgenommen und in eine Zellkulturflasche überführt, die bei 37°C und 5% CO₂-Begasung kultiviert wird
- In den ersten Tagen soll vermieden werden, die Kulturflasche zu bewegen
- Anschließend wird das Medium alle drei Tage gewechselt
- Bei ausreichender Menge an Tumormaterial wird ein Teil sofort eingefroren (siehe 3.1.4)

Im Rahmen dieser Arbeit werden folgende Zelllinien etabliert: Wilms1, Wilms6 und Wilms10-T (Tumor) sowie- M (Metastase).

3.1.2 Auftauen und kultivieren von adhärennten Zellen

Folgende Zelllinien werden nach Angaben des Herstellers kultiviert: Humane mesenchymale Stammzellen (hMSC), humane Muskelmyoblasten (hSMM), humane Fibrosarkom Zellen (HT1080) und humane embryonale Nierenzellen (HEK-293FT). Die Kultivierung der Zellen findet in Zellkulturflaschen bei 37°C und 5% CO₂-Begasung statt.

Prozess des Auftauens:

- Kryokonservierte Zellen unter Schütteln im Wasserbad (37°C) antauen
- Inhalt vom Kryoröhrchen in ein 15 ml Falcon überführen
- Alle zwei Minuten wird je 1 ml kaltes Kulturmedium tropfenweise hinzugegeben, bis 10 ml erreicht sind
- Zellsuspension bei 1100 rpm und 10°C für fünf Minuten zentrifugieren
- Resuspendierung des Zellpellets im entsprechenden Mediumvolumen
- Bestimmung der Zellzahl durch die Neubauer-Zählkammer
- Kultivierung erfolgt entsprechend der Zelllinien-spezifischen Dichte in Zellkulturflaschen.

Zelllinie	Zelldichte pro cm ²
WT	5x 10 ³
hMSC	5x 10 ³
hSMM	3.5x 10 ³
HEK-293FT	2-5x 10 ⁴

Tab. 3.1: Verwendete Zelllinien und ihre optimale Zelldichte zur Subkultivierung

Subkultivierung (Passagieren) der Zellen

In der Regel gilt, dass bei adhärennt wachsenden Zellen alle drei bis vier Tage das Kulturmedium gewechselt wird. Liegt ein Farbumschlag von lila/rosa zu gelb des Wachstumsmediums vor, befinden sich die Zellen in einem sauren Milieu, was auf eine hohe Stoffwechselaktivität hindeutet und das Medium daraufhin zeitnah gewechselt werden sollte. Auch die geringe Halbwertszeit von Antibiotika sowie die toxischen Stoffwechselprodukte sind Indikatoren für einen regelmäßigen Mediumwechsel. Durch die visuelle Kontrolle der Konfluenz und Vitalität der Zellen wird der Zeitpunkt bestimmt, wann die Zellen passagiert werden müssen. Jede Zelllinie wird entsprechend ihrer optimalen Zelldichte (Tabelle 3.1) ausgesät. Die HT1080-Zelllinie stammt von einem gering differenzierten Fibrosarkom eines 35-

jährigen Kaukasiers ab (Rasheed, S. et al. 1974) und wird in einem Verhältnis von 1:4 bis 1:8 gesplittet.

- Abnahme des Mediums und Zellen 3x mit 1x Trypsin/Versene (37°C) waschen
- Anschließend Zellen solange mit 1x Trypsin/Versene inkubieren, bis sich der Zellrasen löst, mechanisches Klopfen beschleunigt den Vorgang
- Zur Trypsin-Inaktivierung wird frisches Medium auf die trypsinisierten Zellen gegeben, in der Zellkulturflasche resuspendiert und in ein Falcon-Röhrchen überführt
- Mit der Neubauer-Zählkammer erfolgt die Zellzahlbestimmung
- Zellsuspension wird bei 1100 rpm für 5 Minuten zentrifugiert
- Überstand wird verworfen
- Das Zellpellet wird in der entsprechenden Menge Medium resuspendiert und je nach Größe der Zellkulturflasche in der dazu passenden Zelldichte ausgesät (Tab. 3.2)

Größe der Zellkulturflasche in cm ²	Zellzahl	Volumen an Medium in ml
T12,5	1,25x 10 ⁵	2-3
T25	2,5x 10 ⁵	5-7
T75	7,5x 10 ⁵	10-13

Tab. 3.2: Zusammenhang zwischen Größe einer Zellkulturflasche, der Zellzahl und benötigten Volumen.

3.1.3 Bestimmung der Zellzahl (Hämozytometer)

Ein wichtiger Aspekt bei der Kultivierung von Zellen ist es, für jede Zelllinie eine optimale Zellzahl auszusäen. Um dies zu ermöglichen, wird die Zellzahl mittels einer Neubauer-Zählkammer (Hämozytometer) bestimmt. Diese setzt sich aus neun gleich großen Quadraten zusammen. Die Fläche jedes Quadrats beträgt 0,04 mm². Bei einer Tiefe von 0,1 mm beträgt das Volumen 0,004 µl. Beim Auszählen der Zellen werden jeweils nur die vier äußeren Quadrate berücksichtigt (Abb. 3.1; rote Pfeile).

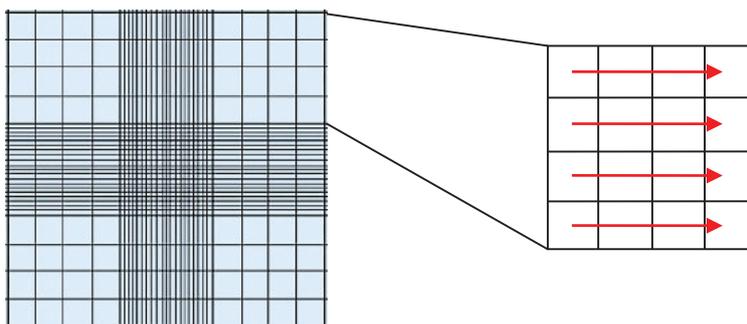


Abb. 3.1: Hämozytometer. Ein Quadrat ist vergrößert dargestellt. Die roten Pfeile markieren die Fläche, die bei der Zählung beachtet werden müssen.

Die exakte Gesamtzellzahl wird folgendermaßen ermittelt:

- Summe Σ der vier Quadrate/4= Mittelwert der Zellzahl
- Mittelwert der Zellzahl $\times 10^4$ = Zellen/ml
- Zellen/ml \times Volumen der Zellsuspension = Gesamtzellzahl

3.1.4 Kryokonservierung von Zellen

Die Vorbereitung für das Einfrieren von Zellen erfordert zuvor das Trypsinieren einer konfluenten Zellkulturflasche (siehe 3.1.2) sowie die Bestimmung der Gesamtzellzahl (siehe 3.1.3). Nach der Quantifizierung der Zellzahl werden die Zellen für 5 min. bei 1100 rpm zentrifugiert, um anschließend 5×10^5 bis $1,5 \times 10^6$ Zellen in 1,8 ml zellspezifischen Einfrieremedium (siehe 2.6.3) pro Kryoröhrchen bei -80°C einzufrieren. Die Röhrchen werden dabei in speziellen Behältern gelagert (*Freezing Container*), die mit Isopropanol gefüllt sind. Dadurch wird eine langsame und gleichmäßige Abkühlung der Proben gewährleistet. Sind die Proben für eine längere Lagerung vorgesehen, werden diese zeitnah spätestens 1 bis 2 Wochen nach dem Einfrieren in flüssigem Stickstoff bei ca. -194°C aufbewahrt.

3.2 Virusherstellung

Für einen effizienten Transfer von genetischem Material in Zellen einer Zellkultur (*in vitro*) oder in Zellverbänden eines vitalen Systems (*in vivo*) werden modifizierte virale Vektoren verwendet. Mit Hilfe dieser Vektoren ist es das Ziel, zunächst infektiöse Viruspartikel herzustellen, die gezielt stabil DNA-Sequenzen in das Erbgut einer Zelle einbauen. Dieser Vorgang wird als Transduktion bezeichnet. Dabei unterscheidet man zwischen kodierenden Sequenzen, die das gewünschte Gen von Interesse exprimieren oder einer so genannten shRNA (*short hairpin RNA*), die gegen ein bestimmtes Gen gerichtet ist, um dessen Expression auf ein Minimum zu reduzieren. Dabei wird ein natürlicher Prozess von eukaryotischen Zellen ausgenutzt, die sogenannte RNA Interferenz (RNAi), die zur "Stilllegung" von Genen führt (*Gen-Knock-Down*) (Silva und Schnierle 2010).

3.2.1 Transfektion von HEK-293FT-Zellen

Für die Herstellung viraler Partikel wird die Zelllinie HEK-293FT verwendet. Diese stammt ursprünglich von der HEK-293-Zelllinie ab, die aus einer primären embryonalen humanen Niere etabliert wurde. Zu dem Adenovirus Gen E1A enthält diese Zelllinie zusätzlich das

große SV40 T-Antigen. Das E1A-Gen sorgt für eine optimierte Virusproduktion in den HEK-293FT-Zellen (Naldini et al., 1996; Graham et al., 1977). Zusätzlich wird das Neomycin Resistenzgen stabil exprimiert und ermöglicht eine dauerhafte selektive Kultivierung der gewünschten HEK-293FT-Zellen (Invitrogen).

Basierend auf einem Drei-Plasmid-System werden in dieser Arbeit infektiöse Viren produziert (Soneoka et al., 1995). Dabei kodiert ein Plasmid für die elementaren regulatorischen Faktoren, die für das Verpacken der Viren benötigt werden. Das zweite Plasmid enthält die kodierende Sequenz für das Hüllenglykoprotein VSV-G, welches zur Erkennung von Oberflächenrezeptoren von Wirtszellen dient. Das dritte Plasmid fungiert als Transfervektor für die Zielgene und enthält neben den 5' und 3'LTRs, die das Zielgen flankieren, zusätzlich das Verpackungssignal *psi* (Ψ).

Die Herstellung der viralen Partikel wird wie folgt durchgeführt:

Tag 1: Pro 10 cm Zellkulturschale 3×10^6 HEK-293FT-Zellen in 10 ml Medium aussäen und 24 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubieren

Nr.	Arbeitsschritt	Lösung/Medium	10cm Zellkulturschale
1	HEK-293FT auspattieren	Zellen/	3×10^6
		DMEM-high	10 ml

Tag 2: Transfektion der HEK-293FT Zellen mit PEI

Verwendete Plasmidvektoren:

Plasmid	Eigenschaften	μg DNA pro 10 cm Schale
psPAX2 (10.703 Bp)	Verpackungsplasmid (gag/pol)	5 μg
pMD2.G (5.824 Bp)	Hüllenglycoprotein (VSV-G)	3 μg
Retro o. Lentiviraler Vektor mit Zielgen (Expres- sion/Knockdown)	Expressionsplasmid	10 μg

- Während der Transfektion sollten die Zellen eine Konfluenz zwischen 50 bis 70% aufzeigen.

Transfektionsansatz pro 10 cm Schale:

Nr.	Arbeitsschritt	Lösung/Medium	10 cm Schale
1	PEI-Lösung ansetzen	PEI (1mg/ml)	45 μ l
		Opti-MEM	955 μ l
2	DNA-Lösung ansetzen	Gesamt Plasmid-DNA	18 μ g
		Opti-MEM	982 μ l
3	PEI-Lösung zu DNA-Lösung zügig zugeben und gut mischen	PEI-Lösung	1000 μ l
		DNA-Lösung	1000 μ l
4	Gemisch 15-30 min bei RT inkubieren		
5	Medium von Zellen entfernen		
6	Medium mit 15% FCS auf Zellen geben (4 ml)	Opti-MEM	3,4 ml
		FCS	0,6 ml
7	DNA/PEI-Gemisch auf Zellen geben	DNA/PEI	2 ml
8	Zellen bei 37°C und 5% CO ₂ inkubieren		
9	Nach 12 h Medium wechseln	IMDM	10 ml

Tag 4: Ernte von extrazellulären Viruspartikeln aus dem Überstand der HEK-293FT Zellkultur

Bei mehr als einer 10 cm Schale pro Virusansatz wird der Überstand aller Platten in einem Falcon-Gefäß gesammelt und gemischt, um bei der anschließenden Virus-Titerbestimmung (siehe 3.2.2) eine Aussage über die tatsächliche Infektiosität der Viren zu treffen.

- 48 h nach der Transfektion wird das Medium (enthält Viruspartikel) über eine Einweg-Spritze aufgezogen
- Daraufhin wird der virale Überstand durch einen 0,45 μ m Steril-Filter in 2 ml Kryoröhrchen überführt
- Zur längeren Aufbewahrung wird der Virusstock im flüssigen Stickstoff schockgefroren und gelagert
- Vor der Titerbestimmung den Virus-Stock ÜN einfrieren.

3.2.2 Titerbestimmung aus lentiviralen Überstand

Die Einheit an infektiösen Partikeln, die in einem definierten Volumen gemessen wird, wird als Virustiter bezeichnet. Um die Konzentration an infektiösen viralen Partikeln im zuvor gewonnenen Überstand (siehe 3.2.1) zu bestimmen, wird die humane Fibrosarkomazelllinie HT-1080 verwendet. Dabei werden die Zellen mit der Virus-Lösung inkubiert, um anschließend den biologischen Virustiter zu ermitteln, der die Konzentration an infektiösen Viruspartikeln angibt.

Für die Virustiterbestimmung sind folgende Arbeitsschritte notwendig:

Tag 1: Ausplattieren der HT-1080 Zellen

Nr.	Arbeitsschritt	Medium	Kulturgefäß hier 6 Well Platte
1	HT-1080 Zellen ausplattieren	Zellen/Well	$3,5 \times 10^4$
		DMEM/Well	2 ml
2	ÜN bei 37°C, 5% CO ₂ im Brutschrank inkubieren		

Tag 2: Herstellung der viralen Verdünnungsreihe und Transduktion der Zellen

Verdünnungsreihe (Titration)

Nr.	Verdünnung	µl Medium	µl Virus Verdünnung
1	10^{-1}	1080 µl	120 µl unverdünnt
2	10^{-2}	1080 µl	10^{-1}
3	10^{-3}	1080 µl	10^{-2}
4	10^{-4}	1080 µl	10^{-3}
5	10^{-5}	1080 µl	10^{-4}
6	10^{-6}	1080 µl	10^{-5}
7	10^{-7}	1080 µl	10^{-6}

Bei der Herstellung der Verdünnungsreihe müssen folgenden Punkte beachtet werden:

- DMEM enthält 10% FCS und ist mit 5 µg/ml Polybrene versetzt
- Pro Ansatz werden 1080 µl Medium in ein Eppendorfgefäß vorgelegt
- Zugabe von 120 µl Virusüberstand und vortexen
- Spitze wechseln!

- In das nächste Eppendorfgefäß werden 120 µl der zuvor hergestellten Verdünnung hinzugegeben und erneut gevortext
- Die letzten beiden Arbeitsschritte werden solange wiederholt, bis die gewünschte Endverdünnung erreicht ist
- Abnahme vom alten Medium
- Zugabe der jeweiligen Virusverdünnung (1 ml)
- Infizierte Zellen werden ÜN bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert

Tag 3: Mediumwechsel bei HT-1080 Zellen

- Virusverdünnung von Zellen entfernen
- Zugabe vom frischen Medium (2 ml)
- Platte für 24 h bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubieren

Tag 4: Beginn der Selektion

- Durch Zugabe des entsprechenden Antibiotikums wird auf erfolgreich transduzierte Zellen selektioniert
- Alle 48 h wird das Medium mit entsprechendem Selektionsmarker über einen Zeitraum von 10 bis 12 Tage gewechselt
- Zur Ermittlung der Viruseffizienz werden die Zellen bzw. die entstandenen Kolonien mit 500 µl Methylenblau/Methanol fixiert und angefärbt, um diese anschließend zu quantifizieren

Der Titer wird in transduzierenden Einheiten pro ml angegeben (TE/ml). Bei der Berechnung geht man von einer gleichmäßigen Zellverteilung zwischen transduzierten und nicht transduzierten Zellen aus. Unter dieser Voraussetzung lässt sich mit der mathematischen Formel (Anzahl der Kolonie/Verdünnung) die transduzierenden Einheiten pro ml Überstand zum Zeitpunkt der Transduktion berechnen.

$$TE \text{ pro ml} = \frac{\text{Anzahl der Kolonie}}{\text{Verdünnung}}$$

HT-1080 Zellen und die entsprechenden Antibiotika-Resistenzen	
Geneticin G418	500 µg/ml
Hygromycin B	100 µg/ml
Puromycin	2 µg/ml

Tab. 3.3: Antibiotika Resistenz bei HT-1080

3.2.3 Virusherstellung mittels *Producer* Zelllinie

Neben dem bestehenden drei Vektor-System (siehe 3.2.1) zur Herstellung von viralen Partikeln wird in dieser Arbeit auch eine sogenannte *Producer* Zelllinie verwendet. Diese Zelllinie enthält alle notwendigen kodierenden viralen Sequenzen, die für das Verpacken, das Erkennen und Eindringen in eine Zelle sowie die Integration eines Gens von Interesse in das Wirtsgenom verantwortlich sind. Alle Elemente liegen dabei stabil im Zellgenom vor und produzieren kontinuierlich infektiös virale Partikel.

Für die Herstellung dieser infektiösen Partikel wird die TEFLAY/ts 4-13 Zelllinie, die von Parmjit S. Jat zur Verfügung gestellt wurde, verwendet. Diese Zelllinie produziert fortlaufend Viren, die das SV40 large T-Antigen kodieren (siehe 3.3).

Handhabung der TEFLAY/ts 4-13 Zelllinie

- Kultivierung der Zellen erfolgt im Selektionsmedium (G418 500 µg/ml)
- Wenn die Zellen in einer T75-Zellkulturflasche eine Konfluenz zwischen 80 und 90% erreicht haben, wird das alte Medium gegen 10 ml IMDM-Medium ohne Antibiotika gewechselt (siehe 2.6.3)
- Nach 12 h wird der virale Überstand geerntet und durch einen 0,45 µm sterilen Filter geführt
- Der filtrierte Virus wird sofort verwendet oder bei -194°C in 1,8 ml Aliquots gelagert
- Bestimmung des Virustiters (siehe 3.2.2)

Die Virusernte kann mehrfach aufeinanderfolgend wiederholt werden. Es muss darauf geachtet werden, dass die Zellen bei der Virusernte nicht zu dicht sind. Um das zu vermeiden, müssen die Zellen dementsprechend neu ausgesät werden, damit beim erneuten Mediumwechsel die Konfluenz 80 bis 90% beträgt. Zu beachten ist hier, dass der so hergestellte Virus einen deutlich höheren Titer aufweist, als die Virusproduktion über das zuvor erwähnte drei Vektor-System (siehe 3.2.1).

3.3 Immortalisierung von Wilms-Tumor-Zelllinien

In dieser Arbeit werden die Wilms-Tumor-Zelllinien Wilms1, Wilms6 und Wilms10-T immortalisiert. Es werden die Gene für die humane Telomerase (*hTERT*) und das große T-Antigen vom Simian-Virus 40 (SV40) stabil in das Genom der Wilms-Tumor-Zellen eingebaut. Die meisten Zellen haben eine begrenzte Lebensspanne und damit eine limitierte Anzahl an Zellteilungen, bevor sie in die Seneszenz eintreten (Hayflick, 1976). Um diesem vorprogrammierten biologischen Mechanismus entgegen zu wirken, wird durch das Einschleusen der Gensequenzen für *hTERT* und SV40 T-Antigen die Zellteilungsrate deutlich erhöht (Meyerson, 2000), indem der Apoptose-Mechanismus inhibiert wird (Ahuja et al., 2005). Das für die Immortalisierung verwendete SV40 große T-Antigen wurde von Parmjit S. Jat zur Verfügung gestellt und beinhaltet drei grundlegende Veränderungen (siehe 4.4). Die Immortalisierung der Wilms-Tumor-Zellen erfolgt nach folgendem Protokoll:

- In eine 12,5 Zellkulturflasche werden $1,2 \times 10^5$ Zellen ausgesät und ÜN bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert
- Nach 24 h erfolgt die Transduktion der Zellen mit jeweils 1 ml Virus für das triple mutante große T-Antigen und die humane Telomerase (*hTERT*). Pro ml Virus wird jeweils 1 µl Polybrene (5 mg/ml) hinzugegeben und bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert
- Nach 24 h wird der virale Überstand von den Zellen entfernt, gegen 2 ml MSCGM gewechselt und für weitere 48 h bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert
- Die Zellen werden bei 33°C kultiviert und es beginnt die Selektion auf G-418 (200 µg/ml) für das SV40 T-Antigen
- Für die Vereinzlung der Zellen werden diese 48 h nach Selektionsbeginn auf 10 cm Zellkulturschalen umgesetzt und dabei einmal 1000 und 10000 Zellen je Zellkulturschale ausgesät. Die Selektion wird weiterhin mit G-418 fortgeführt
- Nach sieben bis neun Tagen wird zum MSCG-Medium Hygromycin (20 µg/ml) als Selektionsmarker für *hTERT* hinzugegeben
- Im Abstand von sieben Tagen wird zwischen den Selektionsmarkern (G-418 und Hygromycin) gewechselt und die Kultivierung der Zellen findet weiterhin bei 33°C und 5% CO₂ statt
- Sobald die zuvor vereinzelt Zellen deutlich sichtbare Kolonien ausbilden, werden diese mittels Klonierungszyylinder isoliert und auf 35 mm Platten umgesetzt
- Bis die Zellen umgesetzt werden können, wird das Selektionsmedium im Wechsel (G-418 und Hygromycin) alle 2 bis 3 Tage gewechselt
- Bei Erreichen einer Konfluenz von ca. 95% werden die Zellen auf 12,5 Zellkulturflasche umgesetzt

- Erreichen die Klone in den 12,5 Zellkulturflaschen eine Konfluenz von ca. 95%, werden diese wie in 3.2.1 beschrieben weiter kultiviert oder/und eingefroren (siehe 3.1.4.)

Während der normalen Kultivierung der Klone werden diese bei 33°C und 5% CO₂ inkubiert. Versuche mit diesen Zellen werden bei 37°C durchgeführt. Dabei werden die Zellen mindestens 24 h vor jedem Versuch bei 37°C kultiviert, um das temperatursensitive SV40 T-Antigen zu inaktivieren und somit seinen Einfluss auf die Zellen auszuschalten.

3.4 Zelldifferenzierungsversuche

In dieser Arbeit werden die Differenzierungsversuche an den immortalisierten Klonen 30 und 31 der Wilms1-Zelllinie und an Klon 10 der Wilms6-Zelllinie durchgeführt. Um die Klone zu charakterisieren bzw. sie mit den Differenzierungseigenschaften ihrer primären Zellen zu vergleichen, wird ihr Differenzierungspotenzial zu Fett- Knochen- und Muskelzellen untersucht und verglichen. Als Positivkontrolle für die Fett- und Knochendifferenzierung dienen die hMSC-Zellen. Für die Muskeldifferenzierung werden die hSMM-Zellen als Positivkontrolle herangezogen.

3.4.1 Adipozytendifferenzierung

Die Differenzierung wird nach dem Protokoll der Firma Lonza *Adipogenic assay procedure* durchgeführt. Der Versuch wird in 12,5 Zellkulturflaschen angesetzt.

- Es werden $2,1 \times 10^4/\text{cm}^2$ Zellen ausgesät und im MSCG-Medium bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert
- Der Mediumwechsel erfolgt alle zwei bis drei Tage, bis die Zellen 100% Konfluenz erreicht haben
- Die Induktion der Differenzierung beinhaltet drei Zyklen, in denen die Zellen zunächst für drei Tage im Induktionsmedium kultiviert werden, gefolgt von zwei bis drei Tagen Kultivierung im *Maintenance*- Medium (siehe 2.6.3)
- Die Kontrollzellen werden während des gesamten Versuchs im *Maintenance*- Medium gezüchtet
- Nach Abschluss der drei Zyklen werden die Zellen für sieben Tage im *Maintenance*-Medium inkubiert

Der Adipozyten-Nachweis erfolgt über die *Oil Red O*-Färbung nach dem Protokoll der Firma Lonza

Oil Red O-Färbung: Nach Abnahme des Mediums werden die Zellen behutsam mit 2 ml PBS gewaschen, um anschließend mit 2 ml 10%igem Formalin für 30 Minuten bei Raumtemperatur (RT) fixiert zu werden. Die Zellen werden nach der Fixierung mit H₂O gewaschen und mit 60%-igem Isopropanol für zwei bis fünf Minuten bei RT inkubiert. Daraufhin wird das Isopropanol abgenommen und es folgt die eigentliche Färbung der Zellen mit der *Oil Red O* Arbeitslösung (siehe 2.5.1) für fünf Minuten bei RT. Abschließend werden die Zellen mehrmals mit H₂O gewaschen. Alle Zellen, die sich zu Adipozyten differenzieren, enthalten im Zellinneren rot gefärbte Fettvakuolen, die unter dem Mikroskop visuell erfasst werden können.

3.4.2 Osteoblastendifferenzierung

Die Differenzierung wird nach dem Protokoll der Firma Lonza *Osteogenic assay procedure* durchgeführt. Der Versuch wird in 12,5 Zellkulturflaschen angesetzt.

- Für die Differenzierung werden die Zellen bei einer Dichte von $3,1 \times 10^3/\text{cm}^2$ im MSCGM ausgesät und bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert
- Nach 24 h wird die Osteogenese durch Zugabe von 2 ml Osteoblasten-Induktionsmedium gestartet (siehe 2.6.3)
- Innerhalb der nächsten drei Wochen wird das Induktionsmedium alle 2 bis 3 Tage gewechselt
- Die Kontrollzellen werden über den gesamten Zeitraum im MSCGM gezüchtet

Der Nachweis der Osteoblasten-Differenzierung erfolgt über die Messung der Calcium-Konzentration in der Zellsuspension. Ein weiterer Nachweis erfolgt über die Alzarinrot-Färbung. Zellen, die die Osteogenese durchlaufen, verändern durch Calciumablagerungen ihre Zellmorphologie, die mikroskopisch zu erfassen ist.

Calcium Messung:

- Abnahme des Mediums und die Zellen zweimal mit PBS waschen
- Zugabe von 500 μl einer 0,5 M HCL-Lösung zu den Zellen und mittels Zellscharber von Boden lösen
- Zellsuspension in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführen und bei 4° C ÜN rotieren lassen

- Die Zellsuspension wird bei 7000 rpm und RT für 2 min zentrifugiert
- Der Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt

Die Calcium-Messung wird nach dem *StanbioTotal Calcium LiquiColor* Protokoll der Firma Stabio durchgeführt. Vor der Messung werden die beiden Lösungen *Color* und *Base* in einem Verhältnis von 1:1 (*Working-Reagent*) gemischt und für 15 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wird die Calcium-Konzentration mittels Spektralphotometer bei einer OD von 550 nm bestimmt.

Messabfolge:

- Blank: 1 ml Working-Reagent
- Standard: 1 ml Working- Reagent + 10 µl Standard
- Probe: 1 ml working Reagent + 10 µl Probe

Zur Berechnung der Calcium Konzentration wird folgende Formel verwendet:

$$\text{Calcium} \left(\frac{\text{mg}}{\text{dL}} \right) = \frac{OD_{\text{Probe}}}{OD_{\text{Standard}}} \times 10$$

Alizarinrot-Färbung:

Durch die Färbung der Zellen mit Alizarinrot lässt sich ebenfalls die Differenzierung von Osteoblasten nachweisen. Dabei wird das Prinzip der Calciumphosphat-Ablagerung in den Proteinen der extrazellulären Matrix ausgenutzt. Diese können mit Alizarinrot visualisiert werden. Dazu wird eine 40 mM Alizarin-Rot-S (Sigma) Arbeitslösung unter ständigem Rühren bei 50°C hergestellt und anschließend steril filtriert. Der weitere Ablauf sieht wie folgt aus:

- Abnahme des Mediums und mit 1x PBS waschen
- Fixierung der Zellen mit eiskaltem (-20 °C) 70%-igem EtOH für 1 h
- Nach Fixierung werden die Zellen mit 1x PBS gewaschen
- Zellfärbung erfolgt durch Zugabe von 2 ml Alizarinrot-Lösung für 10 min
- Zellen werden mehrmals mit 1x PBS gewaschen, bis keine Färbung der Lösung mehr stattfindet
- Zellen können mit PBS bei 4°C gelagert oder sofort lichtmikroskopisch dokumentiert werden

3.4.3 Muskeldifferenzierung

Die Differenzierung wird nach dem Protokoll der Firma Lonza, *SkeletalMuscle Myoblast Cell Differentiation to Form Myotubes*, durchgeführt. Der Versuch wird auf Objektträgern (*Chamber Slides*) angesetzt. Für die Induktion der Muskeldifferenzierung werden die Zellen im Serum reduzierten Medium kultiviert (2% Pferdeserum).

- Zellen werden bis zu einer Konfluenz von 60% kultiviert
- HSMM-Zellen werden vor der Induktion im SkGMTM-2 Medium kultiviert
- Die immortalisierten Zellklone werden vor der Induktion im MSCG-Medium gehalten
- Induktion erfolgt über die Zugabe von DMEM-F12 Medium, welches nur 2% Pferdeserum enthält
- Kontrollzellen werden über den gesamten Zeitraum ohne Differenzierungsmedium kultiviert
- Die Ausbildung von multinukleären Myotuben ist nach 3 bis 5 Tagen sichtbar

Über die Immunfluoreszenz gegen den Antikörper Titin wird der Nachweis zur Muskeldifferenzierung erbracht (siehe 3.7).

3.5 Transfektion

Die Transfektion ist ein Vorgang, bei dem Plasmid-DNA in eine eukaryotische Zelle eingeschleust wird. Dabei unterscheidet man die transiente Transfektion, bei der die Plasmid-DNA nur über einen kurzen Zeitraum in der Zelle verbleibt. Denn durch Zellteilung und Zellabbau geht diese verloren. Bei der stabilen Transfektion wird durch die Linearisierung die Plasmid-DNA in einem Verhältnis von 1:10000 stabil in das Wirtsgenom einer Zelle eingebaut. Dies führt dazu, dass bei jeder Zellteilung diese an die Tochterzelle weiter gegeben wird und dadurch auch vor Degeneration geschützt ist.

Im Zuge dieser Arbeit wurden ausschließlich transiente Transfektionen an den Wilms1 Zellen sowie deren immortalisierten Zellklonen 30 und 31 sowie Wilms6 und Wilms10-T Zellen durchgeführt. Die für Transfektionen verwendeten Vektoren sind unter 2.9 aufgeführt. Das optimale Verhältnis zwischen Plasmid-DNA und Transfektionsreagenz wurde zuvor ermittelt und beträgt 1 zu 2.

Transiente Transfektion mit jetPrime (6-Well-Platten):

- 24 h vor der Transfektion werden 2×10^5 Zellen im Wachstumsmedium ausgesät, sodass die Zellen zum Zeitpunkt der Transfektion 60-80% konfluent sind
- Pro Well werden 2 µg Plasmid- DNA in 200 µl *jetPrime*TM-Puffer verdünnt
- Den Mix vortexen und kurz zentrifugieren
- Zugabe von 4µl *jetPrime*TM Reagenz, anschließend 10 sec. vortexen und kurz zentrifugieren
- Inkubation für 10 min bei RT
- Der gesamte Transfektionsansatz (204µl) wird tropfenweise zum Medium der Zellen hinzugegeben
- Kurzes Schwenken der 6-Well Platte
- Nach 4 h wird das Transfektionsmedium gegen 2ml Wachstumsmedium gewechselt.

Je nachdem welcher Versuchshintergrund einer Transfektion zu Grunde liegt, werden die Zellen 24 oder 48 h nach der Transfektion entsprechend verarbeitet.

- Passive Lyse der Zellen für Luciferase- Assay (siehe 3.6)
- RNA Isolierung für qRT-PCR und darauffolgender Microarray (siehe 3.9.1)

3.6 Luciferase-Reporter-Assay

Zur Analyse einer Promotoraktivität bzw. Faktoren, die diesen regulieren, wird der Luciferase-Assay verwendet. Dabei wird hinter dem zu untersuchenden Promotor das Luciferase-Gen kloniert. Durch die anschließende Messung in einem Luminometer wird die Aktivität des Zielgens quantifiziert. Die Kombination aus dem zu untersuchenden Promotor vor dem Luciferasegen (*firefly*-Luciferase) wird auch als Reportergen bezeichnet. Die Konstellation aus bekannten Promotoren vor dem Luciferasegen, wie CMV (*cytomegalovirus*), TK (*thymidine kinase*) oder SV40 (*Simian virus 40*) (*Renilla*-Luciferase) wird als Kontrollreporter eingesetzt. Bedingt dadurch, dass die beiden Plasmide für unterschiedlich große Luciferase Proteine kodieren, die unterschiedliche Substrate umsetzen, ist der simultane Einsatz möglich. Die rekombinante *firefly*-Luciferase wandelt in Anwesenheit von ATP, Mg²⁺ und O₂ das Substrat Luciferin in Oxyluciferin um. Dabei entsteht neben AMP, PP_i und CO₂ auch ein Photon einer bestimmten Intensität, welches gemessen werden kann. Die gemessene Lichtintensität ist proportional zur vorher hergestellten Menge an Luciferase und somit

auch ein Maß für Promotoraktivität. Hingegen setzt die *Renilla*-Luciferase das Substrat Coelenterazine in Anwesenheit von O₂ zu Coelenteramide um. Hierbei entsteht neben CO₂ auch Licht. Die Luciferaseaktivität wird in RLU (relative light units) angegeben.

Im Rahmen dieser Arbeit werden mit Hilfe des Luciferase-Assays die Zelllinie Wilms1 und dessen immortalisierter Klon 31 auf die Aktivität des *Wnt*-Signalwegs untersucht. Die Aufarbeitung der Proben sowie die anschließende Messung erfolgte nach dem Protokoll der Firma Promega (*Dual-Luciferase^R Reporter Assay System*).

- Zellen werden 24 h vor der Transfektion in 6- Well-Platten ausgesät (siehe 3.5)
- 24 h nach Transfektion wird das Medium abgenommen und die Zellen mit 1 ml PBS gewaschen
- Zugabe von 150 µl 1x Passive Lysis Puffer pro *Well* und für 15 min bei RT schütteln
- Das Lysat wird bei -20 °C eingefroren oder sofort für die Messung verwendet
- Je Messung werden 50 µl Luciferase-Assay-Reagenz II (LAR II) in ein Luminometerröhrchen vorgelegt, anschließend werden 10 µl Zelllysate hinzugegeben und bei 560 nm gemessen (Reportergergen Messung/*Firefly-Luciferase*)
- Nach der Messung Zugabe von 50 µl 1 x Stop & Glo Reagenz und anschließende Messung (Kontrollreporter Messung/*Renilla-Luciferase*)

Für die Messung des *Wnt*-Signalwegs wird der *M50 Super 8x TOP-Flash*-Vektor, der sieben TCF/LEF Bindungsstellen aufweist, verwendet. Als negative Kontrolle für diesen Signalweg wird der *M51 Super 8x FOP-Flash*-Vektor transfiziert. Bei diesem Vektor liegen die TCF/LEF Bindungsstellen mutiert vor. Als weitere interne Kontrollen sind die *pGL3-Basic* und der *pGL3-Promotor* Vektoren eingesetzt worden. Um die Transfektionseffizienz zu ermitteln, wird bei jedem Transfektionsansatz 50 ng des *pGL4.75* Vektors, bei dem die *Renilla-Luciferase* unter der Kontrolle eines CMV-Promotors steht, mit transfiziert. Die Berechnung der spezifischen Aktivität der *Firefly-Luciferase* wird wie folgt berechnet:

$$\text{Relative Luciferase Aktivität} = \frac{\text{Aktivität}_{\text{Firefly-Luciferase}}}{\text{Aktivität}_{\text{Renilla-Luciferase}}}$$

3.7 Immunfluoreszenz

Für die Immunfluoreszenz werden zuvor 1×10^4 Zellen auf spezielle Objektträger (*Chamber Slides*) ausgesät. Je nach Versuchsanordnung erfolgt 24 h später eine Transfektion (siehe 3.5) mit Expressionsvektoren oder eine Differenzierungsinduktion der Zellen (siehe 3.4.). Nach Abschluss der Versuchsdurchführung wird das Medium abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen und das restliche Medium entfernt. Die Fixierung erfolgt mit 4%-igem Formaldehyd für 15 min bei RT. Anschließend werden die Zellen erneut mit PBS gewaschen. Die fixierten Zellen können im PBS bei 4°C gelagert werden.

Abfolge der Immunfluoreszenz-Färbung:

- Für die Detektion von Kernproteinen muss die Kernmembran zuvor permeabilisiert werden, durch 10 min bei RT in 0,3 % Triton X- 100 in PBS
- Zellen einmal mit PBS waschen
- Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen durch Inkubation in 4% FCS, 0,1% Tween20 in PBS für 30 min bei RT
- Einmal mit PBS waschen
- Verdünnung des Primärantikörpers (siehe Tabelle 3.4) in Blockierungslösung und Inkubation für 1 h bei RT
- 3x mit PBS waschen
- Inkubation mit dem jeweiligen Sekundärantikörper in Blockierungslösung (Tabelle 3.4) für 1 h bei RT und im Dunkeln
- 3x mit PBS waschen
- Kernfärbung mit DAPI ($1 \mu\text{g/ml}$) für 10 min bei RT im Dunkeln
- Mit Antifade-Einbettmedium eindeckeln
- Lagerung bei 4°C im Dunkeln

Primärantikörper		
Antikörper	Art	Verdünnung
WT1 (C-19)	monoklonal	1:100
Titin (H-300)	polyklonal	1:100
Sekundärantikörper		
Antikörper	Markierung/Farbstoff	Verdünnung
anti-Maus IgG Alexa-Fluor 488	grün	1:400
anti-Kaninchen IgG Alexa-Fluor 488	grün	1:400

Tab. 3.4: Primär- und Sekundärantikörper. Verdünnungen für die Immunfluoreszenz

3.8 DNA

3.8.1 DNA-Isolierung mittels QIAamp DNA Mini Kit von Qiagen

Die Verwendung dieses Kits ermöglicht es, aus Geweben und Zellen die genomische DNA zu isolieren. Die Isolierung wird strikt nach den Angaben des Herstellers durchgeführt und in folgende Arbeitsschritte unterteilt:

- Zell-Lyse
- Protease- und RNase-Verdau
- Bindung der DNA an die Silika-Membran
- Entfernung von nicht DNA-Komponenten durch Waschschritte
- Einsatz von Niedrigsalzpuffer zur Elution der DNA

Die selektive Bindung der DNA an die Silika-Membran wird durch die Verwendung von definierten pH-Werten und Salzkonzentrationen ermöglicht. Die anschließenden Waschschritte entfernen die nicht gebundenen Komponenten.

3.8.2 DNA-Fällung

Eine gängige Methode zur Konzentration oder Reinigung der DNA ist die Fällung dieser mit Alkohol. Durch eine hohe Salzkonzentration und Ethanol wird die DNA präzipitiert.

- Vorhandene DNA in μl
- Zugabe von 1/10 Volumen 3 M NaAC
- Zugabe von 3 Volumen 100 %-igem Ethanol
- Gut mischen und 10 min auf Eis stellen, bei geringer Menge für 2 h bei -20°C inkubieren
- Anschließend 10 min bei 12000 rpm zentrifugieren
- Überstand verwerfen und 300 μl 70%-iges Ethanol hinzugeben
- Bei 12000 rpm für 3 min zentrifugieren
- Überstand verwerfen und das Pellet bei RT trocknen
- Pellet in einem entsprechenden Volumen aufnehmen

3.8.3 Plasmidisolierung mittels Miniprep Kit (Thermo Scientific)

Durch animpfen von Bakterienkulturen werden zunächst Plasmide vervielfältigt. Hierzu werden 5 ml LB-Medium mit einer Bakterienkolonie von einer Agarplatte versetzt und bei 225 rpm und 37°C für ca. 6 bis 8 h im Schüttler mit entsprechendem Selektionsantibiotikum inkubiert. Daraufhin wird die Bakterienkultur bei 4000 rpm für 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die anschließende Plasmidpräparation erfolgt strikt nach Angaben des Herstellers.

Aufarbeitung:

- Das Zellpellet wird in 250 µl Resuspensionspuffer aufgenommen und in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt
- Zugabe von 250 µl Lysepuffer und 4 bis 6x invertieren
- Neutralisation durch Zugabe von 350 µl Neutralisationspuffer und erneutes invertieren
- Zentrifugation für 5 min bei 12000 rpm
- Überstand auf die GeneJet™-Säule geben und für 1 min bei 12000 rpm zentrifugieren
- Zugabe von 500 µl Waschpuffer und 1 min bei 12000 rpm zentrifugieren, der Durchfluss wird verworfen, der Waschschrift wird wiederholt und der Durchfluss erneut verworfen
- Zum Entfernen der restlichen Waschlösung wird erneut für 1 min bei 12000 rpm zentrifugiert
- Säule wird in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 50 µl Elutionspuffer hinzugegeben
- 2 min bei RT inkubieren und 2 min bei 12000 rpm zentrifugieren
- Eluat wird bei -20°C gelagert.

3.8.4 Plasmidisolierung mittels Midi-Präparation (Macherey-Nagel)

Es wird 1 ml einer Bakterienkultur in 250 ml LB-Medium mit 250 µl Ampicillin (100 mg/ml) gegeben und ÜN bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Die Bakterienkultur wird nach 24 h für 25 min bei 4°C und 4000 rpm zentrifugiert. Die anschließende Plasmidisolierung wird nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Dazu wird das Zellpellet resuspendiert (*RES-EF*) und mittels eines alkalischen Lyse-Puffers lysiert (*LYS-EF*). Durch Zugabe des Neutralisierungs-Puffers (*NEU-EF*) wird die Lyse gestoppt. Bevor das Lysat auf die Säule gegeben wird, erfolgt die Äquilibration dieser (*EQU-EF*) mit anschließendem Waschvorgang (FIL-

EF). Alle Zellbestandteile, die nicht in die Lösung gegangen sind und sich im Filter angesammelt haben, werden samt dem Filter verworfen. Um die Endotoxine zu inaktivieren, die sich im Lysat befinden, wird die Säule mit einem *ENDO-EF* Puffer gewaschen. Es folgt ein weiterer Waschschrift (*WASH-EF*) bevor die Plasmid-DNA eluiert und mit Isopropanol gefällt wird. Das DNA-Pellet wird mit 70% Ethanol gewaschen, um anschließend in 200 bis 400 µl TE-Puffer aufgenommen zu werden.

3.8.5 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung einer DNA-Lösung erfolgt über die Messung der optischen Dichte (OD). Dabei wird die Eigenschaft der Nukleinsäure, Licht bei einer festgelegten Wellenlänge zu absorbieren, ausgenutzt. Durch die Messung des Absorptionsmaximums der DNA bei einer Wellenlänge von 260 nm in einem Spektralphotometer (Nano-Drop-Spektrophotometer ND-1000) kann die Konzentration ermittelt werden. Anhand der folgenden Formel wird die DNA-Konzentration errechnet:

$$OD_{260} \times \text{Verdünnung} \times 50 = \text{DNA} \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$$

Bei einer reinen DNA-Lösung beträgt der Quotient $OD_{260} / OD_{280} \sim 1,8$. Liegt der Quotient unterhalb von 1,8, so deutet dies auf eine Kontamination mit Protein, Phenol oder anderen Substanzen hin, die eine stärkere Absorption bei 280 nm haben.

3.8.6 Polymerasen-Kettenreaktion (PCR)

Um *in vitro* gezielt bestimmte Bereiche der Nukleinsäure exponentiell zu amplifizieren, wird die Methode der PCR verwendet. Für die Amplifikation von DNA-Abschnitten wird zunächst die zu amplifizierende DNA als Matrize, eine thermostabile DNA-Polymerase, zwei Oligonukleotid-Primer, welche die DNA-Matrize flankieren und komplementär zu dieser sind, benötigt. Des Weiteren werden DNA-Polymerasepuffer und ein dNTP-Mix (Desoxynukleotide) gebraucht. Eine PCR läuft nach folgenden Muster ab:

1. Schritt: Denaturierung der genomischen DNA/Matrizen-DNA, dabei wird die DNA auf 93-95°C erhitzt.
2. Schritt: Anlagerung (*Annealing*) der strangspezifischen Oligonukleotid-Primer an die komplementäre Sequenz.
3. Schritt: DNA-Synthese (Elongation), erfolgt in der Regel bei etwa 70-75°C.

Im Durchschnitt wird nach 25 bis 35 Zyklen eine ausreichende Menge des gewünschten DNA- Abschnitts erzeugt.

Amplifizierter Abschnitt	Fragment-Größe (Bp)	Annealing Tem. (°C)	Denaturierung, Annealing, Elongation	PCR-Zyklen	PCR-Puffer
WT1- Exon 1	569	53/54/55/56 °C	30 sek., 30 sek., 2 min	6/6/6/20	HighFidelity 15mM MgCl ₂
WT1- Exon 8	210	58°C	1 min., 1 min., 1 min	35	HighFidelity 15mM MgCl ₂
CTNNB1- Exon 3	228	55°C	30 sek., 30 sek., 30 sek	35	10x Invitrogen+ 2mM MgCl ₂

Tab. 3.5.: PCR- Bedingungen für das WT1- und CTNNB1- Gen. Bp: Basenpaare; min: Minuten; sek: Sekunden

3.8.7 Aufreinigung von PCR-Produkten

Damit die PCR-Produkte auch für weitere Analysen verwendet werden können, wie beispielsweise die Durchführung einer Sequenzierung, werden diese aufgereinigt. Dies geschieht mit Hilfe des *QIAquick PCR Purification Kits* der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers. Zunächst werden die PCR-Produkte an die Silika-Membran gebunden, was in Anwesenheit eines Hochsalz-Puffers (PBI-Puffer) erfolgt. Als nächstes wird die Säule mehrmals mit einem PE-Puffer gewaschen, um die verbliebenen Primer, Proteine und freien Nukleotide zu entfernen. Die Elution der PCR-Produkte erfolgt in 35 µl eines Niedrigsalz-puffers (EB- Puffer).

3.8.8 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung nach Sanger (Sanger et al., 1997), die auch als Didesoxynukleotid-, oder Kettenabbruch-Reaktion bezeichnet wird, ist eine enzymatische Methode, bei der die DNA-Polymerase während einer PCR neben den üblichen dNTPs auch ddNTPs einbaut. Durch den Einbau der ddNTPs kommt es zu einem Kettenabbruch. Dieser ist auf das Fehlen einer Hydroxylgruppe am 3'- Kohlenstoffatom zurück zu führen, die für die Phosphodiesterbindung zwischen zwei aufeinander folgenden Nukleotiden essential ist. Jedes der vier ddNTPs enthält einen spezifischen Fluoreszenzfarbstoff, welcher nach einem Gellauf durch einen Laser detektiert werden kann. Bevor eine Sequenzierreaktion durchgeführt wird, werden die dafür benötigten PCR-Produkte aufgereinigt (siehe 3.8.7). Für die Sequenzierung wird das *BigDye® Terminator Kit* verwendet.

Sequenzierreaktion: 15 ng PCR-Produkt
 0,5 µl spezifischer Primer
 1,5 µl 5x BigDye® Reaktions Puffer
 1 µl BigDye® Mix
 ad 10 µl

PCR-Programm:

PCR-Schritte	Temperatur in °C	Zyklen	Zeit in min
Vorabdenaturierung	94	1	2:00
Denaturierung	96	25	0:10
Anlagerung	50		0:05
Synthese	60		4:00
Kühlen	4	1	∞

Tab. 3.6: PCR-Programm für die Sequenzierreaktion

Aufreinigung der Sequenzierreaktion:

10 µl Sequenzierreaktion
 46 µl H₂O
 6,3 µl NaAc (3M)
 156 µl 100% Ethanol (RT)

- Ansatz gut mischen und für 30 min bei 12.000 rpm zentrifugieren
- Überstand vorsichtig abnehmen
- Waschen mit 200 µl 70% Ethanol (event. 2 x)
- 15 min bei 12.000 rpm zentrifugieren
- Überstand vorsichtig abnehmen
- Pellet 10 min bei 37°C im Brutschrank trocknen

Im Biomedizinischen Forschungszentrum (BMFZ) der Heinrich-Heine Universität erfolgt der Gellauf der Sequenzierreaktion.

3.8.9 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese gehört zu den biochemischen Trennverfahren, welche die Fähigkeit besitzen, geladene Moleküle in einem Feld wandern zu lassen. Die chemische Zusammensetzung von Nukleinsäuren macht diese wegen ihres Zucker-Phosphat-Rückgrats zu einem Polyanion, welches negativ geladen ist und somit in einem elektrischen Feld zur Anode

läuft. Die Wanderungsgeschwindigkeit von Nukleinsäuren hängt dabei von ihrem Molekulargewicht, ihrer Konformation, der elektrischen Feldstärke und der Gelkonzentration ab. Die Herstellung aller Agarosegele erfolgt in 1x TBE, welches mit der *RedSafe*TM-Lösung (1:20.000) angesetzt wird. Dabei handelt es sich um einen Fluoreszenzfarbstoff, der mit der DNA interkaliert und bei UV-Bestrahlung (309nm/419nm) emittiert.

3.8.10 Geelution mittels QIAquick Gel Extraktion Kit (Qiagen)

Für die Geelution wird das zu eluierende Produkt auf ein *Low-Melt* Agarosegel aufgetragen. Um UV-Schäden beim Produkt zu vermeiden, wird ein weiteres Aliquot (Referenz-Probe) auf das Gel aufgetragen. Anschließend wird das Gel so zurecht geschnitten, dass nur die Referenzprobe auf dem UV-Tisch betrachtet und ausgeschnitten wird. Das so entstandene Gelstück mit der Lücke dient als Orientierungshilfe zur Entfernung der DNA-Bande (Probe), ohne diese dem UV-Licht auszusetzen. Die ausgeschnittene DNA-Bande wird in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß aufgenommen und ihr Gewicht bestimmt. Zu einem Volumen Gel werden drei Volumen QG-Puffer gegeben, bei 50°C für 10 min inkubiert und alle 2- 3 min gevortext. Anschließend wird zu dem gelösten Gelstück 1 Volumen Isopropanol hinzugefügt, gut durchmischt und auf die Säule gegeben. Diese wird für 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen, die Säule mit 500 µl QG-Puffer gewaschen und erneut für 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Es werden 500 µl PE-Puffer hinzugefügt und für 5 min bei RT inkubiert, um daraufhin für 1 min bei 13.000 rpm zu zentrifugieren. Für die Entfernung des restlichen Ethanol wird die Säule erneut kurz leer zentrifugiert und bevor im Anschluss die DNA in 30 µl Elutionspuffer eluiert wird, inkubiert diese für 1 min bei RT.

3.9. RNA

3.9.1 Isolierung der RNA (RNeasy Kit: Qiagen)

Mit Hilfe dieser Methode kann die Gesamt-RNA aus Zellen und Geweben isoliert werden. Um die Zellen aufzuschließen, werden diese mittels eines guanidinisothiocyanathaltigen Puffers, welcher gleichzeitig zur Inaktivierung von RNasen dient, lysiert. Die Homogenisierung der Zellen und deren DNA-Degradation erfolgt über die *QIAshredder*-Säule. Daraufhin wird die Zellsuspension auf eine weitere Säule gegeben, wo die RNA unter Hochsalzbedingungen an eine Silika-Membran gebunden wird (absorbiert). Alle weiteren Inhaltsstoffe der Suspension werden durch Zugabe verschiedener Puffer von der Membran gewaschen. Da

nicht nur die RNA an die Membran bindet, sondern auch die DNA, wird ein DNase-Verdau durchgeführt:

- 10 µl DNase (10U/µl) + 70 µl RDD Puffer (aus RNase free DNase Set) werden direkt auf die Membran pipettiert und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.
- Die darauffolgende Elution der RNA erfolgt mittels Niedrigsalzpuffer.
- Die Isolation der RNA erfolgt streng nach Angaben des Herstellers.

3.9.2. Konzentrationsbestimmung der RNA

Die Konzentrationsmessung der RNA wird mit Hilfe eines Nano-Drops (*ND-1000 Spectrometers*) durchgeführt. Die Messung der optischen Dichte der RNA- Lösung erfolgt bei 260 nm. Nach folgender Formel wird die Konzentration bestimmt:

$$OD_{260} \times \text{Verdünnung} \times 40 = \text{RNA} \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$$

3.9.3 Qualitätsbestimmung der RNA mittels Bioanalyzer

Die Bestimmung der RNA-Qualität ist ein wichtiger Zwischenschritt vor der Durchführung eines Expressionsarrays. Hierfür wird die zu untersuchende RNA mit Hilfe eines Bioanalyzers auf einem *RNA6000 Nano Chip* (50- 500 ng/µl) untersucht. Die Analyse der RNA-Proben werden vom Biomedizinischen Forschungszentrum (BMFZ) der Universität Düsseldorf durchgeführt. Dabei wird eine ribosomale Kontroll RNA- Probe als Referenz gegenüber den zu untersuchenden RNA-Proben gestellt, um die Qualität zu ermitteln. Die Ergebnisse werden in einem Elektropherogramm dargestellt, welches drei Peaks abbildet. Dabei wird zwischen den zwei Hauptpeaks unterschieden, die die 18S- und 28S- rRNA repräsentieren und dem Nebenpeak, der für die 5S und 5,8S- rRNA sowie die tRNA steht. Ein wichtiges Merkmal für eine unbeschädigte RNA Probe ist das Verhältnis des 18S- und 28S Peaks. Liegt dieses bei 1:2, spricht es für eine ideale RNA-Aufreinigung. Die Einteilung der RNA-Qualität erfolgt dabei als RNA-Integritätsnummer (RIN), dessen Skala von 10 (gut) bis 1 (schlecht) geht. Alle RNA Proben, deren RIN-Werte unter 8 lagen, wurden nicht für weiterführende Experimente verwendet.

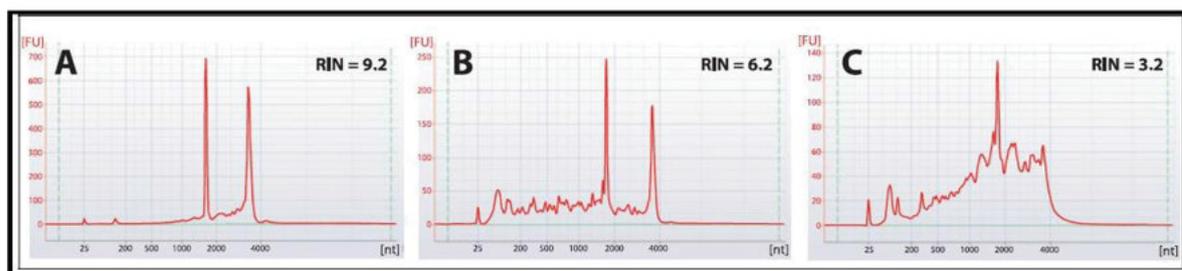


Abb. 3.3: Elektropherogramm von drei RNA-Proben, die sich in ihrer Qualität unterscheiden. Die RNA-Qualität nimmt von A bis C stetig ab. Erkennbar an den abnehmenden RIN- Werten und den Degradationsprodukten der 18S- und 28S-RNA.

3.9.4 Reverse Transkriptase (cDNA-Synthese)

Bei dieser Methode werden mRNA-Moleküle durch eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, der Reversen Transkriptase, in komplementäre doppelsträngige DNA-Kopien (cDNA) umgeschrieben. Die dadurch entstandene cDNA kann für weiterführenden PCR- Versuche eingesetzt werden.

Reaktionsansatz (cDNA-Synthese):

1- 5 µg	RNA
1 µl	Oligo-dT-Primer (100 ng)
ad 9,2 µl	DEPC H ₂ O

Inkubation für 10 min bei 72°C, anschließend kurz zentrifugieren und auf Eis stellen

1,3 µl	BSA (1,5 mg/ml)
0,5 µl	RNasin (40 U/µl)
2,0 µl	0,1 M DTT
1,0 µl	10 mM dNTP`s
4,0 µl	5x RT-Puffer
1,0 µl	Superskript II-RT 200 U/µl

Nach Zugabe aller Komponenten wird die Reaktion für 60 min bei 37°C inkubiert. Inaktivierung erfolgt bei 95°C für 10 min. Die cDNA-Proben werden bei -20°C gelagert. Zur Prüfung der DNA Kontamination wird bei jeder Reaktion eine Kontrolle angesetzt, allerdings ohne die Zugabe der Superskript II-RT.

3.9.5 cDNA-Synthese für die quantitative TaqMan Real- Time RT-PCR

Für die Synthese der cDNA wird das *TaqMan Reverse Transcription Reagents* der Firma Agilent verwendet. Dabei wird nach den Angaben des Herstellers gearbeitet.

Reaktionsansatz (cDNA- Synthese):

400 ng	RNA-Probe
2,0 µl	10x TaqMan RT Puffer
2,0 µl	10x RT Random Primer (5 µM)
1,0 µl	RNase Inhibitor (20 U/µl)
1,0 µl	MultiScript RT (50 U/µl)
0,8 µl	25x dNTP Mix (100mM)
ad 20 µl H ₂ O (DEPC)	

Nach der Synthese wird die Reaktion auf 100 µl mit H₂O (DEPC) aufgefüllt

Synthese Bedingungen:

10 min	25°C
120 min	37°C
5 min	85°C

Die cDNA Proben werden bei -20°C gelagert. Bei jeder Reaktion wird eine Kontrolle ohne die Zugabe der Superskript II-RT mitgeführt.

3.9.6 Quantitative Real- Time RT-PCR (TaqMan)

Die quantitative Real-Time- PCR ist eine Amplifikations-Methode von DNA-Molekülen, die auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerasen- Kettenreaktion (PCR) beruht. Diese Methode eignet sich zur quantitativen Auswertung der Expression eines Gens. Zur Quantifizierung stehen dabei zwei Techniken zur Auswahl. Zum einen die absolute Quantifizierung, welche mit einer Kalibrierkurve (Pfaffl, 2001), die auf einer Verdünnungsreihe von RT-PCR Produkten, *in vitro* transkribierter RNA, Plasmid- DNA, synthetisierter DNA oder RNA Oligomere basiert, die Expression eines Gens bestimmt.

Zum anderen die relative Quantifizierung, bei der Genexpression eines Zielgens auf ein Referenz-Gen, ein sogenanntes *Houskeeping*-Gen (HKG), bezogen wird. Dieser Prozess wird als Normalisierung der Expression bezeichnet. Die Quantifizierungen der PCR-Produkte erfolgen über TaqMan-Sonden, bei denen es sich um genspezifische Hybridisierungs-sonden (Primer) handelt, an denen Fluorochrome gebunden sind. Im Rahmen dieser

Arbeit wird ein TaqMan-Assay der Firma Applied Biosystem verwendet. Die eingesetzten Sonden sind so konzipiert, dass sie am 3'-Ende mit einem nicht fluoreszierenden Quencher-Farbstoff und am 5'-Ende mit einem fluoreszierenden Reporterfarbstoff (FAM) markiert sind. Durch die räumliche Nähe von Reporter- und Quencher-sonde wird der Energietransfer (Fluoreszenz), ausgehend vom Reporter an den Akzeptor (Quencher), weitergeleitet und somit unterdrückt und nicht messbar. Neben den TaqMan-Sonden enthält der Assay auch eine Taq-Polymerase mit einer 5'-3'-Nukleaseaktivität. Während der Real-Time PCR-Reaktion kommt es dadurch zu einer hydrolytischen Spaltung der TaqMan Sonden. Die Distanz zwischen Reporter- und Quencher-Farbstoff nimmt zu, was eine Messung der Reporter-Fluoreszenz ermöglicht. Für die Quantifizierung der eingesetzten Startmenge an cDNA-Molekülen wird der C_T -Wert herangezogen. Dieser gibt die Anzahl an PCR-Zyklen wieder (Threshold Cycle), die erforderlich sind, um ein festgelegtes Fluoreszenzniveau zu erzielen. Bei einer 100 %-igen Effizienz der PCR verdoppelt sich mit jedem Zyklus die DNA-Molekülzahl sowie die Fluoreszenzeffizienz. Für die relative Quantifizierung wird die Expression vom Referenzgen (HKG) *RER1* zur Normalisierung innerhalb und zwischen einzelnen Experimenten herangezogen. Das *RER1*-Gen wird in den etablierten Wilms-Tumorzelllinien stabil exprimiert und eignet sich aus diesem Grund als Referenzgen.

Reaktionsansatz:

10 μ l	2x Brilliant II qPCR Low ROX Master Mix
1 μ l	TaqMan Genexpression Assay Mix
5 μ l	cDNA (20ng)
4 μ l	H ₂ O

Zyklen	Dauer eines Zyklus	Temperatur
1	10 min	95°C
40	15 sek.	95°C
	1 min	60°C

Tab. 3.7: PCR-Bedingungen für die TaqMan qRT-PCR

Um eine statistische Auswertung aller untersuchten Proben zu ermöglichen, wird jede Reaktion in Triplikaten durchgeführt. Im Anschluss wird über die $\Delta\Delta C_T$ -Methode (Livak und Schmittgen 2001) die Quantifizierung der Expression der spezifischen Zielsequenz (Ziel-Gen) relativ zu dem gewählten *Housekeeping-Gen* (*RER1*) bestimmt. Der Expressionsunterschied zwischen zwei Gruppen wird mit der Formel $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ermittelt:

$$\Delta C_T \text{Wert} = C_T \text{Wert Zielgen} - C_T \text{Wert Referenzgen}$$

$$\Delta\Delta C_T \text{Wert} = \Delta C_T \text{Wert Probe} - \Delta C_T - \text{Wert Standard}$$

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

Die Analyse aller qRT-PCR Daten wird mit Hilfe der MxPro Software der Firma Agilent durchgeführt.

3.9.7 Herstellung einer *WT1*-(-/-)-RNA

Für die absolute Quantifizierung von *WT1*- Molekülen während einer qRT-PCR ist eine Standardgerade, basierend auf einer Verdünnungsreihe aus *WT1*-Molekülen mit bekannter *WT1*-Molekülanzahl notwendig. Dazu wird zunächst ein *WT1*-RNA Molekül mit Hilfe des *T7 RiboMAX™ Express Large Scale RNA Production Kits* (Promega) synthetisiert. Zur Synthese eines *WT1*-RNA Moleküls steht der *pipLKN*-Vektor zur Verfügung, in dem die *WT1*-(-/-) cDNA kloniert vorliegt.

Linearisierung von pipLKN-*WT1*-(-/-):

1 µg pipLKN *WT1*- (-/-)
 1 µl *Bgl*II
 2 µl Puffer
 ad 20 µl H₂O

Der Restriktionsverdau wird für 30 min bei 37°C inkubiert, anschließend erfolgt die Aufreinigung mit dem *PCR-Purification Kit* (siehe 3.8.7).

Auffüllreaktion-Reaktion (Blund-End Generierung):

30 µl Aufgereinigtes Produkt
 1 µl Klenow-Fragment
 4 µl NEBuffer 2
 0,5 µl dNTPs
 4,5 µl H₂O
 Σ40 µl

Die Reaktion wird für 15 min bei 25°C inkubiert. Die anschließende Deaktivierung findet bei 75°C für 20 min statt.

Die *sticky*-Enden des Fragments werden durch die 5'-3' Aktivität des Klenow- Fragments aufgefüllt.

WT1-(-/-)-RNA-Synthese mit RiboMAX Large Scale T7 Kit (Promega):

- 30 µl Auffüllreaktion
- 20 µl T7 Transkriptions-Puffer
- 30 µl rNTPs (25 mM ATP, CTP, GTP UTP)
- 10 µl H₂O
- 10 µl Enzym Mix (T7)
- Σ100 µl

Nach der WT1-(-/-)-RNA-Synthese erfolgt die Aufreinigung mittels Phenol-Chloroform Extraktion.

Phenol-Chloroform-Extraktion:

- Zugabe von 1 Volumen Phenol: Chloroform: Isoamyl Alkohol (25:24:1 pH 4,7)
- 1 min vortexen und anschließend 2 min zentrifugieren
- Überstand (wässrige Phase) in ein Reaktionsgefäß überführen
- Zugabe von 1 Volumen Chloroform: Isoamyl Alkohol (24:1)
- 1 min vortexen und 2 min zentrifugieren
- Überstand (wässrige Phase) erneut in ein neues Reaktionsgefäß überführen
- 0,1 Volumen 3M NaAc und 1 Volumen Isopropanol hinzufügen und mischen, danach 5 min auf Eis stehen lassen
- 10 min zentrifugieren, Überstand vorsichtig abnehmen und verwerfen. Das Pellet mit 1 ml 70%-igem Ethanol waschen
- Trocknen lassen und in TE- Puffer aufnehmen

Bestimmung der Konzentration und Reinheit der RNA erfolgt mit Hilfe des NanoDrops. Damit das synthetisierte WT1-(-/-)-RNA-Molekül in einer qRT-PCR verwendet werden kann, wird diese in cDNA umgeschrieben (siehe 3.9.5).

3.9.8 Absolute Quantifizierung anhand der *WT1*-Standardkurve

Zur exakten Bestimmung der *WT1*-RNA Molekülen in einer Probe wird während der qRT-PCR zusätzlich eine *WT1*-Standardgerade mitgeführt. Für die Berechnung der Molekülmenge an *WT1*-RNA wird die folgende Formel (Qiagen) verwendet:

$$Y \frac{\text{Moleküle}}{\mu\text{l}} = \frac{X \frac{\text{g}}{\mu\text{l}} \text{RNA}}{\text{Transkriplänge (nt)} * 340} * 6,022 \times 10^{23}$$

Davon ausgehend, dass in 100 μl Reaktionsansatz 200 ng *WT1*-RNA in die cDNA- Synthese eingesetzt werden, entspricht es einer Konzentration von 2 ng/ μl an *WT1*-RNA. Die Molekülmenge an *WT1* pro μl bei einer bestimmten Konzentration kann anhand der Formel bestimmt werden. Dabei entspricht X der ermittelten RNA- Konzentration und Y steht für die errechnete Molekülmenge pro μl .

$$\frac{2\text{ng} \times 10^{-6}}{1984 * 340} * 6,022 \times 10^{-23} = 1,8 \times 10^{23} \frac{\text{Moleküle}}{\mu\text{l}}$$

Für die *WT1*-Standardgerade werden folgende Molekülmengen an *WT1*- RNA eingesetzt:

<i>WT1</i>- Verdünnungsreihe für eine Standardgerade	
Verdünnung	<i>WT1</i>-RNA-Molekülmenge
1.	5×10^8
2.	1×10^8
3.	2×10^7
4.	4×10^6
5.	8×10^5
6.	$1,6 \times 10^5$

Tab. 3.8: *WT1*-Verdünnungsreihe für die qRT-PCR

3.10 Klonierung

Um die Funktion des *WT1*-Proteins *in vitro* zu untersuchen, wird ein induzierbarer sowie ein konstitutiv exprimierender *WT1*-(-/-)-Vektor hergestellt. Beide Vektoren werden in den immortalisierten Klon 31 der Wilms1-Zelllinie, die nachweislich kein *WT1*-Protein exprimiert, transduziert.

3.10.1 Gateway-Klonierung

Das Gateway-Verfahren der Firma Invitrogen ermöglicht Gene, unabhängig von Restriktionsschnittstellen, schnell und gezielt zu klonieren. Diese Technik bedient sich eines biologischen Rekombinationsprozesses, der im Bakteriophagen λ vorkommt. Die daran beteiligten regulatorischen *att*-Sequenzen (*attachmet*-Bereiche) werden modifiziert und in unterschiedliche Vektoren eingebaut. So entsteht ein Zwei-Vektorsystem, bestehend aus einem *Destination*-Vektor (Zielvektor), welcher *attR1*- und *attR2*- Stellen enthält, und einem *Entry*-Vektor (Eingangsvektor), der die dazu homologen *attL1*- und *attL2*-Bereiche enthält. Das Gen von Interesse wird zunächst in den *Entry*-Vektor kloniert. Als nächstes wird dann mit dem *Destination*-Vektor eine Rekombinationsreaktion durchgeführt. Um eine hohe Effektivität nach der Reaktion zu erreichen, enthält die *attR*-Kassette das *ccdB*-Gen. Das *ccdB*-Gen wird auch als ein Selbstmordgen bezeichnet, dessen Genprodukt toxisch wirkt, indem es die Gyrase hemmt. Infolge einer LR-Rekombination, kommt es zum Austausch des *ccdB*-Gens gegen das Gen von Interesse (GOI). Nach der anschließenden Transformation bilden nur die *E. coli* Zellen Kolonien, die einen *Destination*-Vektor mit dem Gen von Interesse (GOI) aufgenommen haben. Alle LR-Rekombinationen, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt werden, laufen streng nach den Angaben des Herstellers ab.

3.10.2 Herstellung eines induzierbaren *WT1(-/-)*-Vektors

Als Ausgangvektor steht der Doxycyclin induzierbare *TREAuto-V14* Vektor zur Verfügung. Dieser setzt sich aus der regulatorischen Einheit *Tc-responsive element* (TRE) zusammen, welche *tetO* (*tet Operator*) Bindungsstellen enthält, gefolgt von der kodierenden Sequenz für das *GFP*- Gen, welches über ein IRES Element mit der modifizierten Form des Repressor-Proteins des *tet* Operons (rtTA) verbunden ist (Centlivre et al., 2010).

Zunächst wird die kodierende Sequenz für das *GFP*- Gen entfernt.

Restriktionsverdau: 4 μ g TREAuto-V14
 2 μ l Puffer (Fast Digestion-Buffer)
 1 μ l *EcoRI*
 ad 20 μ l H₂O

Die Reaktion wird für 20 min bei 37°C inkubiert. Zur Deaktivierung von *EcoRI* (*Star-Activity*) wird der Ansatz für 5 min bei 80°C inkubiert. Um eine Religation des Vektors zu vermeiden,

wird 1 µl alkalische Phosphatase hinzugegeben und für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend werden noch mal 1,5 µl alkalische Phosphatase hinzugegeben und für weitere 30 min bei 50°C inkubiert. Die Deaktivierung der alkalischen Phosphatase erfolgt für 5 min bei 70°C. Der Restriktionsverdau wird auf ein 0,8% *Low Melt* Agarosegel aufgetragen. Zwei Fragmente der Größe 8557 Bp und 908 Bp entstehen nach dem Restriktionsverdau, das 8557Bp große wird aus dem Gel herausgeschnitten und aufgereinigt (siehe 3.8.10).

Die kodierende Sequenz für das *WT1(-/-)*-Gen liegt in dem *pCRII®-TOPO-TA*-Vektor vor und beinhaltet eine optimale *Kozak*-Sequenz, die über spezifische Primer mittels PCR davor geschaltet wird.

Restriktionsverdau: 4 µg pCRII®-TOPO-TA-CMV-*WT1(-/-)*
 2 µl Puffer (Fast Digest Buffer)
 1 µl *EcoRI*
 ad 20 µl H₂O

Der Restriktionsverdau wird bei 37°C für 20 min inkubiert und danach für 5 min bei 80°C deaktiviert. Der Ansatz wird auf ein 0,8% *Low Melt* Agarosegel aufgetragen. Nach dem erneuten Restriktionsverdau entstehen zwei Fragmente der Größe 5413 Bp und 1307 Bp und das 1307 Bp große wird aus dem Gel herausgeschnitten und aufgereinigt (siehe 3.8.10).

Ligation des *WT1(-/-)*-Fragments in den TRE-Auto-V14 Vektor

Für die Berechnung der einzusetzenden Fragmentmenge wird die folgende Formel verwendet:

$$\text{Masse Fragment (ng)} = \frac{[25\text{ng Vektor} \times \text{LängeFragment (Bp)}]}{\text{Länge Vektor (Bp)}}$$

Für den Ligationsansatz ist das Verhältnis Vektor zu Fragment 1:3 gewählt worden und als Standardmenge für den Vektor 25 ng eingesetzt.

$$\frac{75\text{ ng Vektor} \times 1307\text{Bp}}{8557\text{ Bp}} = 11,5\text{ ng Fragment}$$

Ligationsansatz: 11,5 ng Fragment *WT1(-/-)*
 75 ng Vektor TREAuto-V14
 2 µl T4- Ligase-Puffer

1 µl T4- DNA-Ligase

ad 20 µl

Die Ligation wird bei 4°C und ÜN durchgeführt, anschließend werden 2 µl vom Ligationsansatz in die Sure2-Zellen transformiert. Nach der Transformation werden 100-200 µl auf Ampicillin Platten ausgestrichen und bei 37°C ÜN im Brutschrank inkubiert. Anschließend werden mehrere Kolonien (5-6 Kolonien) in 5 ml LB-Medium angeimpft (mit Ampicillin 100 µg/ml) und für 6 bis 8 h bei 37°C und 220 rpm geschüttelt. Daraufhin wird die Plasmid-DNA isoliert (siehe 3.2.3). Zur Kontrolle der Ligation wird die Plasmid DNA mit dem Enzym *XhoI* geschnitten.

Restriktionsansatz: 200 µg Plasmid-DNA
 1 µl Puffer (*Fast Digestion Buffer*)
 1 µl *XhoI*
 ad 10 µl H₂O

Der Restriktionsansatz wird bei 37°C für 15 min inkubiert. Bei einer erfolgreichen Ligation entstehen nach dem Restriktionsverdau zwei Fragmente von der Größe 2326 Bp und 7546 Bp.

Umklonierung der regulatorischen *WT1*-(-/-)-Kassette

Ziel ist es, die Doxycyclin induzierbare *WT1*-(-/-)-Einheit über die *Gateway*-Klonierung (In-vitrogen) in den Puromycin selektionierbaren *pLenti X1 Puro Dest* Vektor einzubringen. Dazu wird zunächst die regulatorische *WT1*-(-/-)-Kassette in den Übergangsvektor pENTR4 kloniert. Diese Prozedur erfolgt in mehreren Zwischenschritten.

Restriktionsansatz: 6 µg TRE-Auto-*WT1*-(-/-) V14
 2 µl *Fast Digestion-Buffer*
 2 µl *SpeI*
 Ad 20 µl

Inkubation der Reaktion für 3 h bei 37°C, anschließend wird das TRE-Auto-*WT1*-(-/-) mit dem *PCR Purification Kit* (Qiagen) aufgereinigt und in 40 µl eluiert (siehe 3.8.7).

Blunt-End-Reaktion: 40 µl Eluat
 5 µl T4-DNA-Polymerase-Puffer
 0,6 µl T4-DNA-Polymerase
 4 µl H₂O
 Σ50 µl Ansatz

Die Auffüllreaktion der *Sticky*-Enden erfolgt bei 37°C für 30 min. Anschließend wird die Reaktion bei 75°C für 10 min deaktiviert.

Restriktionsansatz: 50 µl (Blut-End-Reaktion)
 6 µl *Fast Digestion-Buffer*
 2 µl *NotI*
 2 µl H₂O
 Σ60 µl Ansatz

- Inkubation des Restriktionsansatzes bei 37°C für 3 h
- Der gesamte Restriktionsansatz wird auf ein 0,8%-iges *Low Melt* Agarosegel aufgetragen
- Das 4196 Bp große Fragment wird aus dem Gel geschnitten und in 40 µl eluiert

Das hergestellte regulatorische *WT1* (-/-)-Fragment enthält am 5`-Ende ein *Sticky*- und am 3`-Ende ein Blunt-Ende. Durch den Restriktionsverdau des *pENTR4*-Vektors durch *EcoRV* (*blunt-end*) und *NotI* (*sticky-end*) werden kompatible Enden erzeugt.

Reaktionsansatz: 6 µg *pENTR4*-Vektor
 2 µl *NotI*
 2 µl *EcoRV*
 2 µl *Fast Digestion-Buffer*
 ad 20 µl H₂O

- Der Restriktionsansatz wird für 3 h bei 37°C inkubiert
- Der gesamte Ansatz wird auf ein 0,8%-iges *Low-Melt* Agarosegel aufgetragen
- Der Vektor wird ausgeschnitten und mittels QIAquick Gel Extraktion Kit (siehe 3.8.10) in 40 µl eluiert

Ligationsansatz
 (Verhältnis 2:1): 3 µl *pENTR4*-Vektor
 1 µl TRE-AutoV14-Kozak-*WT1*(-/-) (Insert)
 1 µl T4-DNA-Ligase-Puffer
 1 µl T4-DNA-Ligase-Puffer
 4 µl H₂O
 Σ10 µl Ansatz

- Ligation erfolgt bei 4°C ÜN
- 2 und 4 µl des Ligationsansatzes werden in DH5α-Zellen transformiert und 100 µl des Transformationsansatzes werden auf Agarplatten mit Ampicillin (100 µg/ml) ausgestrichen und ÜN bei 37°C inkubiert
- Kolonien werden in 5 ml LB-Medium mit Ampicillin (100 µg/ml) angeimpft und für 6 - 8 h bei 220 rpm und 37°C geschüttelt
- Isolierung der Plasmid-DNA

Die isolierte DNA wird mit den beiden Restriktionsenzymen *XhoI* und *PstI* geschnitten. Bei einer erfolgreichen Ligation entstehen zwei Fragmente der Größe 2427 Bp und 4457 Bp. Dabei schneidet *XhoI* nur im Insert und *PstI* nur im *pENTR4*-Vektor. Anschließend erfolgt mit Hilfe der *Clonase*-Reaktion die Herstellung eines lentiviralen Vektors, der die regulatorische *WT1*(-/-)-Kassette enthält.

Clonase-Reaktion: 150 ng *pENTR4-TRE-AutoV14-WT1*(-/-)
 150 ng *pLenti-X1-Destination*
 2 µl LR *Clonase*
 ad 10 µl TE Puffer

- Die Clonase-Reaktion wird für 1 h bei 25°C inkubiert
- Zugabe von 1µl Proteinase K und Inkubation für 10 min bei 37°C
- 1 µl/ 2 µl der Clonasereaktion werden in 50 µl Sure2-Zellen transformiert
- 100 µl Transformationsansatz werden auf Amp-Agarplatten ausgestrichen und bei 37°C ÜN inkubiert
- Kolonien werden in 5 ml LB-Medium angeimpft und für 6 - 8 h bei 220 rpm und 37°C geschüttelt
- Isolierung der Plasmid-DNA

Die Kontrolle der Reaktion erfolgt über den Restriktionsverdau mit *Clal* und *SpeI*, dabei entstehen zwei Fragmente von der Größe 4112 Bp und 7925 Bp.

3.10.3 Herstellung eines konstitutiv exprimierenden *WT1*(-/-)-Vektors

Für die Produktion eines permanent exprimierenden *WT1*(-/-)-Vektors wird der gleiche Ausgangsvektor verwendet wie schon in 3.3.2 beschrieben wird.

Restriktionsansatz: 3 µg pCDNA3.3 –TOPO-TA-WT1(-/-)/ *pENTR4*
2 µl Fast Digestion Buffer
1 µl *EcoRI*
ad 10 µl H₂O

Der Restriktionsansatz wird für 20 min bei 37°C inkubiert. Der linearisierte *pENTR4* wird dephosphoryliert und zusammen mit dem *WT1(-/-)*-Fragment über Gelelektion aufgereinigt.

Ligationsansatz: 3 µl *pENTR4*
1 µl *WT1(-/-)*
1 µl T4-Ligase-Puffer
1 µl T4-DNA-Ligase
4 µl H₂O
Σ 10 µl Ansatz

Die Ligation findet bei 4°C ÜN statt. Für die anschließende Transformation in die *One Shot Top10*-Zellen werden 4 µl des Ligationsansatzes verwendet. Die Kontrolle der Ligation wird mit Hilfe des Restriktionsenzym *XhoI* vorgenommen. Ist das *WT1*-Kozak(-/-)-Fragment im *pENTR4*-Vektor enthalten, entstehen drei Banden mit der Größe von 898 Bp und 2709 Bp. Diese Bandengröße entsteht nur bei der richtigen Orientierung des *WT1(-/-)* Fragments. Um eine konstitutive Expression zu gewährleisten, wird für die anschließende Clonase-Reaktion der *pLenti-CMV-Destination*-Vektor verwendet. Die darauffolgende Clonase-Reaktion wird entsprechend nach den Angaben des Herstellers durchgeführt (siehe 3.10.1). Die Kontrolle des fertigen lentiviralen *WT1(-/-)* *Expressions*-Vektors erfolgt über den Restriktionsverdau mit *XhoI*. Ein Bandenmuster von drei Fragmenten mit der Größe von 898 Bp, 1856 Bp und 6596 Bp bestätigt den Erfolg der Clonase-Reaktion.

3.11 Microarray (Genexpressionsanalysen)

Im Rahmen dieser Arbeit werden Genexpressionsprofile von etablierten Wilms-Tumor-Zelllinien, derer immortalisierte Klone sowie zahlreiche Transfektionsexperimente mit *WT1*- exprimierenden Zellen erstellt. Für die Analyse wird das *4x 44K Whole Human Genome Microarray v1* und *4x 44K Human GE 4x 44K v2 Microarray* Format der Firma Agilent verwendet. Auf diesen Arrays sind 44.000 synthetisch hergestellte Oligonukleotide gespottet, die das gesamte Expressionsprofil des humanen Transkriptoms repräsentieren. Nach der

Isolierung der Gesamt-RNA (siehe 3.9.1) wird diese zunächst mittels Agilent 2100 Bioanalyzer auf ihre Qualität überprüft und nur die RNA-Proben verwendet, die einen RIN-Wert von 8 nicht unterschreiten (siehe 3.9.3). Die RNAs werden anschließend nach Angaben des Herstellers für den Microarray aufgearbeitet.

Ansetzen der Spike-In Kontrollen:

Alle untersuchten Proben werden nach der Einfarben-Methode (*One-Color-Expression Array*) markiert. Die zu analysierenden Proben werden mit einer *One-Color Spike-In* Kontrolle der Firma Agilent versetzt. Diese bestehen aus zwei positiven Kontrollgruppen, die mit einer minimalen Selbst- und Kreuzhybridisierung an die komplementären Oligonukleotide auf dem Array binden. Durch definierte RNA-Kontrollgruppen mit bekannter Konzentration wird es nach dem Abschluss des Microarray-Versuchs ermöglicht, Rückschlüsse auf die Effizienz der cDNA-Synthese sowie der cRNA-Synthese und den damit verbundenen Einbau des Fluoreszenzfarbstoffes zu nehmen. Dies geschieht im Anschluss an die Hybridisierung mit Hilfe der Feature Extraction Software, indem ein Qualitätsreport anhand der *Spike-In* Kontrollen generiert wird. Bevor die Spike-In Kontrolle zu jeder Probe hinzugegeben wird, muss diese 1:5000 verdünnt werden.

Vorbereiten von One-Color *Spike-In* Mix:

- Stocklösung von *One-Color Spike-In* Mix vortexen
- Erhitzen für 5 min bei 37°C und anschließend wieder vortexen

In mehreren Schritten wird eine 1:5000 Verdünnung vom Spike-In Mix hergestellt.

Erste Verdünnung (1:20):	38 µl Verdünnungspuffer + 2 µl Spike-In Mix
Zweite Verdünnung (1:25):	48 µl Verdünnungspuffer + 2 µl der ersten Verdünnung
Dritte Verdünnung (1:10):	36 µl Verdünnungspuffer + 4 µl der zweiten Verdünnung

Für den 4x 44K (One Color-Microarray) wird von jeder zu analysierenden Probe 500 ng RNA mit jeweils 5 µl der dritten *Spike-In* Verdünnung versetzt.

Vorbereitung der cDNA-Synthese:

500 ng RNA
1,2 µl T7 Promotor-Primer
5 µl Spike-In Mix
ad 11,5 µl H₂O (DEPC)

- 10 min bei 65°C inkubieren und anschließend auf Eis stellen

Reaktionsansatz der cDNA-Synthese:

- 5x First Strand Puffer bei 80°C für 3 bis 4 min erhitzen

4 µl 5x First Strand Buffer
2 µl 0,1 M DTT
1 µl 10 mM dNTP Mix
1 µl M-MLV-RT
0,5 µl RNaseOUT
Σ8,5 µl

Zu jeder Probe wird der Reaktionsansatz von 8,5 µl hinzugegeben und für 2 h bei 40°C inkubiert. Die Reaktion wird durch die Inkubation bei 65°C für 15 min gestoppt, anschließend werden die Proben auf Eis gestellt.

Transkriptions Master Mix (cRNA-Synthese)

- Die 50% PEG Lösung für 1 min bei 40°C aufwärmen und bis zum Gebrauch bei RT lagern

15,3 µl H₂O (DEPC)
20 µl 4x Transkriptionspuffer
6 µl 0,1 M DTT
8 µl NTP Mix
6,4 µl 50% PEG
0,5 µl RNaseOUT
0,6 µl Anorganische Pyrophosphatase

0,8 µl T7 RNA-Polymerase

2,4 µl Cyanine 3-CTP

Σ60 µl

Zugabe der 60 µl des Transkriptionsansatzes zu der Probe und Inkubation für 2 h bei 40°C.

- Nach der cRNA-Synthese wird die markierte cRNA mit dem RNeasy Mini Kit (50) von Qiagen nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

Quantifizierung der cRNA:

Für die Quantifizierung der markierten cRNA werden 2µl davon auf einem Spektrophotometer (NanoDrop) gemessen.

$$\text{Ausbeute der cRNA} = \frac{\text{cRNA Konzentration} \times \text{Elutionsvolumen}}{1000} = \mu\text{g cRNA}$$

$$\begin{aligned} \text{Spezifische Aktivität} &= \frac{\text{Farbstoffkonzentration}}{\text{cRNA - Konzentration}} \times 1000 \\ &= \text{pmol Farbstoff pro } \mu\text{g cRNA} \end{aligned}$$

Spezifische Aktivität: Farbstoffkonzentration/cRNA-Konzentration x 1000=
pmol Farbstoff pro µg cRNA

Die cRNA Ausbeute soll > 1,65 µg betragen

Die spezifische Aktivität soll > 9 pmol/µg betragen

Hybridisierung der cRNA

1,65 µg Cyanine 3-markierte cRNA

11 µl 10x Blocking Agent

2,2 µl 25x Fragmentierungspuffer

ad 55 µl H₂O (DEPC)

- Bei 60°C für 30 min inkubieren
- Zugabe von 55 µl des 2x GE Hybridisierungs-Puffers
- Gut mischen und auf Eis stellen
- 100 µl des Hybridisierungsansatzes auf eine Microarray-Dichtungsplatte geben

- Zusammenbau der Hybridisierungskammer
- Für mind. 17 h bei 65°C und 10 rpm im Hybridisierungssofen inkubieren

Waschen der Microarrays

- Die Hybridisierungskammer öffnen und den Array entnehmen
- Im Waschpuffer 1 wird der aktive Array vom *gasket slide* entfernt, auf ein Objektträgerhalter gesetzt und in die Küvette mit Puffer 1 überführt
- Für 5 min wird der Array bei RT im Waschpuffer 1 gewaschen
- Der Objektträgerhalter wird vorsichtig in den auf 37°C vorgewärmten Waschpuffer 2 überführt und für 1 min gewaschen
- Inkubation des Arrays in Acetonitril für 10 s bei RT
- Halter für 30 s bei RT in die Stab-Dry-Lsg. inkubieren
- Um Tropfenbildung auf dem Array zu vermeiden, wird der Objektträgerhalter langsam mit einer leicht angewinkelten Haltung aus der Stab-Dry-Lösung gezogen
- Der Array wird mit seiner aktiven Seite in den *slide holder* gesetzt und zeitnah gescannt
- Alle Gegenstände, die mit der Stab-Dry-Lösung in Berührung gekommen sind, werden mit Acetonitril gesäubert
- Die restlichen Komponenten werden mit Millipore Wasser gespült und luftgetrocknet

Scanner-Einstellungen

Parameter	4x 44K Microarray-Format
Scan-Region	Scan Area (61x 21,6 mm)
Scan-Resolution (µm)	5
5 µm Scanning Mode	Single Pass
Extended Dynamic Range	Selected
Dye Channel	Green
Green PMT	XDR Hi 100 % XDR Lo 10%

Tab. 3.9: Einstellungen des Agilent Array Laser Scanners G2505B

Auswertung der erhobenen Genexpressionsdaten:

Die nach dem Scanvorgang generierten Rohdaten werden mittels der *Feature Extraction*-Software Version 8.5 von Agilent extrahiert. Ein *FE-Design* File und ein FE-Protokoll werden im Anschluss erzeugt, anhand dieser können die Sequenzinformationen mit den jeweiligen Oligonukleotiden, sowie den Cyanin-3-Intensitäten kombiniert werden. Im gleichen Arbeitsprozess kommt es zur Erfassung und Auswertung der *Spike-In* Qualitätskontrollen. Besteht ein linearer Zusammenhang zwischen beobachteter und erwarteter *Spike-In LogRation* und fällt die Standardabweichung (SD) gering aus, spiegelt dies einen exakten experimentellen Versuchsablauf wieder. Für die statistische Auswertung der extrahierten Textdateien wird das Statistikprogramm R (R-Project for Statistical Computing: www.r-project.org) verwendet und die dabei gewonnenen Daten einer Hintergrundabgleichung unterzogen. Die einzelnen Oligonukleotide werden dabei nach folgenden Merkmalen ausgewertet:

- Die Spike-In sowie alle anderen Kontrollen werden entfernt
- Identische Oligonukleotide werden zu einer mittleren Intensität zusammengefasst. Die Berechnung der mittleren Intensität der biologischen und technischen Wiederholungen wird mit der Formel: $2^{\text{Mittelwert}(\log_2(\text{Intensitäten}))}$ ermittelt
- Erreicht die mittlere Intensität eines Gens nicht den Schwellenwert von 100, wird dieses aus weiterführenden Auswertungen ausgeschlossen

Die weiterführende Analyse der gefilterten Daten erfolgte über LIMMA 2.18.3 (*Linear Models for Microarrays*). Für die Normalisierung der Datensätze wird die Quantile-Methode verwendet. Diese ermöglicht es, die Verteilung der mittleren Intensitäten (A-Werte) unter Berücksichtigung der logRatios (M-Werte) anzugleichen. Die Berechnung der Varianz wird über die T- und F- Statistiken mittels des empirischen Bayes-Ansatzes bestimmt. Der adjustierte p-Wert wird nach der Korrektur der Daten für multiples Testen (Benjamin & Hochberg) berechnet. Um die erhobenen Daten nach gleichen Kriterien zu untersuchen, wird der p-Wert auf 0,05 und der Expressionsunterschied (Foldchange) auf 1,5 festgesetzt. Diese bioinformatische Auswertung der Expressionsdaten wird von Herrn Dipl. Ing. Manfred Beier am Institut für Humangenetik anhand der zuvor erwähnten Methoden durchgeführt. Weiterführende Auswertungen erfolgt mit Hilfe folgender Programme bzw. Datenbanken:

- *DAVID*-Datenbank (*Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery*): Teilt die differentiell exprimierte Gene in unterschiedliche verwandte funktionelle sowie biologische Themengruppen ein. Es werden Cluster- und KEGG Signalweganalysen durchgeführt (www.DAVID.abcc.ncifcrf.gov)

- TATAR (*The Array Table Retriever*): Stellt unter anderem grafische *heat-maps*, *cluster-trees* und *barplots* dar
- MetaCore/GeneGo: Ist eine kommerziell online basierende Plattform, die nach signifikant regulierten Signalwegen (*Pathways*) sucht (www.portal.genego.com)

3.12 Array-CGH/SNP

Die Array basierende komparative genomische Hybridisierung (aCGH), die erstmals 1997 von Solinas-Toldo beschrieben wird (Salinos-Toldo et al., 1997), ist eine Microarray-basierende Methode, die zum Nachweis von chromosomalen Imbalancen verwendet wird. Dabei wird das gesamte Genom mit einer hohen Auflösung (ca. 35 kb) nach Deletionen (Verlusten) und Duplikationen (Zugewinn) an genetischem Material untersucht. Durch den Einsatz von 60-mer langen Oligonukleotiden, die auf einem Glasobjektträger aufgebracht sind, wird repräsentativ das ganze Genom abdeckt. Wie hoch die mittlere Auflösung eines Arrays ist, hängt von dem verwendeten Array-Typ ab bzw. welchen Abstand die gespotteten Oligos auf dem Genom repräsentieren. Die zum Genom komplementären Sequenzen der Oligonukleotide ermöglichen es, die untersuchte Patienten-DNA und die entsprechende Kontroll-DNA gleichzeitig kompetitiv zu hybridisieren. Kommt es auf Grund von Mengenunterschieden zu einer ungleichen Hybridisierung der gespotteten Oligos, kann dies durch spezielle Softwareprogramme identifiziert werden und Auskunft geben, welche genomischen Abschnitte betroffen sind. Bei der Kombination aus CGH- und SNP-Technik kommt es zum kombinierten Einsatz sogenannter "SNP-Marker", die aus polymorphen Oligonukleotiden und den üblichen nicht polymorphen Oligonukleotiden bestehen. Dadurch können neben genomischen Kopienzahlveränderungen auch kopienzahlneutrale Veränderungen, wie *Loss of heterozygosity* (LOH) und *uniparentale Disomie* (UPD) ermittelt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wird das 2x 400K Oligonukleotid Microarray Format der Firma Agilent verwendet (Sure Print G3 Human Genom CGH + SNP Microarray; Agilent Technologies Alto, CA, USA). Analysiert wird die genomische DNA des Patienten Wilms10, die direkt aus dem Tumor und einer Metastase stammt. Des Weiteren wird auch die DNA, die aus der etablierten Zellkultur des Tumors und der Metastase isoliert wurde analysiert. Alle Proben werden nach dem Protokoll der Firma Agilent (Version 7.3, März 2014) aufgearbeitet und vorbereitet. Für die spätere Analyse muss immer eine Referenz-DNA mitgeführt werden, die genauso behandelt wird, wie die zu untersuchenden Proben. Als Referenz steht die DNA einer weiblichen Europäerin (NA12878) zur Verfügung, die vom Coriell Institut, USA bezogen wird.

Der erste Arbeitsschritt sieht einen Restriktionsverdau aller Proben vor. Dabei werden 1500 ng DNA mit Nuklease-freiem Wasser auf 20,2 μl aufgefüllt. Das Endvolumen von 20,2 μl darf nicht überschritten werden. Ist dies doch der Fall, kann alternativ die DNA durch Fällung aufkonzentriert werden (siehe 3.8.2).

Reagenzien	1x Reaktion in μl	2x400K (5x) in μl Mastermix
Nuklease freies H ₂ O	2	10
10x Puffer C	2,6	13
Acetyliertes BSA (10mg/ μl)	0,2	1
Alu I (10 U/ μl)	0,5	2,5
Rsa I (10 U/ μl)	0,5	2,5
Gesamtvolumen	5,8	

Tab. 3.10: Ansatz für den Restriktionsverdau eines aCGH/SNP- Arrays

- Die Reagenzien werden gut gemischt, kurz zentrifugiert und dann auf Eis gelagert
- Pro Probe werden 5,8 μl des Restriktionsansatzes hinzugegeben und gut gemischt
- Inkubation für 2 h bei 37°C und 40 rpm
- Zur Inaktivierung der Enzyme erfolgt eine Inkubation bei 65°C für 20 min
- Nach diesem Schritt können die Proben bei -20°C gelagert werden.

Zur Kontrolle der Restriktion werden 2 μl jeder Probe mit 7 μl H₂O und 1 μl (10x) Ladepuffer auf ein 0,8% Agarosegel aufgetragen. Die Größe der Fragmente sollte zwischen 200 Bp und 500 Bp liegen.

Markierung der Proben:

Zu jeder Probe werden 5 μl Random-Primer hinzugegeben, für 3 min bei 98°C inkubiert und anschließend für 5 min auf Eis gestellt. Währenddessen wird die Markierungsreaktion vorbereitet. Zu beachten ist, dass die Referenz-DNA immer mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff als die Patienten-DNA markiert wird. In der Regel wird die Patienten/Tumor-Probe mit Cyanin 3-dUTP (rot) und die Referenz Probe mit Cyanin 5-dUTP (blau) markiert. Die Zugabe von 2 μl H₂O in die Markierungsreaktion hat nur eine Relevanz, wenn zuvor 2 μl für die Kontrolle der durchgeführten Restriktion entnommen werden. Es folgt die Zugabe von jeweils 21 μl des Cyanin-3-dUTP Ansatzes zur Patienten-DNA und des Cyanin-5-dUTP Ansatzes zur Referenz-DNA. Das Endvolumen der einzelnen Reaktionen beträgt 50 μl . Diese

werden vorsichtig gemischt. Die anschließende Inkubation der Proben für 2 h bei 37°C führt zum Einbau der markierten UTPs in die DNA. Die Deaktivierung der enzymatischen Reaktion findet durch Inkubation bei 65°C für 10 min statt. Bis zur Aufreinigung der Proben lagern diese auf Eis.

Reagenzien	1x Reaktion in μl	Patient (3x) in μl	Kontrolle (3x) in μl
Nuklease freies H_2O	2*	6	6
5x Reaktionspuffer	10	30	30
10x dNTPs	5	15	15
Cyanine 3- dUTP	3	9	
Cyanine 5- dUTP			9
Exo (-) Klenow	1	3	3
Gesamtvolumen	19 oder 21		

Tab. 3.11: Zusammensetzung der Markierungsreaktion

Aufreinigung der markierten Proben

- Proben 1 min bei 6000 rpm zentrifugieren
- Zugabe von 430 μl 1x TE (pH 8.0) zu jeder Reaktion, gut mischen und auf eine Säule auftragen
- Säule im entsprechenden 1,5 ml Reaktionsgefäß für 10 min bei 14000 rpm zentrifugieren
- Der Durchfluss wird verworfen und 480 μl 1x TE werden auf jede Säule gegeben
- Erneute Zentrifugation bei 14000 rpm für 10 min
- Durchfluss verwerfen und die Säule invertiert in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß setzen
- 1 min bei 1750 rpm zentrifugieren und die Säule verwerfen
- Eluat für 5 min auf Eis lagern und 10 mal auf- und abpipettieren

Das Eluatvolumen sollte 41 μl betragen. Bei einem niedrigeren Volumen wird mit TE auf die entsprechende Menge aufgefüllt. Ist das Probenvolumen höher, wird dieses auf 41 μl mit einer Vakuumzentrifuge reduziert. Anschließend wird mittels NanoDrop die DNA Konzentration und spezifische Aktivität bestimmt. Dabei werden 1,5 μl TE als Leerprobe eingesetzt und jeweils 1,5 μl jeder Probe an dem NanoDrop gemessen. Die Bestimmung der DNA-

Menge und die spezifischen Aktivität der markierten DNA erfolgen nach den zwei folgenden Formeln.

$$DNA - Ausbeute(\mu g) = \frac{DNA - Konzentration \left(\frac{ng}{\mu l}\right) \times Probenvolumen(\mu l)}{1000 \left(\frac{ng}{\mu g}\right)}$$

$$Spezifische \text{ Aktivität} \left(\frac{pmol}{\mu g}\right) = \frac{pmol \text{ pro } \mu l \text{ dye}}{\mu g \text{ pro } \mu l \text{ gDNA}}$$

Hybridisierung der Proben:

Bei einer eingesetzten Ausgangsmenge von 1500ng DNA liegt bei einer erfolgreichen Markierung der DNA die spezifische Aktivität für Cyanin-3 in einem Bereich zwischen 25 bis 40 pmol/μg. Für Cyanin-5 sollte dieser Werte zwischen 20 und 36 pmol/μg liegen. Die DNA-Ausbeute sollte dabei zwischen 9 bis 12 μg betragen. Wenn alle Parameter erfüllt sind, werden jeweils 39,5 μl der markierten Patienten/Tumor-DNA (Cy-3) mit 39,5 μl der markierten Referenz-DNA (Cy-5) zusammengeführt (Patient- + Referenz-DNA = 79μl). Um zu vermeiden, dass die DNA-Proben unspezifisch auf dem Array binden, werden diese zuvor mit Cot-1-DNA, Agilent-Blocking-Reagenz und Hybridisierungspuffer versetzt (siehe Tab.3.12.). Dies führt dazu, dass die repetitiven Sondenanteile geblockt werden.

Bevor das lyophilisierte 10x Blocking- Reagenz erstmals verwendet wird, muss es in 1.350 μl Nuklease-freiem H₂O aufgenommen und 1h bei RT gelöst werden. Anschließend wird es gevortext und bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert.

Reagenzien	Volumen a Reaktion	Volumen (μl) pro 2x 400K (3x)
Cy3-und Cy5-markierter DNA Mix	79	
Cot-1 DNA (1.0 mg/ml)	25	75
10x aCGH Blocking Agent	26	78
2x Hi-RPM Hybridisierungs-Puffer	130	390
Gesamtvolumen	260	Davon 181 je Reaktion einsetzen

Tab.3.12.: Hybridisierungsmix für CGH/SNP-Array

Durchführung:

- Proben werden 3 min bei 95°C denaturiert und anschließend für 30 min bei 37°C inkubiert

- 1 min bei RT und 7.700 rpm zentrifugieren
- Es werden 245 µl eines Ansatzes auf ein *gasket slide* Feld eines 2x 400k Arrays pipettiert, Array mit der aktiven Seite luftblasenfrei auflegen, die Hybridisierungskammer mit einer Stahlzwinge schließen
- Array im Hybridisierungssofen für 40 h bei 67°C und 20 rpm inkubieren

Waschprozedur:

Für das Waschen der Arrays werden zwei unterschiedliche Puffer (Wasch-Puffer 1 & 2), die unterschiedlich temperiert sind, benötigt. Daher wird der Wasch-Puffer 2 zuvor ÜN bei 37°C im Wärmeschrank vortemperiert. Da die für die Markierung verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe bei Ozonwerten, die über 10 ppb liegen, empfindlich reagieren und degradieren können, werden die Arrays zusätzlich mit einer Stabilisierungs- und Trocknungslösung (Stab-Dry-Lsg.) behandelt. Vor der Verwendung der Stabilisierungs- und Trocknungslösung wird diese ÜN bei 37°C und 200 rpm geschüttelt, um eventuell die ausgeflockten Bestandteile wieder in Lösung zu bringen. Alle Waschschrte werden aufgrund der gesundheitsschädlichen Eigenschaft von Acetonitril und der Stab-Dry-Lsg. unter dem Abzug durchgeführt.

Waschschritte: Alle Lösungen befinden sich in den vorgesehenen Küvetten

- Die Hybridisierungskammer öffnen und den Array entnehmen
- Im Waschpuffer 1 wird der aktive Array vom *gasket slide* entfernt, auf einen Objektträgerhalter gesetzt und in die Küvette mit Puffer 1 überführt
- Für 5 min wird der Array bei RT im Waschpuffer 1 gewaschen
- Der Objektträgerhalter samt der Array-Slides wird vorsichtig in den auf 37°C vorgewärmten Waschpuffer 2 überführt und für 1 min gewaschen
- Inkubation des Arrays in Acetonitril für 10 s bei RT
- Halter für 30 s bei RT in der Stab-Dry-Lsg. inkubiert
- Um Tropfenbildung auf dem Array zu vermeiden, wird der Objektträgerhalter langsam mit einer leicht angewinkelten Haltung aus der Stab-Dry-Lsg. gezogen
- Der Array wird mit seiner aktiven Seite in den *slide holder* gesetzt und relativ zeitnah gescannt
- Alle Gegenstände, die mit der Stab-Dry-Lösung in Berührung gekommen sind, werden mit Acetonitril gesäubert
- Die restlichen Bestandteile werden mit Millipore Wasser gespült und luftgetrocknet

Mit dem Microarray Scanner der Firma Agilent werden die Arrays gescannt. Für die Einstellungen der verschiedenen Scanparameter wird die *Scan Control Software* der selbigen Firma verwendet. Nach Initiation des Programms muss das *Profile AgilentHD_CGH* ausgewählt und folgende Parameter überprüft werden:

Parameter	HD Microarray Format
Farb-Kanal	R + G(rot und grün)
Scan-Region	61 x 21,6 mm
Scan-Auflösung	5 μm
Tif-Datei	16 bit
Rot PMT-Gewinn	100 %
Grün PMT-Gewinn	100 %
XDR	<Kein XRD>

Tab.3.13: Scanner-Einstellungen des Agilent Array Laser Scanners G2505B für aCHG.

Stimmen alle Einstellungen, wird die Arrayposition angegeben und gescannt. Nach Abschluss des Scanvorgangs wird ein Tif-Bild generiert. Um die Informationen aus diesem Bild zu extrahieren, wird die *Feature Extraction* Software für CytoGenomics (Version 1.5.1.0) verwendet. In diese wird die zuvor erstellte Tif- Datei eingeladen und das dafür nötige Extraktionsprotokoll muss eingestellt werden. Dafür wird das aktuellste Array-Protokoll (hier CGH_107_Sep09) sowie *grid-template* Datei eingestellt. Nach der Extraktion der Daten aus dem Tif-Bild werden Text-Dateien erzeugt, die mit Hilfe der *CytoGenomics* Software (Version 2.0.6.0) visuell dargestellt und ausgewertet werden.

3.12.1 Custom-Array

Um eine bessere Auflösung der zuvor identifizierten heterozygoten bzw. homozygoten Deletion von *WT1* auf Chromosom 11p bei Patient Wilms10 zu erhalten, wird mit Hilfe der Internetplattform eArray von Agilent ein spezifischer Array designt. Als erstes wird das gewünschte Arrayformat ausgewählt und die entsprechenden Probengruppen erstellt. Die Probengruppen definieren die Bereiche auf dem Genom, die mit einer höheren Auflösung bzw. mit einer größeren Anzahl an Oligonukleotiden abgedeckt werden sollen. Es müssen

auch Kontrollgruppen hinzugefügt werden. Diese beinhalten Normalisierungsoligonukleotide und Replikatoligonukleotide. Damit das restliche Genom gleichmäßig abgedeckt wird, wird der Array mit Katalogoligonukleotiden aufgefüllt.

Im Rahmen dieser Arbeit wird das *HD-Human Genom CGH Microarray 4x 44k* Format verwendet. Abzüglich der Agilent Kontrollproben stehen bei diesem Format 43.120 Oligonukleotide zur Verfügung.

Probengruppe 1: Abstand der Oligonukleotide alle 300 Bp (hochauflösend):

Bereich auf dem Chromosom 3

Chr.3: 66848373 - 66430881

Bereich der homozygoten Deletion

Chr.11: 32635709 - 32247887

Probengruppe 2: Abstand der Oligonukleotide alle 1000 Bp (1kb)

Bereich der heterozygoten Deletion

Chr.11: 32247886 - 32063150

Chr.11: 33565685 - 32635710

Für die Abdeckung der zu analysierenden Bereiche werden 3800 Oligonukleotide verwendet.

3.13 Herstellung von chemisch kompetenten Sure2-Zellen mittels CaCl_2

Die von der Firma Stratagene erworbenen Sure2-Zellen werden verwendet, um die Fehlerate während der Vervielfältigung der Plasmid-DNA gering zu halten. Dieser Stamm ist defizient für Endonuklease (*endA*) und für Rekombinase (*recB* und *recJ*) und die Zellen tragen Resistenzmarker gegen Kanamycin, Tetracyclin und Chloramphenicol. Die Sure2-Zellen werden nach folgendem Protokoll chemisch kompetent gemacht und vervielfältigt:

- Überimpfung einer ÜN- Kultur 1:1000 in 50 ml LB- Medium (mit Kanamycin 50 $\mu\text{g/ml}$)
- Kultur bei 37°C bis OD_{600} 0,3- 0,4 wachsen lassen
- Kultur 30 min auf Eis stellen
- Zellen 5 min bei 4°C und 3000 rpm zentrifugieren

- Zellpellet vorsichtig in 25 ml kalter 50 mM CaCl_2 - Lösung resuspendieren und danach für 1 h auf Eis stehen lassen
- Erneut 5 min bei 4°C und 3000 rpm zentrifugieren
- Zellpellet in 5 ml kalter 50mM CaCl_2 /20% Glycerin- Lösung resuspendieren
- Aliquots zu je 100 μl im Trockeneis/Ethanol-Bad einfrieren
- Kompetente Zellen bei -80°C lagern

4. Ergebnisse

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind in drei Teile gegliedert. Der erste Teil beschäftigt sich mit der Analyse von WT1 als Transkriptionsfaktor und der Identifizierung von neuen Zielgenen in einem bestehenden *in vitro* Wilms-Tumor-Zellkulturmodell. Der zweite Teil beinhaltet die Etablierung von immortalisierten Wilms-Tumor-Zelllinien, die zur Herstellung eines dauerhaften Zellkulturmodells dienen. Abschließend werden im dritten Teil die Ergebnisse einer Patientin thematisiert, bei der ein unilateraler Wilms-Tumor an der linken Niere diagnostiziert wurde.

Im ersten Kapitel werden nicht nur die WT1-Zielgene gescreent, sondern auch die daraus resultierenden Auswirkungen auf die Zellen analysiert (z.B. Induktion der Zelldifferenzierung, Signalweg-*switch*, etc.). Für eine detaillierte Analyse wird die Wilms-Tumor-Zelllinie Wilms1, die im Vorfeld im hiesigen Institut molekularbiologisch untersucht und näher charakterisiert wurde, verwendet. Bei dieser Zelllinie liegt eine homozygote Mutation im Exon 1 des *WT1*-Gens (c.149 C>A, p.S50X) und eine heterozygote Mutation im Exon 3 des *CTNNB1*-Gens (c.134 C>T, p.S45F) vor (Royer-Pokora et al., 2010). Ein immunologischer Nachweis eines mutierten endogenen WT1-Proteins kann bis dato in den Wilms1-Zellen nicht erbracht werden. Für die weiterführenden Untersuchungen wird im Rahmen dieser Arbeit die DNA bindende *WT1*-(+/-) Isoform in die Zellen transfiziert.

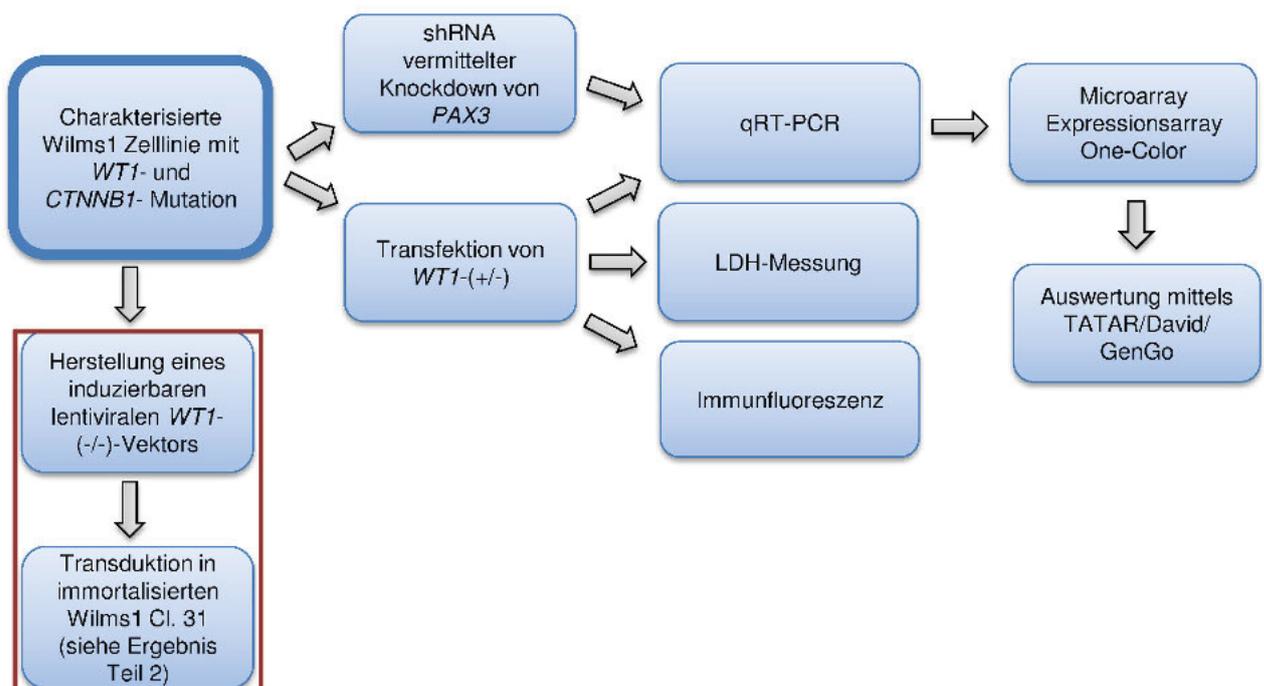


Abb. 4.1: Schematische Darstellung der durchgeführten Versuche an der Wilms1-Zelllinie. Der rote Kasten markiert die Versuche, die eine Verbindung zwischen dem ersten und zweiten Ergebnisabschnitt darstellen.

Die primären Wilms-Tumor-Zelllinien sind durch ihre eingeschränkte Lebensdauer/Teilungskapazität für experimentelle Ansätze, die über einen längeren Zeitraum ablaufen, nur bedingt geeignet. Die relativ kurze Lebensspanne der Zellen in der Kultur hat zur Folge, dass das Zellmaterial limitiert ist. Um diesem Faktor entgegen zu wirken, werden die Zelllinien Wilms1, Wilms6 und Wilms10-T mit der humanen Telomerase (*hTERT*) und mit einem triple mutierten großen T-Antigen vom *Simian Virus 40* immortalisiert. Bevor die immortalisierten Zelllinien als adäquater Ersatz für die Ursprungszelllinie eingesetzt werden können, müssen verschiedene molekularbiologische Untersuchungen durchgeführt werden, die belegen sollen, inwieweit die immortalisierten Zelllinien den originalen Wilms-Tumor-Zellen entsprechen. Abbildung 4.2 stellt schematisch die durchgeführten Untersuchungen an den immortalisierten Zellen im zweiten Teil der Arbeit dar.

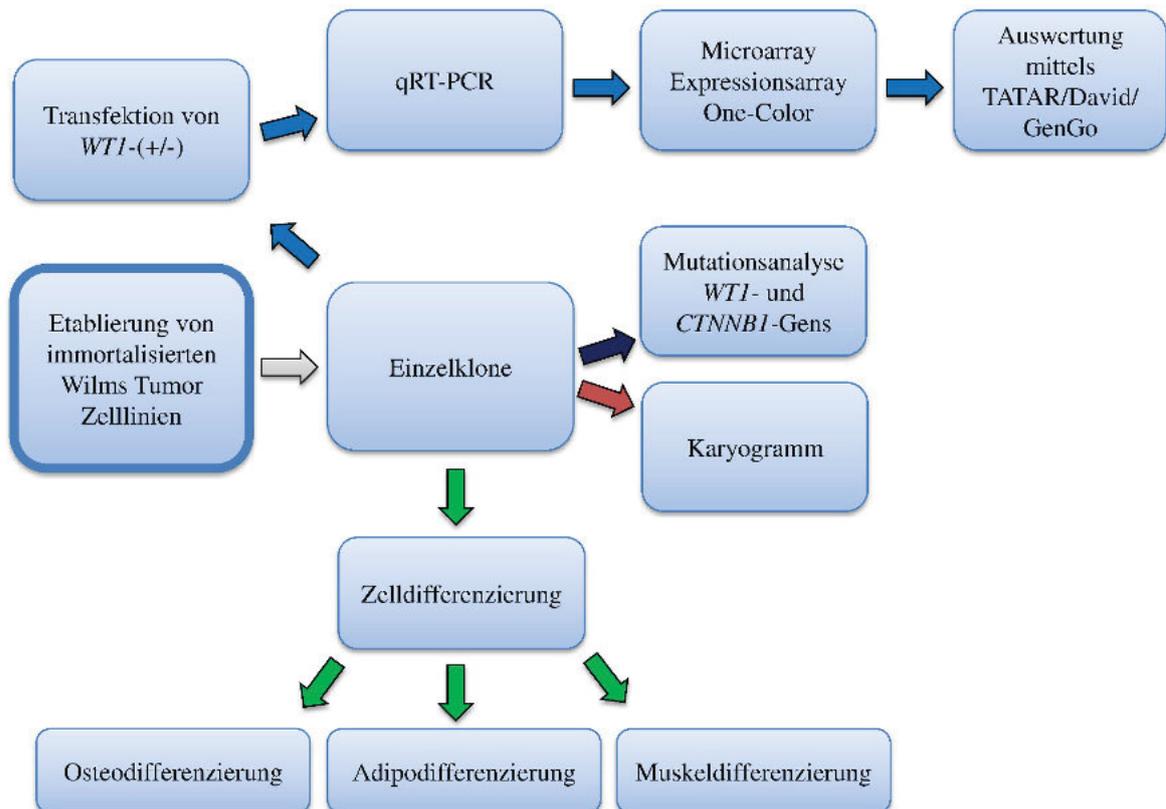


Abb. 4.2: Schematischer Überblick über die durchgeführten Analysen an den immortalisierten Wilms-Zelllinien/Klonen. Die unterschiedlich gefärbten Pfeile gliedern die Experimente, die zusammen gehören bzw. aufeinander aufbauen.

Im dritten Teil der Arbeit wird der seltene und komplexe Fall einer weiblichen Patientin mit einem *WT1*-assoziierten Wilms-Tumor detailliert untersucht und beschrieben. Nachdem bei dieser Patientin ein Wilms-Tumor diagnostiziert wurde, findet eine operative Entfernung des Tumors statt, anschließend erfolgte eine intensive sechsmonatige Chemo- und Strahlentherapie. Bei einer Routineuntersuchung wurde nach Abschluss der Behandlung eine Metastase in der Lunge diagnostiziert. Die Ausbildung einer Metastase bei Patienten mit einem Wilms-Tumor ist ein seltenes Ereignis und tritt nur in 10-15 % aller Fälle auf (Royer-Pokora et al., 2008; Sarin und Graf 2014). Eine detaillierte Beschreibung der Anamnese der Patientin befindet sich im Abschnitt 4.4. Das solide Gewebematerial des Tumors sowie der Metastase und die daraus etablierten Zelllinien werden zahlreichen Analysen unterzogen, die in Abbildung 4.3 aufgeführt sind. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wird der Tumor der Patientin auch als Wilms10-T, die Metastase als Wilms10-M und die Patientin als Wilms10 bezeichnet.

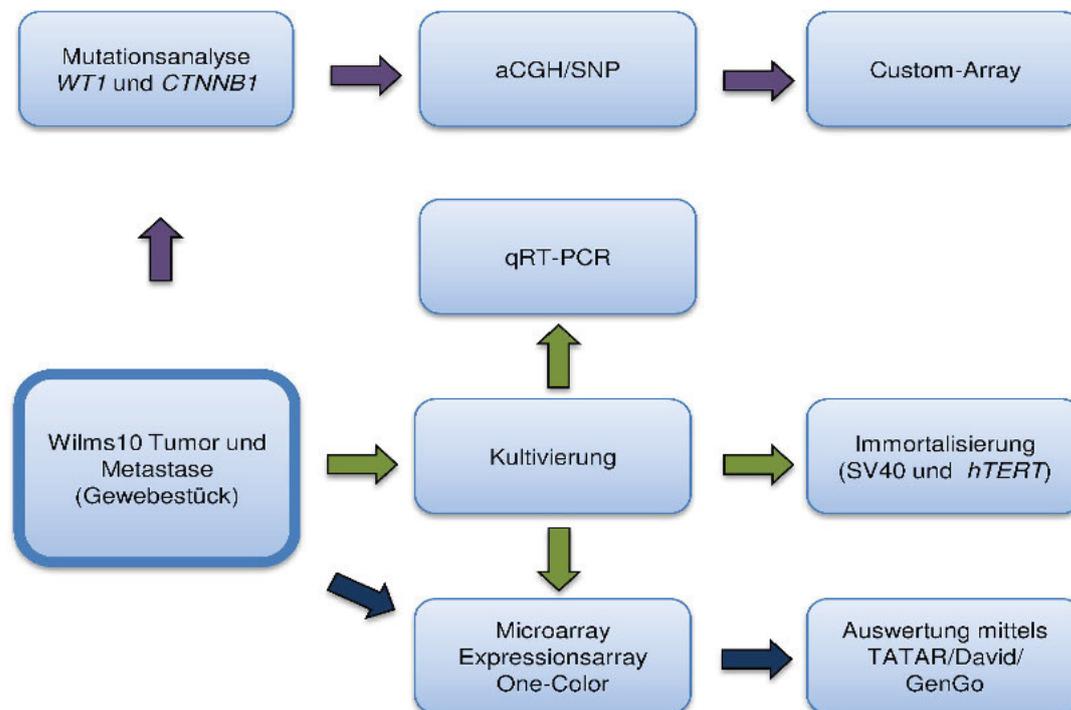


Abb. 4.3: Schematischer Überblick über den Ablauf der Etablierung bis zur Analyse von Wilms10. Dieses Schema skizziert den charakteristischen Arbeitsablauf der Verifikation der *WT1*- bzw. *CTNNB1*-Mutation bei Wilms10 bis hin zur Kultivierung der Tumor- sowie Metastasen-Zellen und deren molekularbiologische Untersuchung.

4.1 Absolute *WT1*-Quantifizierung mittels Standardkurve

Um die *WT1*-Molekülmenge während einer qRT-PCR nicht nur relativ, sondern auch quantitativ zu bestimmen, wird zunächst eine *WT1*-Standardkurve erstellt. Diese wird im Verlauf der Arbeit bei allen qRT-PCRs verwendet, um exakt zu bestimmen, wie viele *WT1*-Kopien in der Zelle pro ng eingesetzter RNA vorhanden sind. Für die Generierung einer reinen *WT1*-RNA wird der *pipLKN*-Vektor benutzt, welcher für die *WT1*(-/-)-Isoform kodiert. Bevor die *WT1* cDNA in RNA umgeschrieben werden kann, wird der *pipLKN*-Vektor mit *Bgl*III geschnitten (Abb.4.4).

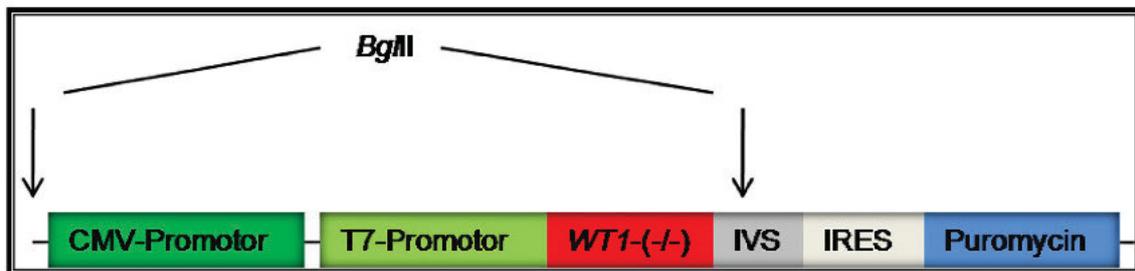


Abb. 4.4: *pipLKN*-Vektor mit *Bgl*III geschnitten. Ausgeschnitten wird der mit den Pfeilen markierte Bereich. Das ausgeschnittene Fragment enthält einen CMV-Promotor, T7-Promotor, die *WT1*(-/-)-cDNA und einen Teil von IVS (Intron; *inverting sequence*), IRES: interne ribosomale Eintrittsstelle und den Selektionsmarker Puromycin.

Das herausgeschnittene Fragment enthält 5'-Überhänge, die zunächst mit dem Klenow-Fragment aufgefüllt werden (siehe 3.9.7). Vor dem *WT1*(-/-)-Gen ist ein T7-Promotor geschaltet, welcher es der DNA-abhängigen RNA-Polymerase ermöglicht, dieses Fragment in RNA zu transkribieren. Für die RNA-Synthese wird das *RiboMAXTM Express Large Scale RNA Production Kit* (Promega) verwendet. Für die Herstellung einer nahezu reinen RNA findet nach der RNA-Synthese eine Phenol-Chloroform-Aufreinigung statt. Die anschließende Messung der RNA-Konzentration sowie die Bestimmung der Qualität mittels Bioanalyzer (NanoChip 6000) zeigt eine Kontamination auf. Auf Grund dessen wird die RNA zusätzlich über Säulen aufgereinigt (siehe 3.9.1). Danach wird die *WT1*(-/-)-RNA in cDNA umgeschrieben (siehe 3.9.5). Die exakte *WT1*-Molekülmenge pro μ l wird mit Hilfe der Formel, die in 3.9.8 beschrieben wird, berechnet. Nach dem Umschreiben der *WT1*-RNA in cDNA, wird eine Verdünnungsreihe mit bekannter *WT1*(-/-)-Konzentration hergestellt (3.9.8) und eine qRT-PCR durchgeführt. Nach Abschluss der qRT-PCR wird die *WT1*-Standardkurve mittels bekannter *WT1*-Konzentration und den dazugehörigen C_T -Werten errechnet (Abb. 4.5). Die daraus resultierende Geradengleichung (Abb. 4.6; roter Kasten) wird für die Berechnung der *WT1*-Molekülmenge in allen weiterführenden qRT-PCR-Untersuchungen verwendet.

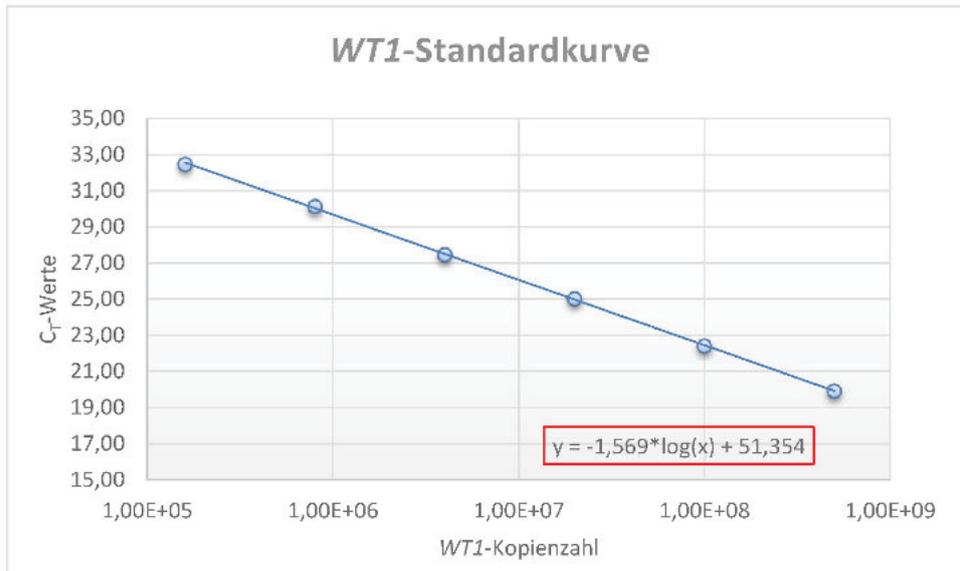


Abb. 4.5: WT1-Standardkurve zur Bestimmung der WT1-Kopienzahl. Für eine einheitliche Bestimmung der C_T-Werte wird der Schwellenwert (Threshold) auf 0,5 gesetzt. Die aus der Geraden berechnete Geradengleichung ist rot umrandet.

Für die Geradengleichung gelten folgende Kriterien: Der Logarithmus der eingesetzten Molekülmenge und der C_T-Wert sind umgekehrt proportional zueinander. Damit alle nachfolgenden qRT-PCR-Werte bzw. die berechnete WT1-Molekülmenge miteinander vergleichbar sind, wird der Schwellenwert (Threshold) für die gemessene WT1-Fluoreszenz auf 0,5 festgelegt.

4.2 Analyse von WT1-Zielgenen in der Wilms1-Zelllinie

Rackley beschreibt, dass WT1 eine wichtige Rolle während der Embryogenese spielt und in verschiedenen Geweben exprimiert wird (Rackley et al., 1993). Auch im adulten Gewebe ist die Expression von WT1 nachweisbar was zeigt, dass WT1 nicht nur für die Bildung von Zelltypen/Geweben, sondern auch für deren Aufrechterhaltung bzw. Funktion essentiell ist. Um mögliche Zielgene von WT1 zu identifizieren, wird die DNA bindende WT1-(+/-)-Isoform in die Wims1-Zelllinie transient transfiziert. Durch die homozygote Mutation im WT1-Gen wird bei Wilms1 kein funktionsfähiges WT1-Protein synthetisiert. Dadurch ist diese Zelllinie ein geeigneter Kandidat für Transfektionsversuche mit der wt-WT1-(+/-)-Isoform. Die Transfektion erfolgt wie in 3.5 beschrieben. Der Versuch wird insgesamt dreimal wiederholt (biologische Replikate). Zur Bestätigung einer erfolgreichen Transfektion wird eine qRT-PCR mit daran anschließender Expressionsanalyse durchgeführt, die mittels eines *One Color Microarrays* erfolgt. Für die Bestimmung der WT1-Molekülanzahl wird die WT1-Standardkurve verwendet (4.1). Als weiterer Nachweis für eine gelungene Transfektion des CMV-WT1-(+/-)-Vektors dient eine immunologische Bestätigung des WT1-Proteins (Abb. 4.6 C).

Die immunologische Verifikation erfolgt an fixierten Zellen 24 h nach der Transfektion mit CMV-*WT1*-(+/-). Für die qRT-PCR-Analyse wird 24 und 48 h nach der Transfektion RNA isoliert.

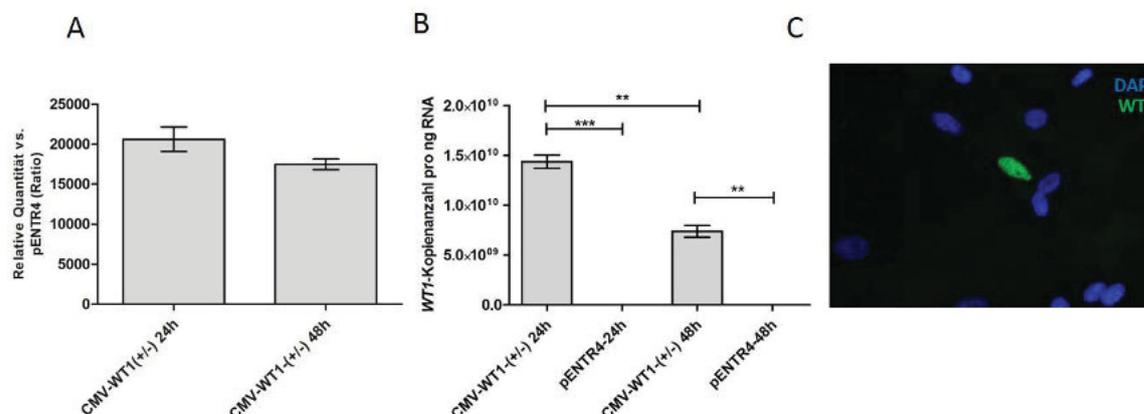


Abb. 4.6: Wilms1-Passage 9-Zelllinie nach transients Transfektion mit CMV-*WT1*-(+/-)-Vektor. A: Dargestellt ist die relative Quantität der *WT1*-Expression, jeweils auf die mit transfizierte pENTR4-Vektorkontrolle bezogen und auf das Kontrollgen *RER1* normiert. **B:** Die absolute Quantifizierung der *WT1*-Kopien (pro ng RNA) in Abhängigkeit vom zeitlichen Abstand der Transfektion. Signifikanz wird mit dem t-Test bestimmt, dabei gilt Folgendes: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$. **C:** Immunologischer Nachweis von *WT1*-Protein in transfizierten Wilms1-Passage 9 Zellen. Färbung der Zellen: Blau= DAPI-Färbung, grün= *WT1*-Antikörper.

Wie an Abbildung 4.6 A zu erkennen ist, wird eine 20.000-fach höhere Expression von *WT1* im Vergleich zur Kontrolle (Wilms1 mit pENTR4) bereits 24 h nach der Transfektion erreicht. Nach 48 h nimmt die Expression von *WT1* bereits langsam wieder ab (ca. 17.000-fach höhere Expression in Bezug auf pENTR4). Umgerechnet in *WT1*-Kopienanzahl bedeutet dies für den 24 h Zeitpunkt eine *WT1*-Molekülanzahl von 1,66²². Nach 48 h sinkt der Wert auf 3,87²¹ *WT1*-Moleküle pro ng eingesetzte RNA (Abb. 4.6 B). Zusätzlich wird mit Hilfe einer Immunfluoreszenz die Synthese des *WT1*-Proteins und dessen Lokalisation im Zellkern nachgewiesen (Abb. 4.6 C). Mit beiden Analyseverfahren konnte eine erfolgreiche Transfektion der *WT1*-(+/-)-Isoform bestätigt werden.

4.2.1 Expressionsanalyse von transfizierten Wilms1-Zellen

Für die Genexpressionsanalyse wird die gesamte RNA aus den mit CMV-*WT1*-(+/-) und mit pENTR4 transfizierten Wilms1-Zellen isoliert und auf einem 4x44K *Whole Human Genome Oligo Microarray* (Agilent) hybridisiert. Damit die Expressionsdaten eine statistische Signifikanz haben, werden drei biologische Versuche mit den gleichen Kriterien wiederholt. Aus den Expressionsdaten aller drei Versuche wird der Mittelwert (*Mean*) gebildet.

Für die Analyse der generierten Daten werden folgende Parameter festgelegt: Alle Expressionsdaten der transfizierten Wilms1-Zellen, die einen *Foldchange* von $\geq 1,5$ mit einer Expressionsintensität von ≥ 200 gegenüber den mit pENTR4 transfizierten Zellen aufzeigen und eine Signifikanz von $p \geq 0,05$ haben, werden weiter analysiert. Mit Hilfe der Software TATAR werden nach diesen Parametern 1377 regulierte Gene/Oligos in den Wilms1-Zellen mit CMV-*WT1*-(+/-) ermittelt. Davon sind 560 Gene hoch- und 817 Gene herunterreguliert. Die weiterführende Expressionsanalyse der generierten Datensets wird unter anderem mit dem öffentlich zugänglichen Genome Browser DAVID (<http://DAVID.abcc.ncicrf.gov/>) durchgeführt. Diese bioinformatische Datenbank liefert Auskunft über die beteiligten regulierten Prozesse, unter Berücksichtigung der eingespeisten Datensätze (regulierte Gene nach Transfektion mit CMV-*WT1*-(+/-)). Dazu gehören unter anderem KEGG-Signalwege, die nach Ihrer Signifikanz sortiert sind (Abb. 4.7).

Term	Count	%	P-Value
Oxidative phosphorylation	20	3.9	6.2E-10
Huntington's disease	21	4.1	2.8E-8
Parkinson's disease	17	3.3	1.5E-7
Alzheimer's disease	18	3.5	8.5E-7
Cardiac muscle contraction	8	1.6	4.0E-3
Wnt signaling pathway	9	1.7	4.3E-2
Melanogenesis	7	1.4	4.4E-2
Endometrial cancer	5	1.0	4.6E-2
Aldosterone-regulated sodium reabsorption	4	0.8	9.1E-2
Bladder cancer	4	0.8	9.6E-2

Abb. 4.7: KEGG-Signalwege. DAVID Auswertung der hochregulierten Gene in Wilms1-Zellen nach Transfektion mit CMV-*WT1*-(+/-). Aufgeführt sind die involvierten biologischen Vorgänge, die bei den Wilms1-Zellen nach der Transfektion mit CMV-*WT1*-(+/-) reguliert werden, im Vergleich zu den Wilms1-Zellen, die mit dem Leervektor pENTR4 transfiziert werden. Unter *Count* ist die Anzahl der beteiligten Gene angegeben, die in diesem biologischen Prozess reguliert werden. Die Prozente geben an, wie groß deren prozentualer Anteil von der Gesamtzahl der regulierten Gene ist. Die einzelnen Signalwege sind nach ihren Signifikanzen, nach dem p-Wert angeordnet, beginnend mit der höchsten Signifikanz.

Hochregulierte Gene (upregulated genes)

Die erste Auswertung der hochregulierten Gene zeigt, dass diese an der oxidativen Phosphorylierung beteiligt sind und die höchste Signifikanz mit einem Wert von $p=6,2^{-10}$ aufzeigen. Eine genaue Übersicht der oxidativen Phosphorylierung bzw. der daran beteiligten Gene sowie die nach der Transfektion von Wilms1 mit CMV-*WT1*-(+/-) im Vergleich zu der Kontrolle der hochregulierten Gene ist in Abbildung 4.8 dargestellt.

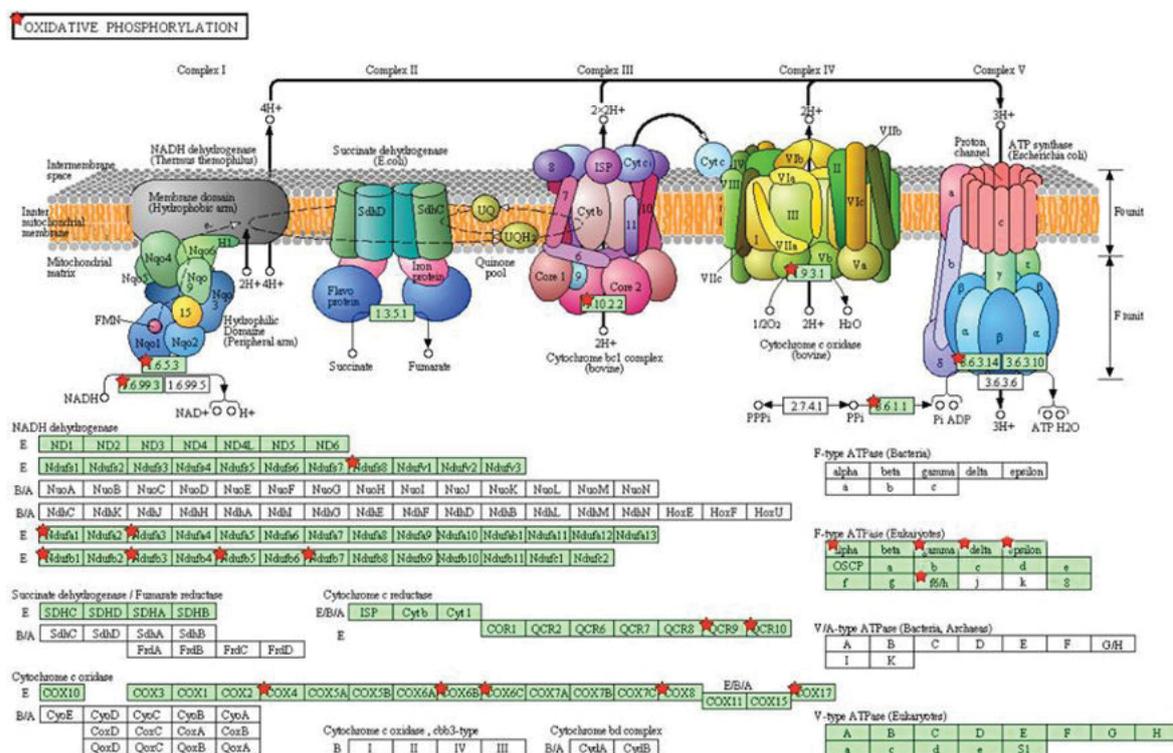


Abb. 4.8: KEGG-Signalweg der oxidativen Phosphorylierung. Die roten Sterne markieren die hochregulierten Gene von Wilms1, die mit dem CMV-*WT1*(+/-) Vektor transfiziert werden, im Vergleich zur Kontrolle (Wilms1 mit pENT4 transfiziert/entnommen aus DAVID).

Die oxidative Phosphorylierung ist in aeroben Organismen der wichtigste biologische Prozess zur Energiegewinnung, die über die Atmungskette in den Mitochondrien der Zellen stattfindet. Dabei dienen die Coenzyme NADH, FMN₂ und FADH₂ als Elektronenlieferanten. Diese Elektronen werden über eine Reihe von Redoxvorgängen auf ein Oxidationsmittel übertragen. Dabei entsteht freie Energie in Form eines Protonengradienten, die wiederum dazu verwendet wird, aus ADP und Phosphat ATP zu synthetisieren (Swanson et al., 2010). Die Atmungskette besteht aus fünf Enzymkomplexen, die wiederum aus Subkomplexen (Untereinheiten) zusammengesetzt sind. Nach der Transfektion mit *WT1*(+/-) werden zahlreiche Gene hochreguliert, die verschiedene Untereinheiten dieser Enzymkomplexe kodieren.

Die Auswertung der Expressionsdaten zeigt, dass nach der Transfektion mit der *WT1*(+/-)-Isoform insgesamt vier der fünf Komplexe von der Regulation betroffen sind. Zu den hochregulierten Genen gehören *NDUFA3*, *NDUFA4*, *NDUFS8*, *NDUFB1* und *NDUFB*, die Bestandteile von Komplex I sind, welche für die NADH-Dehydrogenase kodieren (Sury et al., 1998; Loeffen et al., 1998; Kim et al., 1997; Ton et al., 1997). Weitere regulierte Gene sind *QCR9* und *QCR10*, die Proteine kodieren, die zum Ubiquinol-Cytochrom-c-Reduktase-Komplex gehören (Komplex III). Gleichzeitig werden auch Gene hochreguliert, die Proteine kodieren, die den Komplex IV, die die sogenannte Cytochrom-c-Oxidase bilden (*COX4*, *COX6B*, *COX6C*, *COX8* und *COX17*). Die Expression der Gene *ATP5I*, *ATP5J*, *ATP5D*,

ATP5L und *ATP5G1*, die Proteine kodieren die zum Komplex V (ATP-Synthase) gehören, zeigt, dass diese ebenfalls hochreguliert werden (Elliot et al., 1993; Javed et al., 1991; Jordan und Breen 1992; Dryer und Walker, 1993/Tab. 4.1).

Die erste Analyse der hochregulierten Gene zeigt, dass sie hauptsächlich für Proteine der Atmungskette kodieren und somit eine wichtige regulatorischen Funktion während der oxidativen Phosphorylierung übernehmen. Auf dieser Grundlage ist anzunehmen, dass *WT1* eine wichtige Funktion von biologischen Prozessen steuert, die einen erhöhten Energiebedarf benötigen. Dieser wird über die Atmungskette in Form von ATP gewonnen und den Zellen zur Verfügung gestellt.

Komplex I NADH Dehydrogenase		Komplex III Ubiquinol-Cytochrom C Reductase		Komplex IV Cytochrom C Oxidase		Komplex V ATP Synthase	
Regulierte Gene							
WT1-(-/-)	Kontrolle	WT1-(-/-)	Kontrolle	WT1-(-/-)	Kontrolle	WT1-(-/-)	Kontrolle
	NDUFS8		QCR9		COX4		ATP5I
208	129	44106	28747	35748	18783	26085	10670
	NDUFA1		QCR10		COX6B		ATP5J
20160	11185	3549	1355	18161	11613	21753	13688
	NDUFA3				COX6C		ATP5D
10615	3850			17599	8989	4742	2606
	NDUFB1				COX8		ATP5L
13589	6486			51610	27869	62232	39999
	NDUFB3				COX17		ATP5G1
12700	7538			11345	5385	8211	5417
	NDUFB5						
2045	1075						
	NDUFB7						
6945	4442						

Tab. 4: Enzymkomplexe der Atmungskette, die nach *WT1*(+/-) Transfektion reguliert werden. Aufgelistet sind die hochregulierten Gene der einzelnen Komplexe. Gegenübergestellt ist die Expressionsintensität der *WT1*(+/-) und pENTR4 (Kontrolle) transfizierten Wilms1-Zellen. Komplex II ist nicht aufgelistet, da kein Gen in diesem Komplex reguliert wird. Der Wert der Expressionsintensitäten ist der Mittelwert von drei biologischen Wiederholungen.

Die durch TATAR identifizierte regulierten Gene werden zusätzlich mit *MetaCore*, einer internetbasierenden kommerziellen Plattform, analysiert. So sollen die Expressionsergebnisse detaillierter untersucht und die gegebenenfalls bereits vorliegenden Ergebnisse verifiziert werden. Die Analyse der hochregulierten Gene zeigt auch in diesem Fall, dass die oxidative Phosphorylierung mit einem p-Wert von 7.062^{-13} am stärksten reguliert wird und dass die gleichen Gene reguliert werden, die bereits durch *DAVID* ermittelt werden konnten (Abb. 4.10). Zusätzlich werden auch Gene signifikant hochreguliert ($p=2,7^{-6}$), die an dem Ubichinon-(*Ubiquinone*)-Metabolismus beteiligt sind (Abb. 4.9). Dieser Signalweg ist mitunter mit dem *Pathway* der oxidativen Phosphorylierung verknüpft.

#	Maps	0	2	4	6	8	10	-log(pValue)	pValue ↑
1	Oxidative phosphorylation	[Bar chart showing high regulation]						7.062e-13	
2	Development: WNT signaling pathway, Part 2	[Bar chart showing high regulation]						1.460e-7	
3	Ubiquinone metabolism	[Bar chart showing high regulation]						2.727e-6	
4	Transport: The role of AVP in regulation of Aquaporin 2 and renal water reabsorption	[Bar chart showing high regulation]						1.420e-5	
5	PGE2 pathways in cancer	[Bar chart showing high regulation]						2.696e-5	
6	Development: Non-genomic action of Retinoic acid in cell differentiation	[Bar chart showing high regulation]						3.040e-5	
7	Development: WNT signaling pathway, Part 1. Degradation of beta-catenin in the absence WNT signaling	[Bar chart showing high regulation]						2.124e-4	
8	Role of ZNF202 in regulation of expression of genes involved in atherosclerosis	[Bar chart showing high regulation]						3.198e-4	
9	Transcription: Role of heterochromatin protein 1 (HP1) family in transcriptional silencing	[Bar chart showing high regulation]						4.352e-4	

Abb. 4.9: Hochregulierte Signalwege (pathway maps) in Wilms1-Zellen. *MetaCore* Analyse der hochregulierten Gene in Wilms1-Zellen nach Transfektion mit CMV-*WT1*(+/-) und die 10 hoch signifikanten *Maps* nach p-Wert sortiert.

Beim Ubichinon (UQ), das auch als Coenzym Q₁₀ bezeichnet wird, handelt es sich um ein endogen synthetisiertes Lipid in Säugertierzellen, welches an Redoxreaktionen beteiligt ist. Es fungiert sowohl als Protonen- als auch Elektronen-Überträger zwischen den ersten drei Komplexen der Atmungskette während der oxidativen Phosphorylierung. Dabei wird das Ubichinon durch die Aufnahme von Wasserstoff-Ionen zu Ubihydrochinon (UQ₂) reduziert (Kagan und Quinn, 2001).

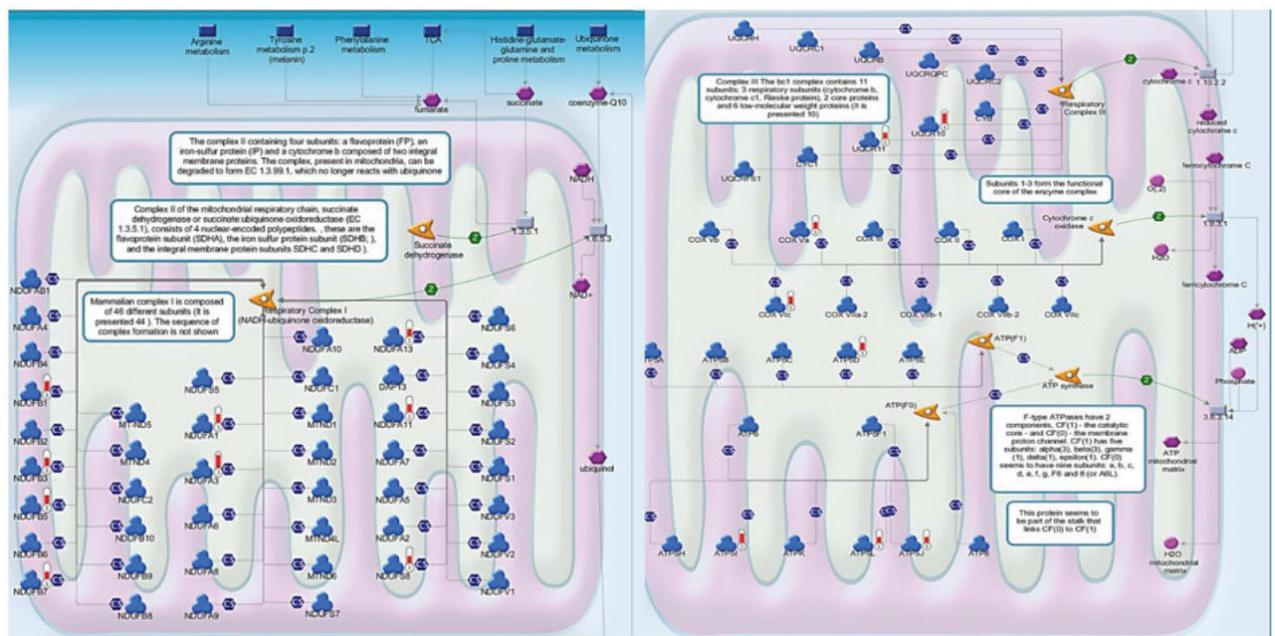


Abb. 4.10: *MetaCore*, Map-Darstellung der oxidativen Phosphorylierung und der beteiligten Gene bei Wilms1-Zellen mit CMV-*WT1*(+/-) transfiziert. Abgebildet sind die Faktoren, die an der oxidativen Phosphorylierung beteiligt sind. Die hochregulierten Gene sind mit einem roten Balken versehen. Die Höhe vom Balken spiegelt die Intensität der Regulation wider. Die blauen Symbole stellen Proteine dar, die gelben Pfeile stehen für Phosphatasen, die grauen Rechtecke symbolisieren ablaufende Reaktionen, die violetten Trapeze stehen für zusammengesetzte Verbindungen. Diese *Map* basiert auf einer hochqualitativen Prüfung von Veröffentlichungen durch Experten und den daraus zusammengetragenen Informationen.

Herunterregulierte Gene (*downregulated genes*)

Nach der Transfektion des CMV-*WT1*-(+/-)-Konstrukts in die Wilms1-Zellen sind 817 Gene/Oligos identifiziert worden, die negativ von *WT1*-(+/-) reguliert werden (herunterreguliert). Die nachfolgende Analyse der Gene mittels *DAVID* und *GeneGo* zeigt zahlreiche Signalwege auf, die sich direkt oder indirekt negativ auf den Zellzyklus auswirken (Abb.4.11).



Abb. 4.11: Analyse der herunterregulierten Gene in Wilms1-Zellen nach *WT1*-(+/-) Transfektion. A: Die 10 signifikanten *Pathway-Maps* nach *DAVID*. **B:** Die 10 signifikanten *Pathway-Maps* nach *MetaCore*.

Gene, die direkten Einfluss auf den Zellzyklus haben und negativ reguliert werden, sind unter anderem *CDC20*, *CCND1* (*CycD*), *BUB1B* und *MCM7* (Abb. 4.12). Die Produkte dieser Gene regulieren den Zellzyklus, dabei agiert das *CDC20*-Protein als ein Aktivator des APC/C-Komplexes, der die Initiation der Anaphase steuert und für das Beenden vom Mitosezyklus zuständig ist. Seine Funktion kann das Protein nur erfüllen, wenn es durch seine Interaktionspartner *CDC20* und *HCDH1* aktiviert wird. Die Expression des *CCND1*-Gens findet während der G1-Phase des Zellzyklus statt und unterstützt durch die Phosphorylierung des RP-Proteins (wird dadurch deaktiviert) den Übergang von der G1-Phase zur S-Phase des Zellzyklus (Inaba et al., 1992; Fu et al., 2004). Das *BUB1B*-Protein wird für die Ausrichtung der Chromosomen während der Metaphase benötigt (Rio et al., 2010). Ein weiteres Gen, das den Zellzyklus direkt reguliert und durch *WT1*-(+/-) herunterreguliert wird, ist das *MCM7*-Gen. Das *MCM7*-Gen kodiert ein Protein, das dem MCM-Komplex angehört und eine zentrale Rolle beim Übergang in der G1/S-Phase im Zellzyklus spielt. Es ist für die richtige Zusammensetzung und Orientierung der Replikationsgabel verantwortlich und dafür, dass die gesamte genomische DNA nur einmal pro Zellzyklus repliziert wird (Petrocca et al., 2008).

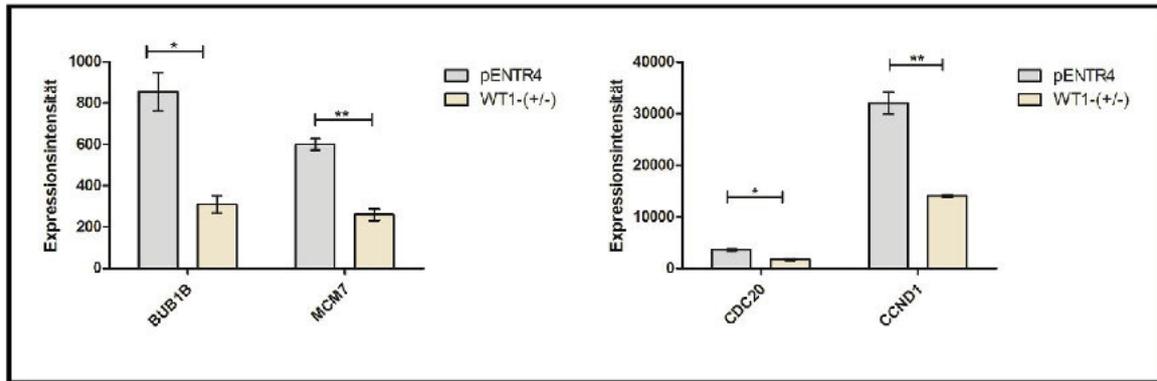


Abb. 4.12: Expressionsdaten von Wilms1-Zellen. Abgebildet sind die einzelnen Expressionsintensitäten der am Zellzyklus beteiligten Faktoren *BUB1B*, *MCM7*, *CDC20* und *CCND1*. Alle diese Gene werden in Anwesenheit von WT1-(+/-) signifikant herunter reguliert. Dabei gilt: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$. Fehlerbalken= Standardfehler

Ein indirekt negativer Einfluss auf den Zellzyklus liegt in der Regulation des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs vor. Dieser spielt eine wichtige Rolle während der Proliferation, dem Überleben und der Differenzierung von Zellen (Novo et al., 2014).

LDH-Messung:

Es ist seit Längerem bekannt, dass die Energiegewinnung in Tumorzellen hauptsächlich über einen anaeroben Stoffwechsel, die Glykolyse, stattfindet (Yi und Jin-Ming, 2013). Ein Glukosemolekül wird dabei über mehrere Zwischenschritte zu Pyruvat umgewandelt. In diesem Prozess werden insgesamt die Moleküle ATP und NADH gebildet. Bei geringer Sauerstoffkonzentration wird das Pyruvat durch die Lactatdehydrogenase (LDH), bei Anwesenheit von NADH, zu Lactat reduziert.

Die Auswertung der Expressionsdaten der transfizierten (mit CMV-*WT1*-(+/-)) Wilms1-Zellen ergibt mitunter, dass die oxidative Phosphorylierung zu den signifikanten hochregulierten Signalwegen zählt. Auf dieser Grundlage sollte durch die Messung der LDH im Zellüberstand der metabolische *switch* zwischen Glykolyse und oxidativer Phosphorylierung bestimmt werden. Dazu wird die Zelllinie Wilms1 erneut mit dem CMV-*WT1*-(+/-) Konstrukt transfiziert. Als Kontrollvektor wird der pENTR4-Leervektor, der ebenfalls transfiziert wird, verwendet. Zu drei verschiedenen Zeitpunkten nach der Transfektion wird der Überstand von den Zellen abgenommen und die LDH-Konzentration gemessen. Die Messungen werden im Zentrallabor der NMR-Klinik in Düsseldorf vorgenommen.

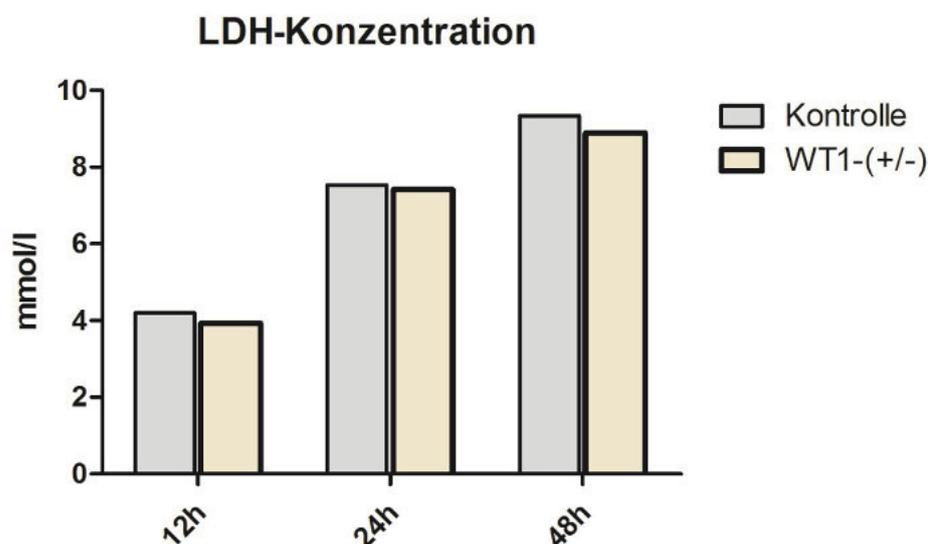


Abb. 4.13: Messung der LDH-Konzentration bei Wilms1. Messwerte der LDH-Konzentration zu drei verschiedenen Zeitpunkten. Gemessen wird der Überstand von Wilms1-Zellen, die mit dem CMV-*WT1*-(+/-) und dem pENTR4-Konstrukt (als Kontrolle) transfiziert werden.

Die Messwerte zu den drei verschiedenen Zeitpunkten zeigen keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontrolle und den *WT1*-(+/-) transfizierten Wilms1-Zellen auf (Abb. 4.13). Zwar ist ein Anstieg der LDH-Konzentration über die drei Zeitpunkte im Überstand festzustellen, dieser liegt aber sowohl in den Kontrollen, als auch in den *WT1*-(+/-) transfizierten Zellen vor. Eine metabolische Veränderung konnte mittels der LDH-Messung nicht ermittelt werden.

4.3 *PAX3*-Knockdown und dessen Auswirkung auf die Wilms1-Zelllinie

Eine Verbindung zwischen einem myogenen Phänotyp bei Wilms-Tumoren und einer *PAX3*-Expression konnte in diesen bereits nachgewiesen werden. Dass *PAX3* im Stroma-Kompartiment während der Nierendifferenzierung exprimiert wird, ist ebenfalls bekannt. (Hueber et al., 2009). Um zu analysieren, ob die Wilms1-Zellen *PAX3* exprimieren, wird zunächst die gesamte RNA aus den Zellen isoliert und in cDNA umgeschrieben (3.9.1 und 3.9.5). Anhand von publizierten Primersequenzen für sieben verschiedene *PAX3*-Isoformen werden entsprechende RT-PCRs durchgeführt (Wang et al., 2006). Alle sieben *PAX3*-Isoformen können in den Wilms1-Zellen nachgewiesen werden. Um die Funktion von *PAX3* in den Wilms1-Zellen besser zu verstehen, wird dieses Gen mittels einer spezifischen shRNA, die in Wilms1-Zellen transfiziert wird, ausgeschaltet. Die gemessene Knock-Down Effizienz der *PAX3*-Expression in zwei unabhängigen Versuchen in den Wilms1-Zellen beträgt ca. 60-70 Prozent. Der Nachweis der *PAX3*-Expression sowie der anschließende Knockdown

von *PAX3* konnte bereits im Zuge der eigenen Diplomarbeit ermittelt werden (Biologische Charakterisierung von Wilms-Tumorzelllinien mit *WT1*-Mutation).

Um den Einfluss vom *PAX3*-Knockdown auf die Expression der Wilms1-Zellen zu untersuchen, wird ein 4x44K *Whole Human Genome Oligo Microarray* der Firma Agilent verwendet. Es wird die gleiche RNA verwendet, die bereits für die Verifikation des Knock-Downs angewandt wird. Die Expressionsdaten der beiden Knock-Down-Versuche werden zusammengefasst und mit den Genexpressionsprofilen der bestehenden fünf biologischen Wiederholungen der primären Wilms1-Zelllinie verglichen. Auch in diesem Fall werden die Datensets nach den gleichen Kriterien gefiltert. Alle Daten, die eine Expressionsintensität von ≥ 200 , einen Foldchange von $\geq 1,5$ und einen p-Wert von $\geq 0,05$ aufweisen, werden weiter analysiert (erstellt mit TATAR).

Die erste Analyse mit TATAR ergibt insgesamt 6647 Gene/Oligos, die reguliert werden. Davon sind 3079 herunterreguliert und 3568 Gene/Oligos hochreguliert. Wie in Abbildung 4.14 zu erkennen ist, lässt sich der *PAX3-Knockdown* ebenfalls anhand des Unterschieds in der Expressionsintensität zwischen behandelten und unbehandelten Wilms1-Zellen verifizieren. Die durchschnittliche Expression des *PAX3*-Gens in den Wilms1-Zellen schwankt um 2200. Nach dem Abschalten des Gens wird eine durchschnittliche Expressionsintensität von 19 gemessen. Dieses Expressionslevel liegt auf dem Niveau der Hintergrundintensität und verifiziert somit den Knock-Down der *PAX3*-Expression.

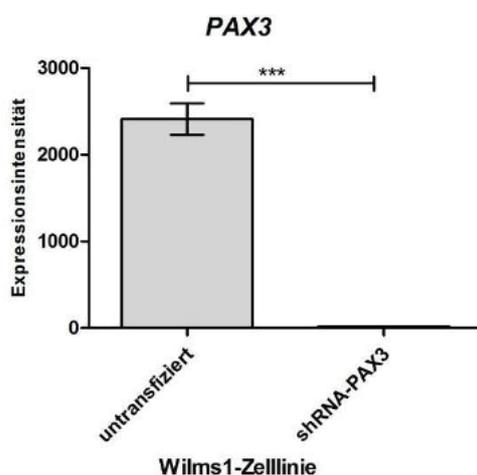


Abb. 4.14: Expressionsintensität des *PAX3*-Gens. Dargestellt ist die Expressionsintensität des *PAX3*-Gens in den Wilms1-Zellen. Gegenübergestellt ist die Expression von *PAX3* in den untransfizierten (N=5) und den mit der shRNA-*PAX3* transfizierten (N=2) Wilms1-Zellen. Die Signifikanzbestimmung erfolgt mit dem t-Test, dabei gilt Folgendes: *** $p \leq 0,001$.

Die weiterführende Analyse der regulierten Gene wird mit *DAVID* ausgeführt. Die Auswertung der 3079 herunterregulierten Gene/Oligos nach dem *PAX3-Knockdown* zeigt, dass diese Gene an der DNA-Replikation, dem Zellzyklus und weiteren damit eng verknüpften Signalwegen beteiligt sind. Es werden 23 Gene, die an der DNA-Replikation involviert sind

mit einer Signifikanz von $p=9,3^{-11}$ herunterreguliert. Darauf folgen Gene, die mit einer Signifikanz von $p=2,5^{-8}$ in den Zellzyklus eingreifen, insgesamt sind 43 Gene an diesem Signalweg herunterreguliert (Abb. 4.15). Mechanismen, die eng mit der DNA-Replikation und dem Zellzyklus verbunden bzw. ein Bestandteil davon sind und ebenfalls negativ reguliert werden sind: Der Pyrimidin- sowie Purin-Metabolismus ($p=5,5^{-4}$ und $p=2,4^{-3}$) und die *Mismatch-* sowie *Base-excision-repair* ($p=2,9^{-3}$ und $p=1,6^{-4}$).

Term	Count	%	P-Value
DNA replication	23	0.9	9.3E-11
Cell cycle	43	1.7	2.5E-8
Base excision repair	15	0.6	1.6E-4
Pyrimidine metabolism	27	1.1	5.5E-4
Purine metabolism	36	1.4	2.4E-3
Mismatch repair	10	0.4	2.9E-3

Abb. 4.15: Regulierte KEGG-Signalwege mit der höchsten Signifikanz. DAVID-Auswertung der herunterregulierten Gene in Wilms1-Zellen nach dem PAX3-Knockdown. Unter *Count* ist die Anzahl der beteiligten Gene angegeben, die in diesem biologischen Prozess reguliert werden. Die Prozente geben an, wie groß deren prozentualer Anteil von der Gesamtzahl der regulierten Gene ist. Die einzelnen Signalwege sind ihren Signifikanzen nach dem p-Wert angeordnet, beginnend mit der Höchsten.

Die an der DNA-Replikation beteiligten Enzyme/Komplexe und die nach *PAX3-Knockdown* herunterregulierten Gene sind in Abbildung 4.16 dargestellt. Zu den signifikant herunterregulierten Genen gehören unter anderem *FEN1*, *LIG1*, *RPA3* und *PCNA* (Abb. 4.17). *FEN1* kodiert für eine strukturspezifische Nuklease mit einer 5' flap Endonukleasen- und einer 5'-3' Exonukleasen Aktivität. Diese Eigenschaft ermöglicht die Entfernung von RNA-Primern, die während der Synthese des diskontinuierlichen DNA-Stranges benötigt werden und zwischen den Okazaki-Fragmenten positioniert werden (Hosfield et al., 1998). Die Ligase (*LIG1*) schließt die Lücken zwischen den Okazaki-Fragmenten und generiert dadurch einen durchgängigen Strang (Harrison et al., 2002).

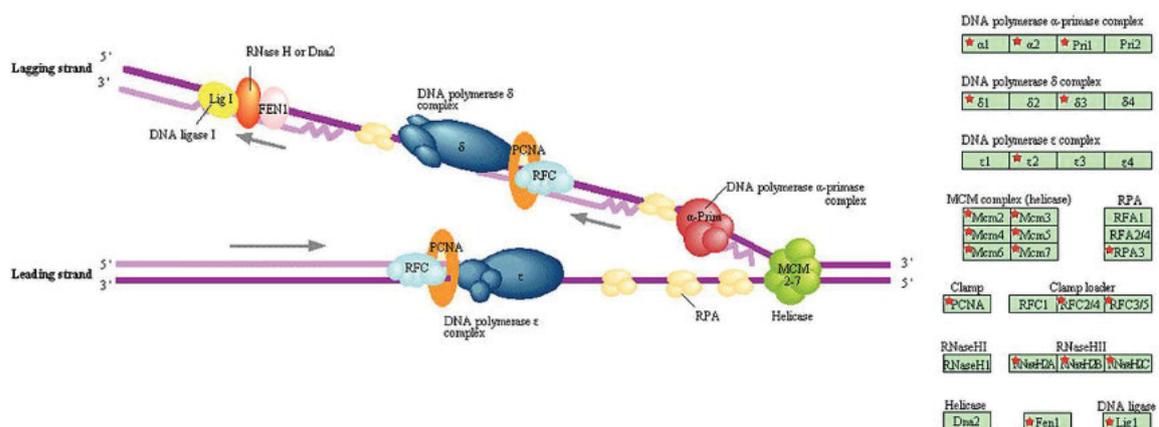


Abb. 4.16: KEGG-Signalweg/Mechanismus der DNA-Replikation. Dargestellt sind die nach *PAX3-Knockdown* negativ regulierten Gene in der Wilms1-Zelllinie. Alle in der DNA-Replikation involvierten Enzyme/Komplexe sind rechts aufgeführt. Die nach *PAX3-Knockdown* herunterregulierten Gene sind mit einem roten Stern markiert (entnommen aus *DAVID*).

Das *PCNA*-Gen kodiert für ein Hilfsprotein, welches während der DNA-Replikation an der Replikationsgabel lokalisiert ist. Hier sorgt es für die Rekrutierung und Bindung von zahlreichen Enzymen, die für die DNA-Replikation und -Reparatur notwendig sind (Baple et al., 2014). Als ein Bestandteil des RPA/RP-A bindet das RPA3-Protein während der DNA-Replikation an den Einzelstrang und stabilisiert diesen. Dadurch wird die Anlagerung der beiden Einzelstränge aneinander verhindert (Lin et al., 1998).

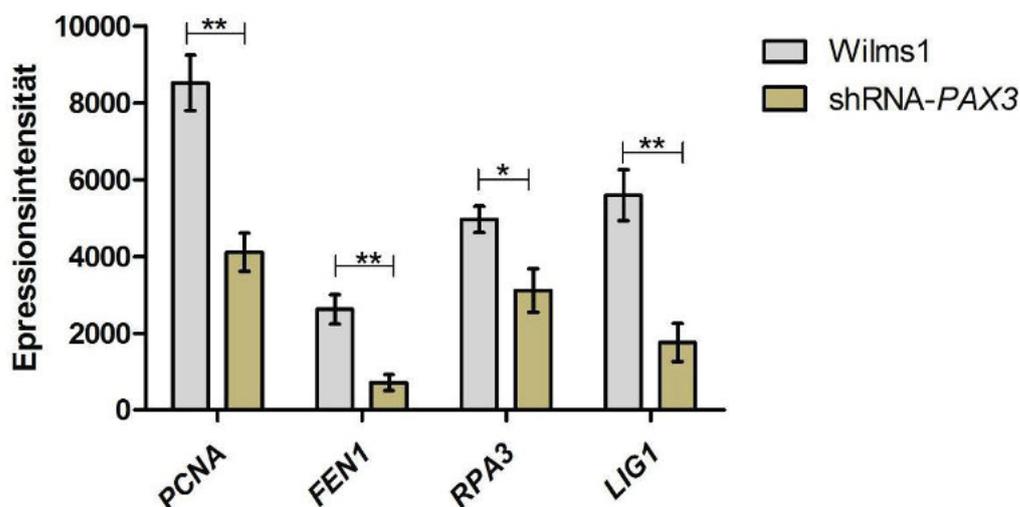


Abb. 4.17: Herunterregulierte Gene nach *PAX3*-Knockdown. Array-basierende Expressionsdaten der Gene *PCNA*, *FEN1*, *RPA3* und *LIG1* in der Wilms1-Zelllinie vor und nach dem *PAX3*-Knockdown. Dabei gilt: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$ (Wilms1: $n = 5$, shPAX: $n = 2$). Fehlerbalken = Standardfehler

Die Auswertung der 3654 hochregulierten Gene/Oligos zeigt, dass die betroffenen Gene ein breites Spektrum an zellulären Signalwegen abdecken. Hervorzuheben sind die *Ubiquitin mediated proteolysis* ($p = 1,7^{-5}$), der *p53-signaling pathway* ($p = 4,5^{-4}$) und der *TGF-beta signaling pathway* ($p = 1,1^{-2}$). Bei dem p53-Signalweg sowie dem TGF-beta-Signalweg sind Gene hochreguliert, welche die Apoptose von Zellen induzieren oder die Zellen im Zellzyklus arretieren lassen (z.B. G1-Arrest im Zellzyklus). Eines der im p53-Signalweg regulierten Gene ist das *CYCS*-Gen. Es kodiert für das Cytochrom-c-Protein, welches neben seiner Aufgabe, der oxidativen Phosphorylierung in den Mitochondrien, auch als Initiator der Apoptose agiert. Hierfür bindet es zuerst an das APAF1-Protein, wodurch die Caspase-9 aktiviert wird. Diese wiederum löst eine Kaskade aus, die zum Zelltod führt (Earnshaw, 1999). Im TGF-beta Signalweg ist unter anderem die Expression von *p15 (CDKN2B)* hochreguliert (Abb. 4.19). Durch seine Bindung an das CDK4B-Protein wird dieses in seiner Funktion inhibiert, sodass das CDK4B abhängige Voranschreiten der G1-Phase gehemmt wird. Es kommt somit zum G1-Arrest in den Wilms1-Zellen, ausgelöst durch den *PAX3*-Knockdown. Die ubiquitin vermittelte Proteolyse zeigt mit einem p -Wert von $1,7^{-5}$ die

höchste Signifikanz. Dieser Mechanismus trägt dazu bei, dass Proteine, die abgebaut werden müssen, zuvor entsprechend mit Ubiquitin markiert werden, um anschließend im Proteasom abgebaut zu werden.

Term	Count	%	P-Value
Ubiquitin mediated proteolysis	38	1.4	1.7E-5
Small cell lung cancer	27	1.0	2.5E-5
p53 signaling pathway	21	0.7	4.5E-4
Endocytosis	40	1.4	2.3E-3
ECM-receptor interaction	22	0.8	3.2E-3
Focal adhesion	42	1.5	3.8E-3
Systemic lupus erythematosus	24	0.9	5.6E-3
Pathways in cancer	61	2.2	7.3E-3
Chronic myeloid leukemia	19	0.7	9.6E-3
TGF-beta signaling pathway	21	0.7	1.1E-2

Abb. 4.18: Die zehn höchst signifikant regulierten KEGG-Signalwege. DAVID-Auswertung der hochregulierten Gene in Wilms1-Zellen nach dem PAX3-Knockdown. Unter *Count* ist die Anzahl der beteiligten Gene angegeben, die in diesem biologischen Prozess reguliert werden. Die Zahlen in Prozent geben an, wie hoch der Anteil der regulierten Gene in der Gesamtzahl ist. Die einzelnen Signalwege sind nach ihren Signifikanzen nach dem p-Wert angeordnet, beginnend mit der höchsten Signifikanz.

Die Markierung der abzubauenen Proteine erfolgt über eine Kaskade von drei Enzymkomplexen, deren Bezeichnung E1, E2 und E3 ist. Der E3-Enzymkomplex wird in weitere fünf Subtypen unterteilt. Jeder einzelne Enzymkomplex/Subtyp setzt sich aus mehreren funktionellen Einheiten zusammen, die von verschiedenen Genen kodiert werden. Die Analyse der hochregulierten Gene zeigt, dass jeder Enzymkomplex/Subtyp nach dem PAX3-Knockdown reguliert wird. In Tabelle 4.1 sind die regulierten Gene und die Enzymkomplexe/Subtypen aufgeführt, denen sie angehören. Die erhöhte Expression der Gene, die dafür verantwortlich sind, dass Proteine abgebaut werden müssen, korreliert mit den Prozessen/Genen, welche die Apoptose initiieren oder die Zellen in der G1-Phase arretieren lassen. In beiden Fällen führen diese Signalwege bzw. Mechanismen dazu, dass vermehrt Proteine vorliegen, die abgebaut werden müssen.

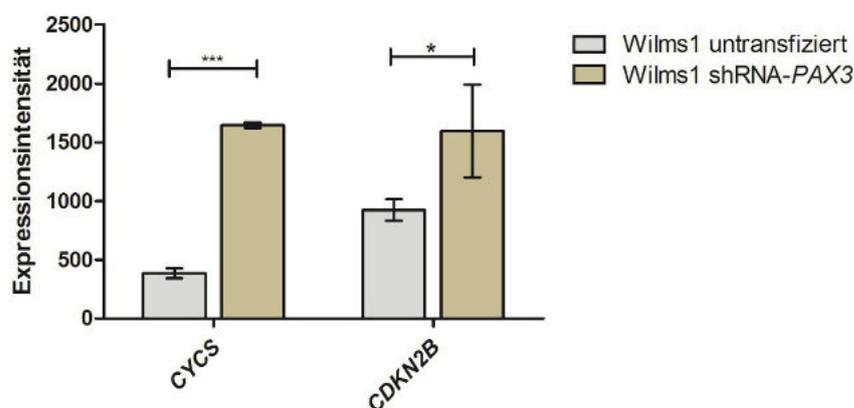


Abb. 4.19: Hochregulierte Gene nach PAX3-Knockdown. Array-basierende Expressionsdaten der Gene *CYCS* und *CDKN2B* in der Wilms1-Zelllinie vor und nach dem PAX3-Knockdown. Dabei gilt: * $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,001$.

Insgesamt initiiert ein *PAX3-Knockdown* in Wilms1-Zellen mehrere Prozesse, die den Metabolismus der Zellen herunterregulieren. Daraus kann man schließen, dass die *PAX3*-Expression für die Aufrechterhaltung der zellulären Integrität und Stabilität verantwortlich ist.

		Wilms1-Zelllinie										PAX3-Knock-Down	
		Unbehandelt											
		Expressionsintensität (One Color Array)											
Gensymbol	Enzymkomplex/Subtyp	Wilms1.1	Wilms1.2	Wilms1.3	Wilms1.4	Wilms1.5	PAX3.1	PAX3.2	Fc.	p-Wert			
APC3	E3-sRF-Subtyp	4051	3846	3455	3738	4258	7156	6339	1,74	0,004			
APC7	E3-sRF-Subtyp	608	499	463	499	648	956	746	1,57	0,025			
CBLB	E3-sRF-Subtyp	879	921	1308	1399	1068	3002	2070	2,27	0,004			
COP1	E3-sRF-Subtyp	2860	2622	3259	3436	2480	3968	5030	1,54	0,028			
CUL4B	E3-mRF-Subtyp	3603	3289	3290	3477	3613	5195	7666	1,83	0,005			
DCAF	E3-mRF-Subtyp	2602	2622	3259	3436	2480	3968	5030	1,54	0,028			
DDB1	E3-mRF-Subtyp	9354	7892	9411	9721	10266	21234	15987	1,98	0,002			
EGAP	E3-HECT-Subtyp	978	842	955	982	1114	2313	3142	2,78	0,012			
ELOC	E3-mRF-Subtyp	1481	1048	950	974	1625	2244	2347	1,94	0,018			
F-BOX	E3-mRF-Subtyp	8650	6793	11489	11916	8951	18982	15214	1,81	0,011			
HERC1	E3-HECT-Suptyp	1676	1094	1936	2080	1710	2828	4431	2,15	0,011			
HERC2	E3-HECT-Suptyp	474	635	402	332	386	771	644	1,62	0,045			
HERC4	E3-HECT-Suptyp	4275	3037	2678	2854	5918	5054	11192	2,1	0,042			
HIP2	E3-sRF-Subtyp	2017	1817	1772	1838	2331	3283	2926	1,59	0,012			
IAP2	E3-sRF-Subtyp	2432	2012	2330	2492	3161	6214	7280	2,73	0,012			
MDM2	E3-sRF-Subtyp	1114	892	940	944	1248	2268	2823	2,48	0,001			
MID1	E3-sRF-Subtyp	406	395	469	497	239	799	753	1,99	0,016			
NEED4	E3-HECT-Suptyp	1033	790	1686	1795	1530	7205	7919	5,79	0,016			
RBX2	E3-mRF-Subtyp	28892	27109	29052	29639	36006	37252	62913	1,61	0,032			
SKP1	E3-mRF-Subtyp	2815	2360	2150	2456	2624	8900	5323	2,79	0,001			
SMURF2	E3-HECT-Suptyp	483	341	526	547	1020	5408	3130	7,54	0,001			
TRAF6	E3-sRF-Subtyp	370	364	355	349	383	1350	1313	3,66	0,012			
TRIM32	E3-sRF-Subtyp	1091	825	793	773	1221	2020	1489	1,88	0,021			
TRIP12	E3-HECT-Suptyp	545	420	470	479	692	763	981	1,69	0,021			
UBE1	E1	5205	5822	6925	6738	6512	12867	7881	1,62	0,029			
UBE2A	E2	9500	9659	10190	9530	9982	17902	18133	1,84	0,001			
UBE2B	E2	959	701	626	634	883	1090	2890	2,29	0,016			
UBE2D_E	E2	2494	2242	2878	2928	2863	5172	3355	1,56	0,033			
UBE2H	E2	2221	2285	2631	2666	3030	4576	6440	2,13	0,002			
UBE2I	E2	2445	1597	2198	2455	2464	4825	4654	2,15	0,002			
UBE2J	E2	1319	1179	1313	1383	1924	1942	2865	1,68	0,027			
UBE2N	E2	818	647	682	707	1170	1393	1392	1,77	0,02			
UBE2W	E2	257	240	275	249	339	1620	715	3,99	0,001			
UBE4A	E3-U-Box-Subtyp	5214	4453	5152	5379	5199	6709	10195	1,63	0,017			
UBE4B	E3-U-Box-Subtyp	2438	1902	2214	2382	2007	3540	3876	1,7	0,006			
VHL-BOX	E3-mRF-Subtyp	283	183	271	231	311	772	360	2,1	0,019			

Tab. 4.1: One-Color Microarray Expressionsdaten der primären Wilms1-Zelllinie und nach PAX3-Knockdown. Angegeben sind die Expressionsintensitäten der regulierten Gene während der Ubiquitin vermittelten Proteolyse nach dem PAX3-Knockdown. Insgesamt werden fünf Arrays der unbehandelten Wilms1-Zelllinie herangezogen und zwei mit PAX3-Knockdown. E1 = Ubiquitin-Aktivierungs-Enzym, E2= Ubiquitin-Konjugierungs-Enzym, E3= Ubiquitin-Ligase, sRF= single Ring-finger, mRF= multi Ring-finger, Fc= Foldchange, p-Wert (Value): *ps 0,05, **ps 0,001, ***ps 0,0001.

4.4 Etablierung von immortalisierten Wilms-Tumor-Zelllinien und deren Analyse

Zusätzlich zum bestehenden primären Zellkulturmodell von Wilms-Tumoren, welche eine limitierte Teilungsrate (Lebensspanne) aufweisen, soll ein Zellkultursystem von immortalisierten Wilms-Tumor-Zellen etabliert werden. Dadurch sollen Experimente ermöglicht werden, die über einen längeren Zeitraum stattfinden müssen oder bei denen größere Proteinmengen erforderlich sind. Dazu werden die Wilms-Tumor-Zelllinien Wilms1, Wilms6 und Wilms10-T mit der humanen Telomerase (*hTERT*) und mit dem großen T-Antigen vom *Simian Virus 40* immortalisiert. Bei dem großen T-Antigen handelt es sich um die modifizierte Variante U19 Δ 89-97tsA580, die von Parmjit S. Jat (Institut für Neurologie, Universität London) bereitgestellt wird und drei wesentliche Veränderungen enthält (Abb. 4.20). Zum einen verhindern drei Mutationen in diesem Gen die Bindung an die DNA (U19), zum anderen wird die Interaktion mit BUB1 (Δ 89-97) gehemmt. Dadurch werden unerwünschte regulatorische Interaktionen in der Zelle minimiert (Cotsiki et al., 2004). Bei 37° bewirkt die letzte Modulation eine Konformationsveränderung des großen T-Antigen-Proteins, die dazu führt, dass es bei dieser Temperatur inaktiv wird. Bei einer Umgebungstemperatur von 33°C ist dieses temperatursensitive Protein aktiv.



Abb. 4.20: Ausschnitt des modifizierten lentiviralen Vektors. LTR: Long terminal repeat pRB: Retinoblastom-Protein. SV40 ori: Simian Virus 40 Replikationsursprung. Neo: Neomycin. U19 Δ 89-97tsA58: Kassetten für das große SV 40 T-Antigen mit drei eingebauten Mutationen.

In Abbildung 4.21 ist zu erkennen, dass die Immortalisierung der Zellen erfolgreich war. Alle drei Zelllinien zeigen eine deutlich gesteigerte Lebensspanne gegenüber den Ursprungszelllinien (primäre Wilmszelllinien). Die Kultivierung des immortalisierten Klon 31 von Wilms1 ist bis zu Passage 68 möglich. Der Klon 10 von Wilms6 lässt sich mindestens bis Passage 57 kultivieren. Ebenso zeigt Klon 1 von Wilms10-T eine erhöhte Passagenanzahl und lässt sich bis wenigstens Passage 20 kultivieren. Alle drei primären Wilms-Tumor-Zelllinien (Wilms1, 6 und 10-T) variieren zwar in ihrer maximalen Anzahl an Passagen, aber keine von ihnen lässt sich länger als bis zu Passage 20 kultivieren. Entweder erreichen sie vorher einen Zustand der Seneszenz und teilen sich nicht weiter oder sie gehen in die Apoptose über.

Beispielhaft wird an Klon 1 von Wilms10-T der Ablauf der Kultivierung eines Einzelklons dargestellt (untere Reihe in Abb. 4.21), ausgehend von einer einzelnen Zelle bis zur Bildung

einer Kolonie und deren weiteren Kultivierung unter Selektionsbedingungen. Alle immortalisierten Klone werden im Laufe der Arbeit weiter kultiviert, sodass ihre maximal mögliche Passagenzahl/Teilungsrate noch ermittelt werden muss.

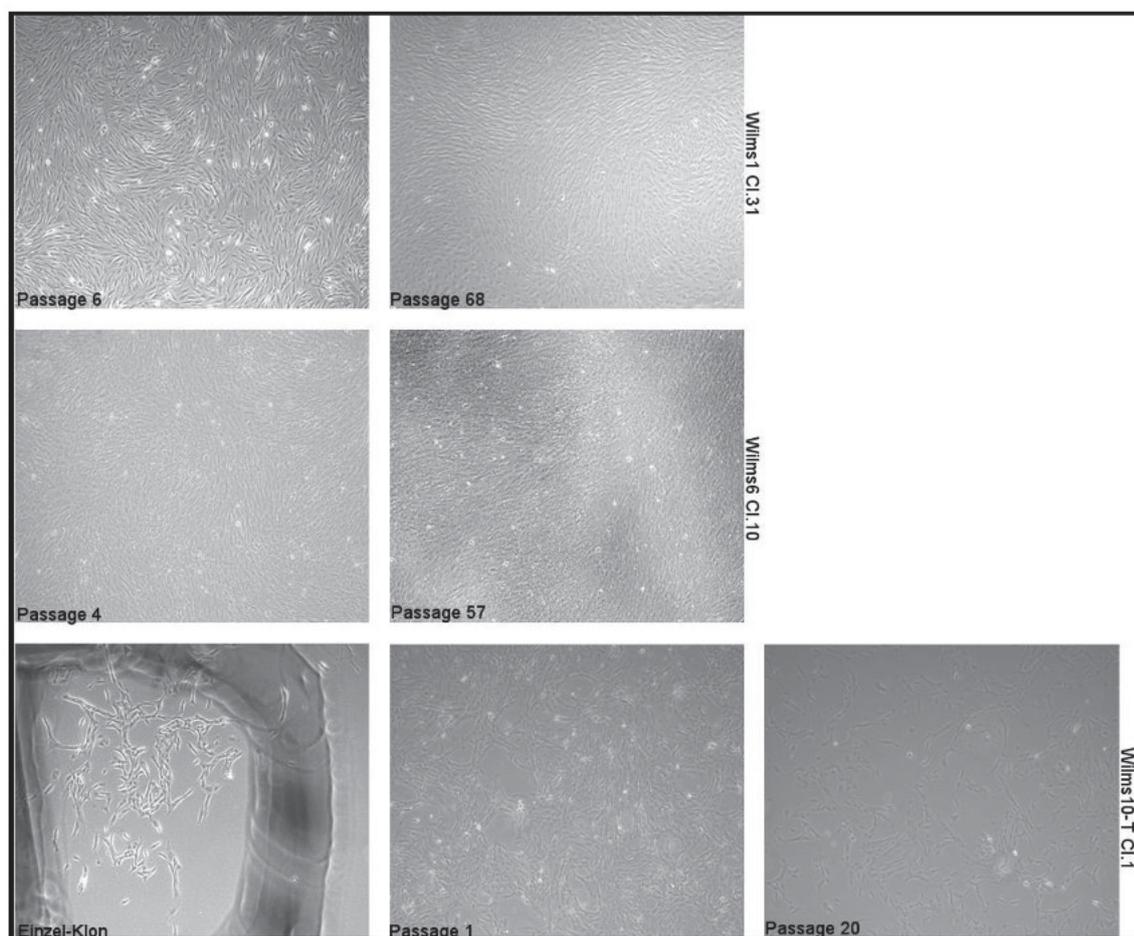


Abb. 4.21: Zellkultur der erfolgreich immortalisierten Wilms-Tumor-Zelllinien. Dargestellt sind verschiedene Passagen ausgewählter Einzelklone, die über einen längeren Zeitraum kultiviert werden.

Karyogramm und Mutationsanalyse

Durch eine Chromosomenanalyse soll ermittelt werden, ob die Immortalisierung einen Einfluss auf den Karyotyp bzw. chromosomale Veränderungen hat, da bereits bekannt ist, dass das normale T-Antigen zur chromosomalen Instabilität in Zellen führt (Barbanti-Brodano et al., 2006). Zusätzlich wird mit Hilfe einer Mutationsanalyse die Identität der immortalisierten Zelllinien verifiziert. Beide Untersuchungen werden exemplarisch an der immortalisierten Wilms1 Cl.31-Zelllinie durchgeführt und nachfolgend erklärt. Die zytogenetische Untersuchung erfolgt im hiesigen Institut (Abteilung für Tumorzytogenetik Düsseldorf).

Die Chromosomenanalyse der Wilms1-Cl.31-Zelllinie bei Passage 26 ergibt einen unauffälligen diploiden weiblichen Chromosomensatz (46, XX) und es können keine Aberrationen in Form von Duplikationen, Deletionen oder Translokationen nachgewiesen werden (Abb.

4.22 A). Somit hat die Immortalisierung keinen Einfluss auf die Integrität der Chromosomen, die zytogenetisch detektierbar ist. Anhand einer Sequenzierung kann die Mutation im *WT1*- und *CTNNB1*-Gen nachgewiesen und gleichzeitig die Identität der Wilms1 Cl.31-Zelllinie verifiziert werden. Sequenziert wird die Passage 29 der immortalisierten Wilms1-Zelllinie, d.h. die homozygote Mutation im Exon1 des *WT1*-Gens auf Position c.149 liegt immer noch vor.

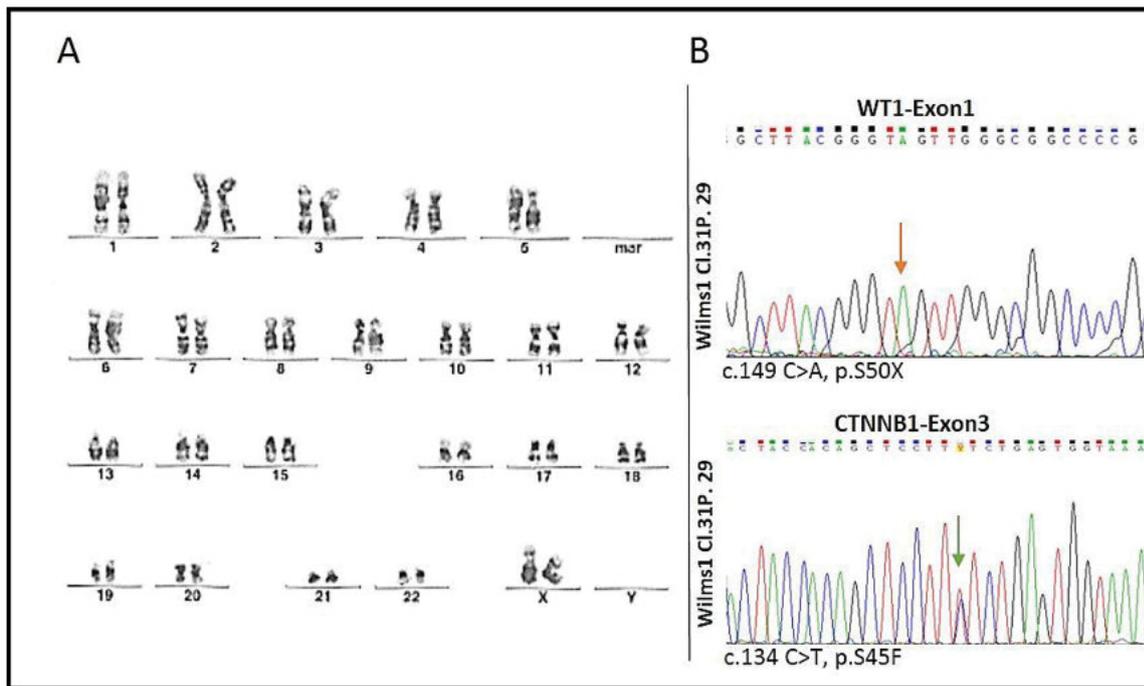


Abb. 4.22: Karyogramm und Chromatogramm von Wilms1 Cl.31. **A:** Karyogramm der immortalisierten Wilms1 Cl.31-Zelllinie von Passage 26. Dargestellt ist ein diploider Chromosomensatz 46,XX ohne auffällige zytogenetische Aberrationen. **B:** Mutationsanalyse der Gene *WT1*-Exon1 und *CTNNB1*-Exon3 der Wilms1 Cl.31 Zelllinie. Im Exon1 des *WT1*-Gens wird die homozygote Mutation c.149 C>A, p.S50X vorgefunden und im Exon3 des *CTNNB1*-Gens die heterozygote Mutation c.134 C>T, p.S45F.

Des Weiteren konnte auch die heterozygote Mutation im Exon3 des *CTNNB1*-Gens auf Position c.134 nachgewiesen werden (Abb. 4.22 B). Durch vorangegangene Mutationsuntersuchungen sind die identischen genetischen Veränderungen in der primären Wilms1-Tumorzelllinie detektiert worden, somit stammt die immortalisierte Wilms1 Cl.31-Zelllinie von der primären Wilms-Tumorzelllinie ab.

Nachweis des großen SV40-T-Antigens und hTERT in Wilms1 Cl.31-Zellen

Der Nachweis, dass die immortalisierte Wilms1 Cl.31-Zelllinie das große SV40 T-Antigen exprimiert, wird von Sarah Tenbusch im Zuge ihrer Masterarbeit mittels Western-Blot Analyse erbracht (Genetische Heterogenität von Wilms-Tumoren und deren etablierten Zelllinien, 2015). Der Beweis, dass die Wilms1 Cl.31-Zellen die Telomerase (*hTERT*) exprimieren, erfolgt über eine RT-PCR. Dabei wird aus den Zellen die RNA isoliert und in cDNA

umgeschrieben (3.9.5). Anschließend wird eine RT-PCR durchgeführt, mit deren Hilfe ein 540 Bp großes Fragment amplifiziert wird (Abb. 4.23). Als Negativkontrolle fungiert die RNA aus der primären Wilms1-Zelllinie, die ebenfalls in cDNA umgeschrieben wird. Bei der verwendeten Positivkontrolle handelt es sich um den pGRN145-Vektor (ATCC), der die kodierende Sequenz für *hTERT* enthält.

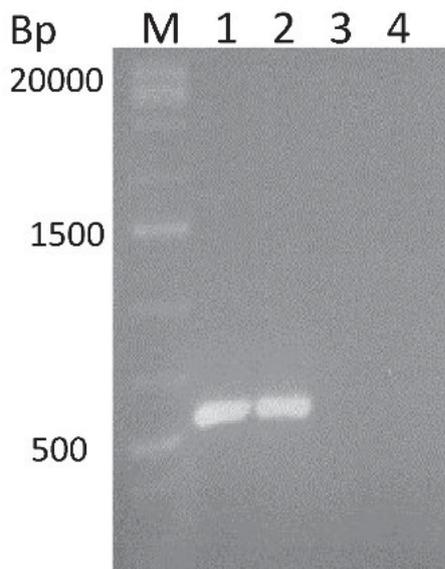


Abb. 4.23: Ein einprozentiges analytisches Agarosegel. RT-PCR für das *hTERT*-Gen. Primer werden so konzipiert, dass nach einer erfolgreichen PCR ein 540 Bp großes Fragment entsteht. M= DNA-Leiter als Größenstandard. 1= Wilms1 Cl.31 P36. 2= pGRN145-Vektor der für *hTERT* kodiert (Positivkontrolle). 3= Wilms1-Zelllinie (Negativkontrolle). 4= H₂O.

Die Primer zum Nachweis von *hTERT* sind so entworfen, dass nach einer erfolgreichen RT-PCR ein 540 Bp großes Fragment entstehen soll. Mit der anschließenden RT-PCR kann verifiziert werden, dass die Wilms1-Cl.31-Zelllinie im Vergleich zur nicht immortalisierten primären Wilms1-Zelllinie *hTERT*-RNA exprimiert (Abb. 4.23 Spur 1). Die Positivkontrolle veranschaulicht (Abb. 4.23 Spur 2), dass es sich beim Amplifikat in Spur 1 um ein Fragment der gleichen Größe handelt wie in Spur 2 und somit einen amplifizierten Abschnitt von *hTERT* darstellt.

4.4.1 Etablierung und Charakterisierung immortalisierter Wilms-Tumorzellen

Um festzustellen, ob die immortalisierten Wilms-Tumorzelllinien ein adäquater Ersatz für die primären Wilms-Tumor-Zelllinien darstellen, wird *in vitro* ihr Differenzierungspotential untersucht. Dazu werden die immortalisierten Wilms-Tumorzelllinien zu Adipozyten, Osteoblasten und Muskelzellen differenziert und mit primären (nicht immortalisierten) WT-Zelllinien verglichen. Im Zentrum dieser Arbeit steht die Untersuchung der immortalisierten Wilms1 Cl.31-Zelllinie.

Osteozytendifferenzierung

Die beiden immortalisierten Klone 31 (Wilms1) und 10 (Wilms6) werden auf ihr Potenzial zu Osteozyten zu differenzieren getestet. Als Positivkontrolle fungieren die hMSC-Zellen, die unter geeigneten Kultivierungsbedingungen zu Osteozyten differenzieren (Jaiswal et al., 2000). Neben den hMSC-Zellen wird auch ein immortalisierter Klon dieser Zelllinie auf sein Potenzial zur Osteozytendifferenzierung hin untersucht, um zu klären, ob die immortalisierten hMSC-Zellen ebenfalls zu Osteozyten differenzieren können. Die immortalisierte hMSC-Zelllinie (hMSC Telo/SV40) wird im Zuge der Masterarbeit von Nicole Görtz immortalisiert (Immortalisierung und Charakterisierung von Wilms Tumorzelllinien und humanen mesenchymalen Stammzellen, 2014), aber nicht auf ihr Differenzierungspotential hin untersucht. Zunächst werden alle Zelllinien im MSCG-Medium bei 37°C und 5% CO₂-Begasung kultiviert. Unter diesen Kulturbedingungen ist das temperatursensitive T-Antigen inaktiv bzw. partiell inaktiv.

Die Differenzierung der Zellen wird durch den Wechsel des MSCG-Mediums zum Osteozyten-Induktionsmedium (Lonza) eingeleitet. Die Versuchsdauer beträgt drei Wochen. In diesem Zeitraum wird das Induktionsmedium alle drei bis vier Tage gewechselt. Parallel zu den induzierten Zellen wird von jeder Zelllinie über den gesamten Zeitraum eine entsprechende Probe nur im MSCG-Medium kultiviert. Für den Nachweis der Osteozytendifferenzierung werden die Zellen nach Beendigung des Versuchs mit Alizarin Red S gefärbt oder es erfolgt eine Calcium-Messung der Zellsuspension (Abb. 4.24).

Morphologische Veränderungen sowie Calciumablagerungen können nach Ablauf der drei Wochen bei den induzierten hMSC- und den immortalisierten hMSC Telo/SV40 Zelllinien beobachtet werden. Die Anzahl der Zellen, die diese Veränderungen aufzeigt, variiert sehr stark in Abhängigkeit von der untersuchten Zelllinie. Bei den induzierten immortalisierten Wilms-Tumor-Klonen sind nur vereinzelte Zellen mit dementsprechenden Veränderungen zu beobachten. Nach der Färbung mit Alizarin Red S, welches mit Calcium einen Komplex bildet, wird das in den Zellen enthaltene Calcium durch eine rote Färbung sichtbar. Sowohl die hMSC-Zellen als auch die immortalisierten hMSC-Telo/SV40-Zellen zeigen nach der Färbung deutliche Calciumeinlagerungen auf. Allerdings weisen die immortalisierten hMSC-Telo/SV40-Zellen eine geringere Menge an Zellen auf, die Calcium gebildet haben (Abb. 4.24). In den immortalisierten Zelllinien von Wilms1 und Wilms6 sind nach der Färbung keine sichtbaren Spuren von Calciumablagerungen erkennbar

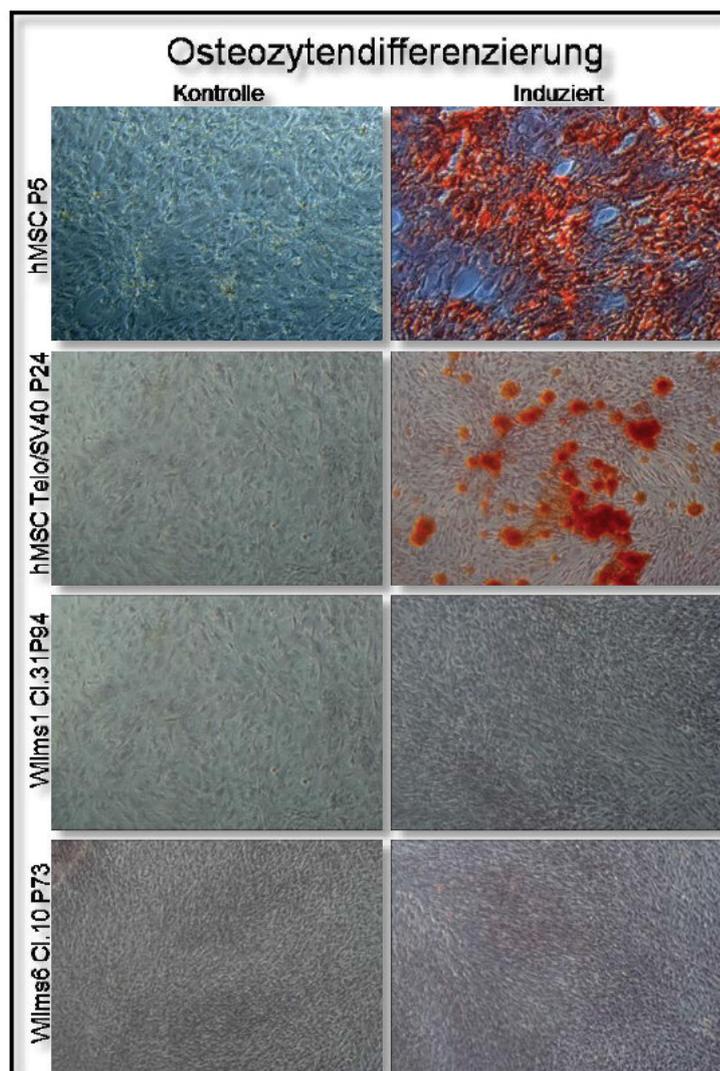


Abb. 4.24: Osteozytendifferenzierung. Immortalisierte Wilms-Tumorzelllinien und primäre Wilms-Tumor-Zelllinie mit entsprechenden Kontrollen nach der Osteozytendifferenzierung und Färbung mit Alizarin Red S (20-fache Vergrößerung).

Die Konzentrationsbestimmung von Calcium

Für die quantitative Calciummessung wird zeitgleich ein weiterer Versuchsansatz unter den gleichen Bedingungen mitgeführt. Die Bestimmung der Calciumkonzentration erfolgt aus der Zellsuspension bei allen Proben photometrisch. Der ermittelte Calciumwert der induzierten hMSC-Zellen wird gleich 100% gesetzt. Die übrigen Proben werden entsprechend ihrer Calciumkonzentration in Prozent angeglichen. Die immortalisierten hMSC Telo/SV40-Zellen erreichen nach der Induktion einen Calciumwert von 2,24 mg/dL, dies entspricht 36% der Calciummenge der nicht immortalisierten hMSC-Zellen. Wie bereits publiziert, besitzt die Wilms1-Zelllinie ein geringes Potenzial zu Osteozyten zu differenzieren (Royer-Pokora et al., 2010). Der prozentuale Wert der Calciumkonzentration der Wilms1-Zelllinie wird übernommen und in die entsprechende Calciumkonzentration umgerechnet (Abb. 4.25). Die immortalisierte Wilms1-Zelllinie zeigt im Vergleich zur nicht immortalisierten Wilms1-Zelllinie

(5.4%) mit knapp 1,1% nur eine geringere Calciumkonzentration. Auch die immortalisierte Wilms6-Zelllinie weist mit 0,9% ein eher limitiertes Potenzial zur Osteozytendifferenzierung auf (Abb. 4.25).

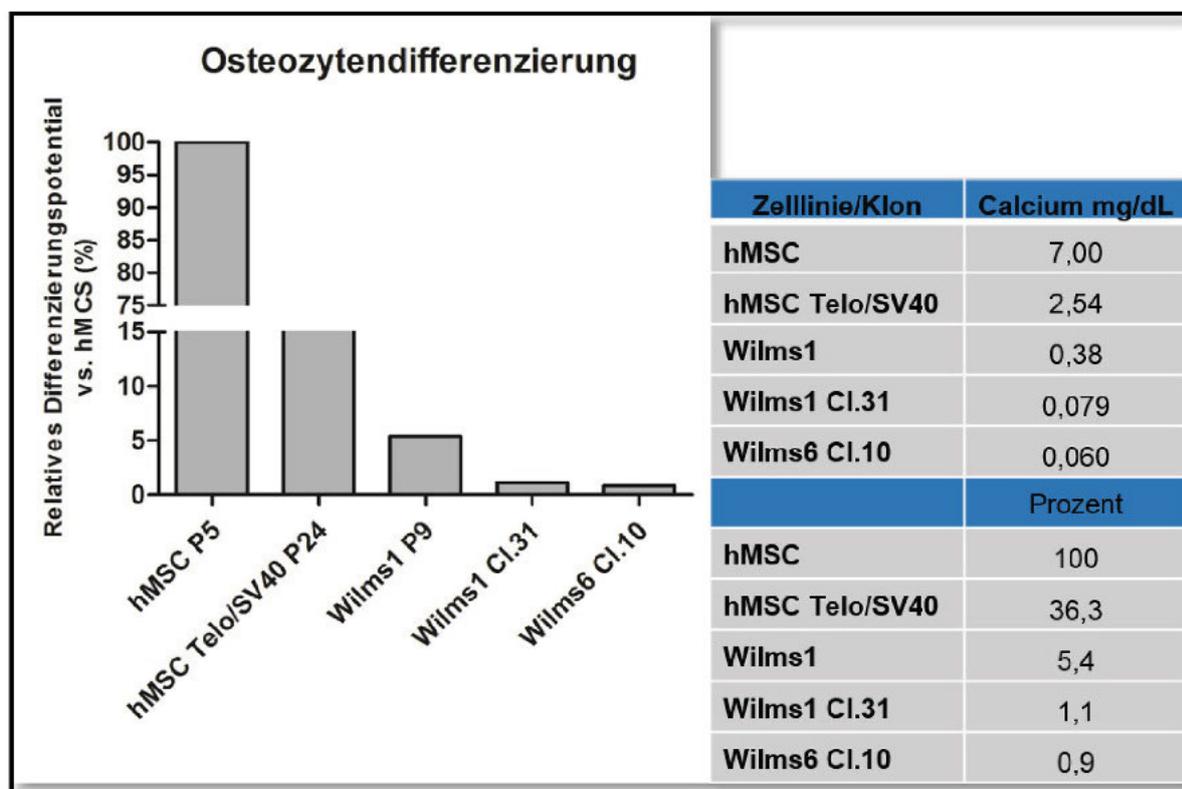


Abb. 4.25: Relative Calcium-Messwerte nach der Osteoblastendifferenzierung. Die Tabelle rechts zeigt die gemessenen Calciumwerte in mg/dL nach der Induktion der Differenzierung zu Osteozyten. Der Calciumwert von den hMSC-Zellen (Positivkontrolle) wird gleich 100% gesetzt, die restlichen Werte werden relativ dazu angepasst.

Adipozytendifferenzierung

Um zu ermitteln, ob die immortalisierten Wilms-Tumorzelllinien Wilms1 Cl.31 und Wilms6 Cl.10 das Potenzial haben, zu Adipozyten zu differenzieren, werden diese zusammen mit den hMSC-Zellen (Positivkontrolle) zur Differenzierung angeregt. Durch die Zugabe von Dexamethason, Insulin und Isobutylxanthin werden die Zelllinien in einem Zeitraum von 22 Tagen zur Differenzierung stimuliert (siehe 3.4.1). Simultan dazu wird über den gleichen Zeitraum ein Kontrollansatz im Grundmedium kultiviert. Die Ansätze, bei denen die Differenzierung induziert wird, werden abwechselnd in drei Zyklen im Induktionsmedium und im Grundmedium kultiviert. Nach Abschluss der Differenzierung werden die Zellen mit 10%

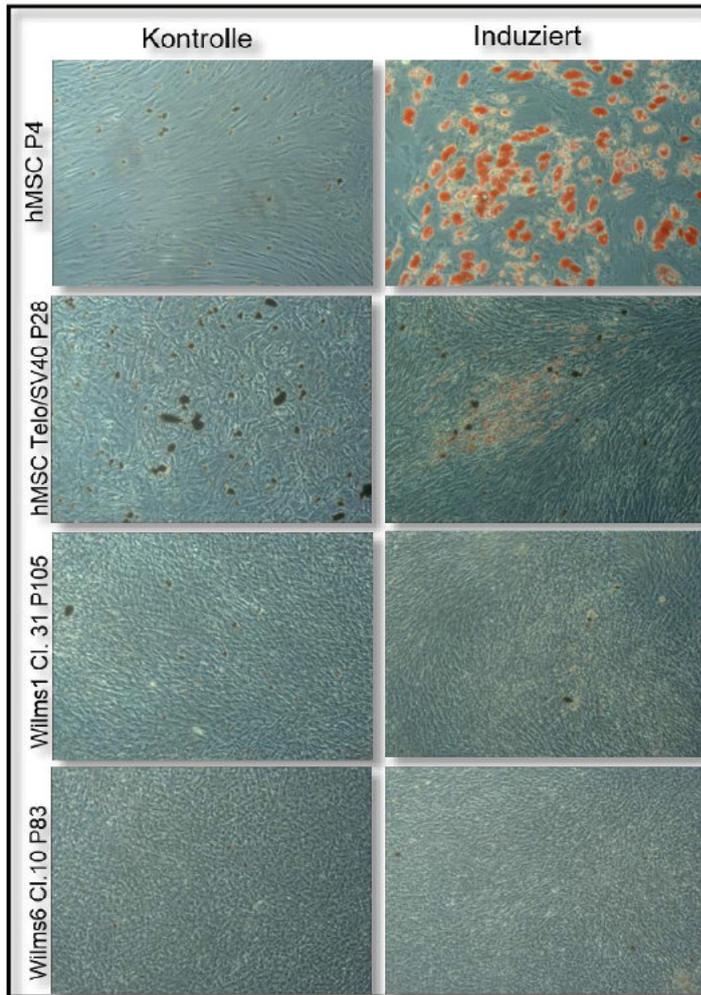


Abb. 4.26: Adipozytenfärbung mit Oil Red O. Die Kontrollzellen sowie die induzierten Zellen werden zum Nachweis der Adipozytendifferenzierung mit *Oil Red O* gefärbt.

Formalin fixiert, dann mit *Oil Red O* gefärbt, um Adipozyten nachweisen zu können. *Oil Red O* lagert sich in den Fettvakuolen einer Zelle ab und macht diese dadurch sichtbar. Neben den immortalisierten Wilms-Tumorzelllinien wird auch die immortalisierte hMSC Telo/SV40 Zelllinie auf ihr Potential zur Adipozytendifferenzierung untersucht. Bereits vor der Färbung mit *Oil Red O* können Veränderungen in den nicht immortalisierten sowie immortalisierten hMSC-Zellen beobachtet werden, die sich in vermehrter Form von Fettvakuolen-Bildungen äußern.

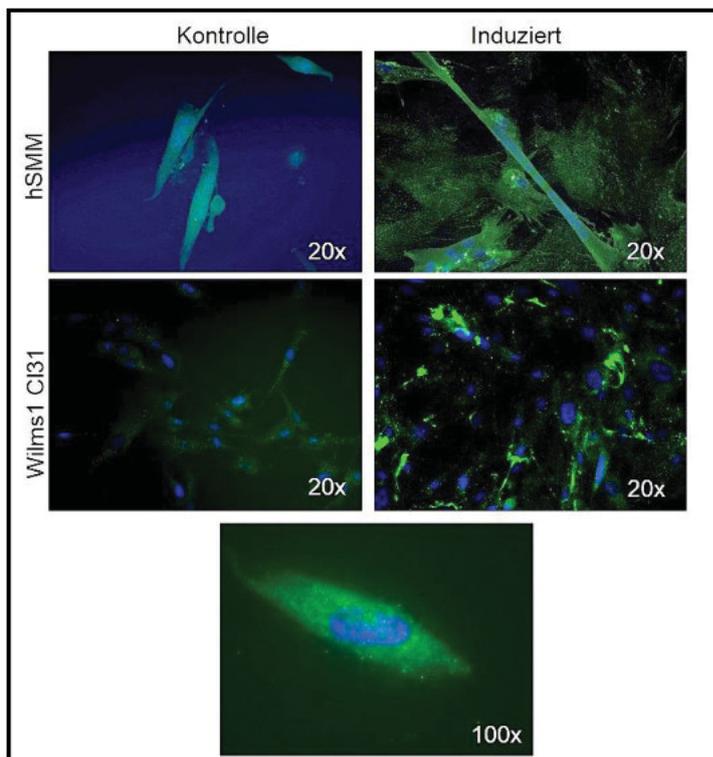
Nach der Färbung bestätigt sich diese Beobachtung. Im Fall der hMSC-Zelllinie ist die Differenzierung zu Adipozyten erfolgreich gewesen. Die immortalisierte hMSC-Zelllinie zeigt im Vergleich dazu nur ein geringes Potenzial zu Adipozytendifferenzierung auf, was an der geringeren Anzahl der positiv gefärbten Zellen zu erkennen ist (Abb. 4.26). Die beiden immortalisierten Wilms-Tumorzelllinien Wilms1 Cl.31 und Wilms6 Cl.10 weisen keine strukturellen Veränderungen auf und die Färbung dieser Zellen fällt negativ aus (Abb. 4.26). Der immortalisierte Klon 31 der Wilms1-Zelllinie besitzt nicht das Potenzial, zu Adipozyten zu differenzieren und bestätigt damit die publizierten Ergebnisse der ursprünglichen Wilms1-Zelllinie, die ebenfalls über kein Potenzial zur Adipozytendifferenzierung verfügt (Royer-Pokora et al., 2010). Somit ist festzuhalten, dass sich weder die ursprüngliche noch die immortalisierte Wilms1-Zelllinie zu Adipozyten differenzieren lassen.

Die beiden immortalisierten Wilms-Tumorzelllinien Wilms1 Cl.31 und Wilms6 Cl.10 weisen keine strukturellen Veränderungen auf und die Färbung dieser Zellen fällt negativ aus (Abb. 4.26). Der immortalisierte Klon 31 der Wilms1-Zelllinie besitzt nicht das Potenzial, zu Adipozyten zu differenzieren und bestätigt damit die publizierten Ergebnisse der ursprünglichen Wilms1-Zelllinie, die ebenfalls über kein Potenzial zur Adipozytendifferenzierung verfügt (Royer-Pokora et al., 2010). Somit ist festzuhalten, dass sich weder die ursprüngliche noch die immortalisierte Wilms1-Zelllinie zu Adipozyten differenzieren lassen.

Muskeldifferenzierung

Zur Bestimmung, ob die immortalisierte Wilms1 Cl.31-Zelllinie auch das gleiche Potential zur Muskeldifferenzierung wie die ursprüngliche Wilms1-Zelllinie besitzt, werden diese zusammen mit der Positivkontrolle, den hSMM-Zellen (human Skeletal Muscle Myoblasts) zur Differenzierung stimuliert. Die eingeschränkte Fähigkeit der primären Wilms1-Zelllinie zu Muskelzellen zu differenzieren, wird 2010 von Royer-Pokora beschrieben. Bei den hSMM-Zellen handelt es sich um spindelförmige Vorläuferzellen der Skelettmuskelfasern, die im Induktionsmedium binnen einer Woche zu multinukleären Myotuben differenzieren. Die Muskeldifferenzierung wird im Serum reduzierte Medium (2% Pferdeserum) über einen Zeitraum von einer Woche initiiert. Nach der Differenzierungsphase werden die Zellen auf Objektträgern fixiert und die immunologische Auswertung der Muskeldifferenzierung erfolgt mit einem Antikörper (AK) gegen Titin. Das Muskelprotein Titin ist ein Bestandteil des Sarkomers und seine Expression findet während der frühen Phase der Muskeldifferenzierung statt (Van der Loop, et al., 1996). Für eine bessere Erkennung multinukleärer Zellen werden diese mit DAPI gefärbt. Bereits vor der DAPI-Färbung lassen sich lichtmikroskopisch mehrere Zellkerne in einer Zelle der hSMM-Zelllinie erkennen.

Die Induktion der hSMM-Zellen ist erfolgreich gewesen, weil sowohl das Titin-Protein als auch multinukleäre Zellen nachgewiesen werden können. Ebenso kann bei den immortalisierten Wilms1-Cl.31-Zellen das Titin-Protein detektiert werden (Abb. 4.27). Hingegen sind



in den immortalisierten Zellen keine multinukleären Kerne vorzufinden. Die vergrößerte Darstellung einer erfolgreich induzierten Wilms1-Cl.31-Zelle zeigt eine gleichmäßige Verteilung des Titin-Proteins. Es wird aber nicht die gleiche feine, filamentäre Anordnung wie in den induzierten hSMM-Zellen erreicht (Abb. 4.27).

Abb. 4.27: Nachweis der Muskeldifferenzierung anhand einer Titin-Immunfluoreszenzfärbung. Induziert werden die immortalisierte Wilms1-Cl.31-Zelllinie und die hSMM-Zellen. Grün: Titin; Blau: Färbung der Zellkerne mit DAPI.

Aktivität des kanonischen Wnt-Signalwegs

WT1-assoziierte Wilms-Tumore sind oft zusätzlich mit Mutationen im β -*Catenin*-Gen (*CTNNB1*) verbunden. Diese führen dazu, dass der kanonische Wnt-Signalweg konstitutiv aktiv bleibt (Royer Pokora et al., 2008; Ruteshouser et al., 2008). Durch die Mutation im β -*Catenin*-Gen wird das synthetisierte Protein nicht mehr phosphoryliert. Dadurch kommt es zu seiner Stabilisierung und Akkumulation in der Zelle. Durch die anschließende Translokation in den Zellkern und seine Bindung an den Transkriptionsfaktor TCF/LEF kommt es zur Aktivierung von Zielgenen des Wnt-Signalwegs (Hurlstone und Clevers, 2002).

Die primäre Wilms1-Zelllinie trägt eine Mutation und einen konstitutiven aktiven Signalweg (Royer-Pokora et al., 2010). Es soll nun überprüft werden, ob die immortalisierte Wilms1-CI.31-Zelllinie einen ebenso aktiven Wnt-Signalweg besitzt. Dazu wird eine Luciferase-Reporteranalyse durchgeführt. Hierbei werden die TOP/FOPFlash-Reporterplasmide der Firma Addgene verwendet. Das M50-TOPflash Plasmid enthält sieben aufeinanderfolgende wildtypische TCF/LEF-Bindungsmotive. Bei dem M51-FOPflash-Plasmid liegen diese Bindungsstellen mutiert vor. Die Aktivität der Luciferase wird mittels eines Lumino-meters detektiert (siehe 3.6). Die Transfektion der Kontrollvektoren pGL3-Promotor (Positivkontrollvektor) und pGL3-Basic (Negativkontrollvektor) werden als Vergleich für die *firefly*-Luciferaseaktivität in den untersuchten Zellen herangezogen. Des Weiteren wird als interne Transfektionskontrolle bei jedem Ansatz der pGL4.75-Vektor kotransfiziert (*renilla*-Luciferaseaktivität). Die Messung dieser Lumineszenz erfolgt über einen separaten zweiten Ansatz.

In Abbildung 4.23 A ist die relative Luciferase-Aktivität (RLA) der einzelnen Proben gezeigt. Hierbei handelt es sich um den Quotienten, der aus Firefly- und Renilla-Messwerten gebildet wird. Anschließend wird in Abbildung 4.28 B das TOP/FOP-Verhältnis bei Wilms1 P7 und Wilms1-CI.31 dargestellt. Ein aktiver Wnt-Signalweg liegt sowohl bei der primären Wilms1 als auch bei deren immortalisierter Wilms1-CI. 31-Zelllinie vor (Abb. 4.28). Die Luciferase-Aktivität von Wilms1 P7 für TOP zeigt zu der entsprechenden FOP-Referenz eine höhere Luciferase-Aktivität mit einer Signifikanz von $p \leq 0,05$. Die immortalisierte Wilms1-CI.31-Zelllinie zeigt eine signifikant höhere Luciferase-Aktivität als die herangezogene FOP-Kontrolle ($p \leq 0,01$).

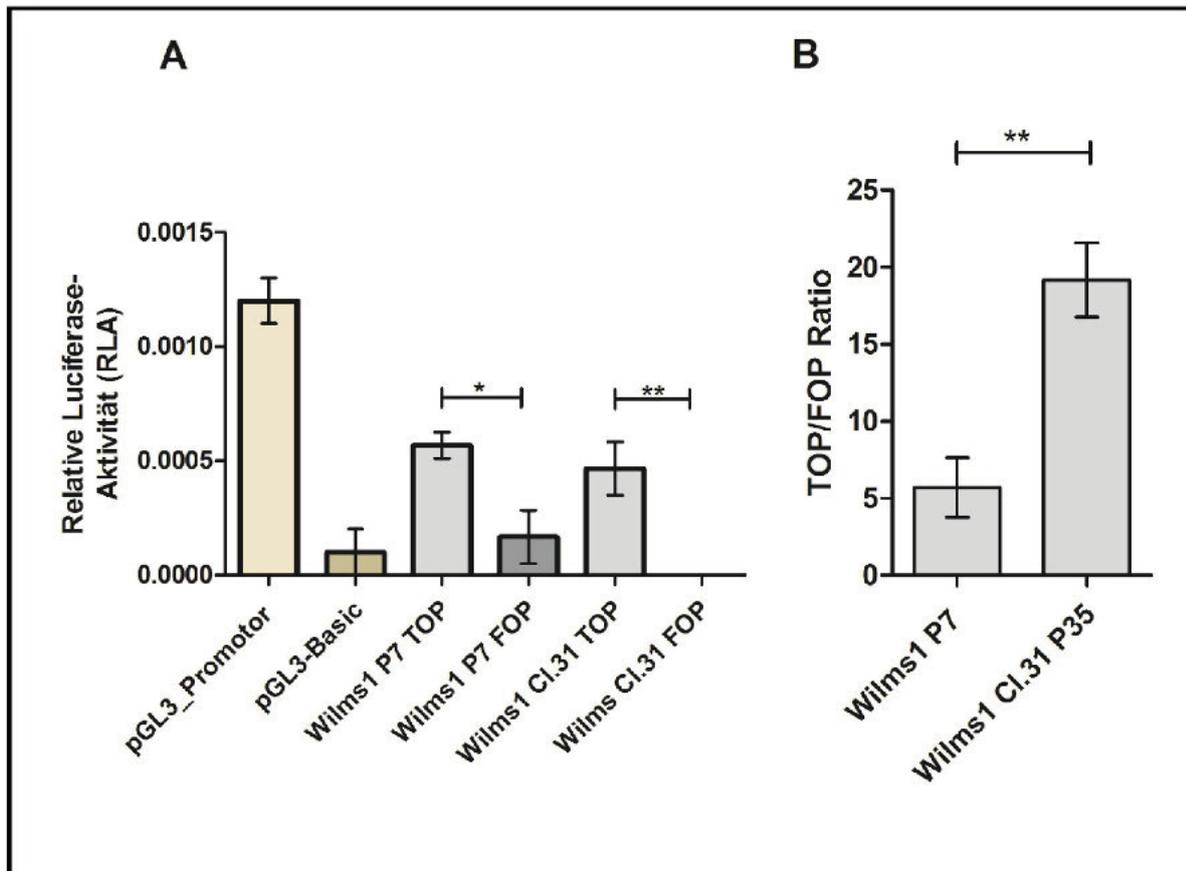


Abb. 4.28: Wnt-Signalaktivität. Die Aktivität des Wnt-Signalwegs erfolgt über die Messung der TCF/LEF-Luciferasereporterkonstrukts. **A:** Angegeben ist der Quotient aus den gemessenen Firefly- und Renilla-Werten. Als Positivkontrolle dient der pGL3-Promotor-Plasmid, als Negativkontrolle der pGL3-Basic-Plasmid. **B:** Angabe vom TOP/FOP-Verhältnis von Wilms1 P7 und Wilms1 Cl. 31 P35. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$.

Die Darstellung des TOP/FOP-Verhältnisses (Abb. 4.23 B) veranschaulicht deutlich, dass die TOP-Luciferase-Aktivität in der immortalisierten Wilms1 Cl.31-Zelllinie höher ist, als in der ursprünglichen Wilms1-Zelllinie und diese somit über einen stärker aktiven Wnt-Signalweg verfügt. Festzuhalten ist, dass beide Zelllinien einen aktiven Wnt-Signalweg besitzen und dass die Immortalisierung eine Verstärkung des Wnt-Signalwegs bewirkt.

4.4.2 Genexpressionsanalyse der immortalisierten Wilms1-Cl.31-Zelllinie

Nach der erfolgreichen Immortalisierung der Wilms1-Cl.31-Zelllinie wird deren Genexpressionsmuster mit einem *One Color Microarray (4x44k)* der Firma Agilent näher untersucht. Dabei erfolgt zunächst die Isolierung der RNA (3.9.1) und deren Qualitätskontrolle (3.9.3). Um den Einfluss der Immortalisierung bzw. der Telomerase und des temperatursensitiven (triple mutanten) großen SV40 T-Antigens auf die Wilms1-Cl.31-Zelllinie zu analysieren, wird die RNA jeweils zwei Mal bei 33°C und 37°C isoliert. Die Expressionsdaten der isolierten RNA bei der genannten Temperatur werden mit den Genexpressionsmustern von fünf

biologischen Wiederholungen der primären Wilms1-Zelllinie, die zu einem Mittelwert zusammengefasst wurden, verglichen. Die anfallenden Daten werden vorab mit TATAR nach folgenden Kriterien gefiltert: Alle Daten, die eine Expressionsintensität von ≥ 200 , einen Foldchange (fc) von $\geq 1,5$ und einen p-Wert von $\leq 0,05$ haben, werden für die weiteren Analysen herangezogen. Die Kategorisierung der differenziell regulierten Gene erfolgt mit *DAVID*, einer bioinformatischen Datenbank (<http://DAVID.abcc.ncifcrf.gov/>).

Nach der vorläufigen Datenanalyse mit TATAR können 3754 Gene/Oligos identifiziert werden, die in den immortalisierten Wilms1-CI.31-Zellen bei 33°C gegenüber der primären Wilms1-Zelllinie differenziell reguliert werden. Davon sind 2036 Gene/Oligos hochreguliert und 1718 Gene/Oligos runterreguliert. Die weitere Auswertung der Daten mit *DAVID* zeigt, dass die hochregulierten Gene überwiegend wichtige regulatorische Funktionen im Zellzyklus übernehmen ($p= 2,7^{-19}$). In Verbindung damit stehen weitere Mechanismen wie z.B. die DNA-Replikation ($p= 5,5^{-19}$) und der *Mismatch-Repair* ($p= 3,1^{-19}$), die innerhalb des Zellzyklus eine wichtige Rolle spielen (Abb. 4.29).

Die Analyse der Genexpressionsdaten der immortalisierten Wilms1-CI.31-Zelllinie zeigt deutlich, dass die Immortalisierung zu einem veränderten Genexpressionsmuster dieser Zellen führt. Diese Veränderungen umfassen besonders Gene, die an der Initiation bzw. Regulation der DNA-Replikation während der S-Phase im Zellzyklus beteiligt sind. Dazu gehören mitunter die Gene *CDC7*, *DBF4*, *MCM*, *CDC45*, *CDC6* und *ORC* (Sheu und Stillman, 2010; Pacek et al., 2006; Saha et al., 1998). Des Weiteren sind Gene in diesen Zellen signifikant hochreguliert, die für den Mechanismus der DNA-Reparatur zuständig sind und einen wesentlichen Bestandteil bei der Regulation des *Mismatch-Repairs* bilden (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *RFC*, *PCNA*, *Exo1*, *RPA*, *LigI* und *Pol δ*). Weitere Mechanismen, die hochreguliert sind und zur Aufrechterhaltung der originalen DNA-Matrizen beitragen, sind die Nukleotid- und Basen-Exzision Reparaturprozesse. Auch die Signalwege, die für die Synthese der Grundbausteine (Nukleotide) der DNA sorgen und damit bei einer gesteigerten Aktivität der Zellteilung genügend Ausgangsmaterial in Form von ATP, CTP, GTP und TTP liefern, sind ebenfalls hochreguliert (Purin- und Pyrimidinmetabolismus, Abb. 4.29).

Term	Count	%	P-Value
Cell cycle	48	2.8	2.7E-19
DNA replication	26	1.5	5.5E-19
Mismatch repair	16	0.9	3.1E-11
Nucleotide excision repair	17	1.0	4.3E-7
Homologous recombination	13	0.8	1.6E-6
p53 signaling pathway	18	1.0	5.8E-5
Pyrimidine metabolism	21	1.2	1.8E-4
Oocyte meiosis	21	1.2	1.3E-3
Base excision repair	10	0.6	2.6E-3
One carbon pool by folate	6	0.3	1.0E-2
Systemic lupus erythematosus	17	1.0	1.2E-2
Small cell lung cancer	15	0.9	1.4E-2
Purine metabolism	23	1.3	1.4E-2

Abb. 4.29: KEGG-Signalwege. DAVID-Auswertung der hochregulierten Gene in Wilms1-CI.31-Zellen nach der Immortalisierung bei 33°. Aufgeführt sind die involvierten biologischen Vorgänge, die bei den Wilms1-CI.31-Zellen nach der Immortalisierung im Vergleich zu den primären Wilms1-Zellen, reguliert werden. Unter *Count* ist die Anzahl der beteiligten Gene angegeben, die in diesen biologischen Prozess reguliert werden. Die Prozente geben an, wie groß der prozentuale Anteil der regulierten Gene an der Gesamtzahl der beteiligten Gene an diesem Signalweg ist. Die einzelnen Signalwege sind nach ihrer Signifikanz p-Value angeordnet, beginnend mit der höchsten Signifikanz.

Die Auswertung der herunterregulierten Gene verdeutlicht, dass die Immortalisierung einen negativen Effekt auf den PPAR-Signalweg hat. Dieser Signalweg reguliert die Freigabe von zellulären Lipiden, indem es die Expression verschiedener Gene steuert, die am Lipidmetabolismus beteiligt sind. Zudem werden die Oxidation von Lipiden und die Zellproliferation reguliert. Ein weiterer Mechanismus, der über diesen Weg gesteuert wird, ist die Adipozytendifferenzierung. Die Expression der beiden Rezeptoren RXRA und PPAR γ , die zusammen einen Heteroduplex bilden, sind mitunter für die Adipozytendifferenzierung von enormer Bedeutung (Tontonoz et al., 1994). Beide Faktoren (Rezeptoren), die als Heteroduplex einen Transkriptionsfaktor bilden, sind bei den immortalisierten Wilms1-CI.31-Zellen bei 33°C in ihrer Expression herunterreguliert (Abb. 4.31). Ein weiteres Gen, ist das *MMP1*-Gen, welches zu den *matrix metalloproteinase* Proteinen (MMPs) zählt und eine wichtige Rolle während der Entwicklung von Fettgewebe spielt (Samuvel et al., 2011). Seine Expression ist in der immortalisierten Wilms1-CI.31-Zelllinie ebenfalls herunterreguliert (Abb. 4.24), d.h. dass die Ausgangszellen potentiell die Möglichkeit haben, zu Adipozyten zu differenzieren, welche durch die Immortalisierung inhibiert werden. Des Weiteren werden mehrere Gene negativ reguliert, die an der oxidativen Phosphorylierung beteiligt sind. Alle fünf Komplexe der Atmungskette, die an der oxidativen Phosphorylierung beteiligt sind, enthalten Gene die nach der Immortalisierung herunterreguliert werden (Tab. 4.2). Wie schon in Abschnitt 4.2.1 beschrieben, ist die oxidative Phosphorylierung ein Prozess, der den Zellen Energie in Form von ATP zu Verfügung stellt, die einen erhöhten Energiebedarf haben. Dies kommt überwiegend in Zellen vor, die sich in der Differenzierung befinden (Varum et al., 2011; Zheng, 2012).

Komplex I NADH Dehydrogenase		Komplex II Succinate - Dehydrogenase		Komplex III Ubiquinol-Cytochrom C Reductase		Komplex IV Cytochrom C Oxidase		Komplex V ATP Synthase	
Regulierte Gene									
imWi-CI.31	Kontrolle	imWi-CI.31	Kontrolle	imWi-CI.31	Kontrolle	imWi-CI.31	Kontrolle	imWi-CI.31	Kontrolle
ND3		SDHC		QCR10		COX7A		ATP5I	
3082	1129	5127	2243	835	542	5660	3392	16445	9625
ND4		SDHB		QCR11		COX15		ATP5J2	
1352	329	10042	6425	42861	27072	1869	1076	14075	8137
NDUFS7						COX17		ATP5G1	
8256	4029					9050	4760	11027	7327
NDUFA3								ATP6V0E1	
11678	3998							31329	13751
NDUFA11									
26962	13582								

Tab. 4.2: Enzymkomplexe der Atmungskette, die nach der Immortalisierung der Wilms1-CI.31-Zelllinie reguliert werden. Aufgelistet sind die herunterregulierten Gene der einzelnen Komplexe. Gegenübergestellt ist die Expressionsintensität der primären Wilms1-Zelllinie (Kontrolle) und der imWi-CI.31-Zellen= immortalisierte Wilms1-CI.31-Zellen. Kontrolle= Mittelwert von fünf Wiederholungen der primären Wilms1-Zelllinie.

Die Auswertung der Genexpression der immortalisierten Wilms1-CI.31-Zelllinie bei 37° C gegenüber der nicht immortalisierten Wilms1-Zelllinie mit TATAR ergibt im vorliegenden Fall, dass insgesamt 6394 Gene/Oligos differenziell reguliert werden. Davon werden 2250 Gene/Oligos hochreguliert und 4144 Gene/Oligos herunterreguliert. Die weiterführende Analyse der hochregulierten Gene mit *DAVID* hat bewiesen, dass die hochregulierten Gene an den gleichen Mechanismen bzw. Signalwegen beteiligt sind, die zuvor bei den immortalisierten Wilms1-CI.31 bei 33°C identifiziert werden. Dazu zählen die Regulation des Zellzyklus mit einem p-Wert von $3,1^{-23}$, die DNA-Replikation mit einem p-Wert von 2^{-17} sowie die *Mismatch*-Reparatur mit einem p-Wert von $6,5^{-13}$. Trotz der höheren Anzahl regulierter Gene bei 37°C gegenüber bei 33°C zeigt die Auswertung der hochregulierten Gene ein beinahe identisches Muster an Signalwegen bzw. Mechanismen, die bei dieser Temperatur differenziell reguliert werden.

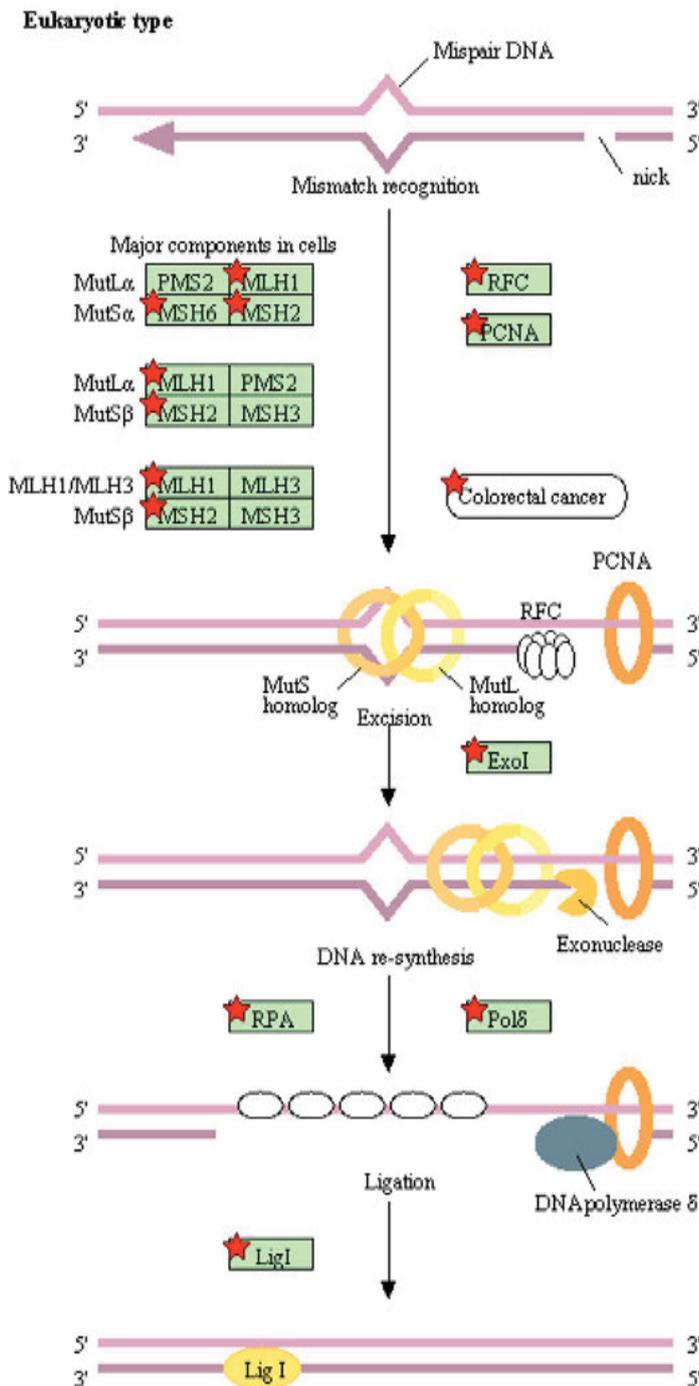


Abb. 4.30: Mismatch-Repair und die beteiligten Faktoren. Die roten Sterne markieren die verschiedenen Faktoren, die in der immortalisierten Wilms1-CI.31-Zelllinie bei 33°C hochreguliert sind. (Entnommen aus DAVID).

Die Analyse der herunterregulierten Gene belegt, dass hier dieselben Gene bei 37°C reguliert werden, die entweder bei der Regulation der Apoptose oder Differenzierung beteiligt sind. Dazu gehört, wie bei Wilms1-CI.31 bei 33°C, der PPAR-Signalweg. Zusätzlich wird die Expression von Genen herunterreguliert, die während der p53-Signaltransduktion einen Effekt auf die Apoptose haben bzw. diese induzieren. Bei den regulierten Genen handelt es sich um *CASP9*, *CASP8* und *BID*, die in der primären Wilms1-Zelllinie stärker exprimiert sind. Alle drei Gene kodieren für Faktoren, die während der Apoptose miteinander interagieren. Durch entsprechende Stimuli von außen wird das membranständige CASP8-Molekül aktiviert. Daraufhin interagiert es mit der inaktivierten Form des BID-Moleküls und

konfiguriert es durch die Abspaltung des N-terminalen Abschnitts in die aktive verkürzte tBID-Form. Diese wiederum wandert durch die mitochondriale Membran und führt zur Freisetzung von Cytochrom-c, welches indirekt für die Aktivierung von CASP9 benötigt wird. Anschließend leitet CASP9 zusammen mit CASP3/7 die Apoptose ein (Billen et al., 2009). Dies bedeutet, dass durch die Immortalisierung die in den Ausgangszellen partiell aktive Apoptose unterdrückt wird.

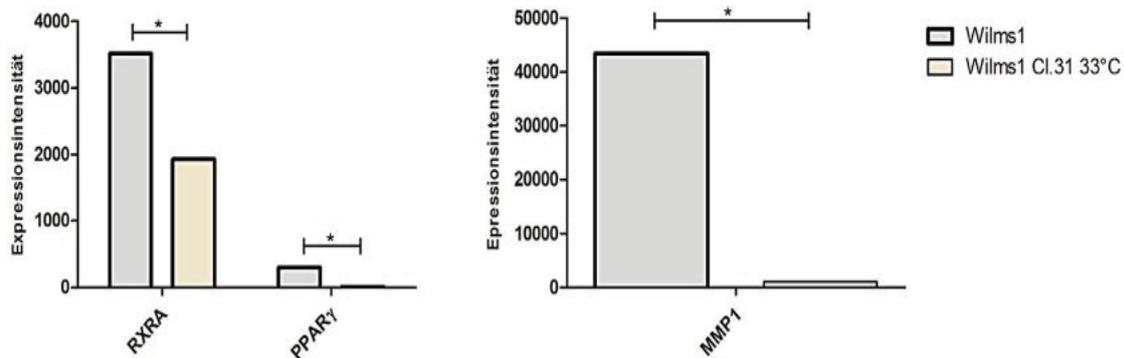


Abb. 4.31: Wilms1-Cl.31 bei 33°C nach Immortalisierung. Expressionsdaten von herunterregulierten Genen des PPAR-Signalweges. Als Kontrolle dienen die entsprechenden Expressionsdaten der primären Wilms1-Zelllinie (Wilms1 n=5; Wilms1 Cl.31 33° n=1).

Festzuhalten ist, dass der Vergleich der Expressionsdaten der primären Wilms1-Tumorzelllinie mit der immortalisierten Wilms1-Cl.31-Zelllinie verdeutlicht, dass durch die Immortalisierung Gene hochreguliert werden, die hauptsächlich am Zellzyklus und der DNA-Reparatur beteiligt sind. Die herunterregulierten Gene sind im Wesentlichen Faktoren, die in apoptotischen oder zelldifferenzierenden Mechanismen involviert sind. Ein weiterer Signalweg der negativ reguliert wird, ist die oxidative Phosphorylierung, die wiederum in Verbindung mit metabolischen Vorgängen der Zelldifferenzierung steht. Die Analyse der Genexpression der immortalisierten Wilms1-Cl.31-Zelllinie bei 33°C und 37°C weist trotz der differentiell regulierten Anzahl an Genen untereinander keinen signifikanten Unterschied der regulierten Signalwege auf.

4.4.3 Einfluss von *WT1*(+/-) auf die immortalisierte Wilms1-Cl.31-Zelllinie

Nach der erfolgreichen Immortalisierung der Wilms1-Zelllinie wird nun überprüft, welchen Einfluss die wildtypische *WT1*(+/-)-Isoform auf die Genexpression dieser Zellen hat. Zudem wird anhand der Genexpressionsdaten ermittelt, ob die *WT1*(+/-)-Isoform, die identischen Gene reguliert, wie in der primären Wilms1-Zelllinie. Um diese Frage zu klären, wird zunächst wie in 4.1 beschrieben der *CMV-WT1*(+/-) Vektor durch eine transiente Transfektion in die Zellen eingeschleust. Als Negativkontrolle werden die Wilms1-Cl.31-Zellen herangezogen, die zeitgleich mit dem pENTR4-Leervektor transfiziert werden. Die anschließende Verifikation der *WT1*-Expression auf RNA-Ebene erfolgt mittels qRT-PCR und auf Proteinebene mit einer Immunfluoreszenz (3.7 und 3.9.6). Für die Bestimmung der *WT1*-Molekülanzahl wird eine *WT1*-Standardkurve verwendet (4.1.1). Für die anschließende Erstellung eines Expressionsmusters wird ein *One Color Microarray* (4x44k) der Firma Agilent

eingesetzt. Um die statistische Signifikanz zu erhöhen, wird dieser Versuchsansatz als Triplikat durchgeführt (biologische Wiederholungen). Nach jedem Ansatz wird die *WT1*-Expression durch eine qRT-PCR bestätigt, in dem zuvor die RNA nach 24 und 48 h isoliert und in cDNA umgeschrieben wird (3.9.5).

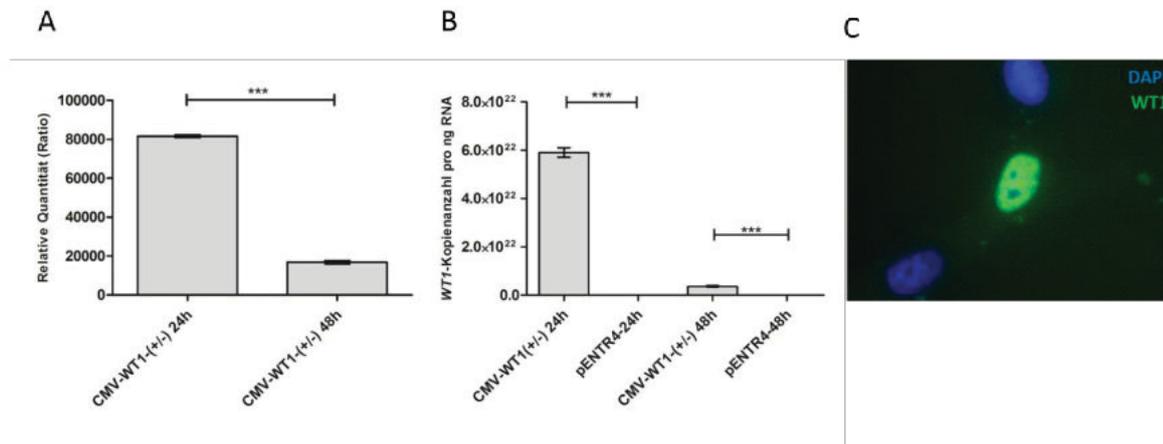


Abb. 4.32: Wilms1-CI.31-Zelllinie nach transienter Transfektion mit dem CMV-*WT1*(+/-)-Vektor. **A:** qRT-PCR, dargestellt ist die relative Quantität der *WT1*-Expression, jeweils auf die mit transfizierter pENTR4-Vektorkontrolle bezogen und auf das Kontrollgen (*housekeeping-gene*) *RER1* normiert. **B:** Die absolute Quantifizierung der *WT1*-Kopien (pro ng RNA) in Abhängigkeit vom zeitlichen Abstand der Transfektion. Signifikanz wird mit dem t-Test bestimmt, dabei gilt folgendes: *** $p \leq 0,001$. **C:** Immunologischer Nachweis des *WT1*-Proteins in transfizierten Wilms1-CI.31-Zellen. Blau= DAPI-Färbung, grün= *WT1*-Antikörper (40-fache Vergrößerung).

Wie bereits in Abschnitt 4.2 beschrieben, sinkt auch in diesem Fall die gemessene relative *WT1*-RNA-Menge 48 h nach der Transfektion gegenüber dem 24 h-Wert signifikant ab (Abb. 4.32 A). Die genaue Molekülmenge an *WT1* pro ng eingesetzter RNA nach 24 h beträgt $5,9 \times 10^{22}$. Im Vergleich dazu beträgt diese nach 48 h nur $3,6 \times 10^{21}$ *WT1*-Moleküle (Abb. 4.32 B). Die immunologische Auswertung bestätigt, dass *WT1* auch als Protein vorliegt (Abb. 4.32 C).

Für die Analyse werden die Expressionsdaten aller drei Versuche zu einem Mittelwert (*Mean*) zusammengefasst. Anschließend werden mit Hilfe der TATAR-Software die Daten (siehe 4.2.1) gefiltert. Dabei werden die Expressionsdaten der Wilms1-CI.31-Zellen, die mit der Negativkontrolle (pENTR4) transfiziert sind mit denen, die mit der *WT1*(+/-)-Isoform transfiziert sind verglichen. Die erste Auswertung lässt erkennen, dass insgesamt 161 Gene/Oligos signifikant differenziell reguliert werden. Davon werden 96 Gene/Oligos hoch- und 65 Gene/Oligos herunterreguliert.

Die Analyse der regulierten Oligos zeigt, dass weder die hochregulierten noch die herunterregulierten Gene mittels *DAVID* einem Signalweg bzw. Prozess zugeordnet werden können. Dies bedeutet, dass die generierten Datensets (96 Gene/Oligos hochreguliert/ 65 Gene/Oligos herunterreguliert) nicht signifikant an einem Signalweg beteiligt sind. Dies ist

eventuell auf die Immortalisierung zurück zu führen. Die beschriebenen Auswirkungen der *WT1*-(+/-)-Isoform auf die Regulation von zellularen Mechanismen in den Wilms1-Zellen (4.2.1) sind Prozesse, die im Widerspruch zur Immortalisierung stehen. Dadurch hebt sich eventuell der Effekt in der immortalisierten Wilms1-Cl.31-Zelllinie auf.

4.5 Herstellung eines induzierbaren und konstitutiv exprimierenden viralen *WT1*-(/-)-Vektors

Um den Langzeiteffekt des *WT1*-Proteins auf die Wilms1-Cl.31-Zelllinie zu beobachten, werden zwei verschiedene *WT1*-(/-)-Konstrukte hergestellt. Zum einen wird ein Doxycyclin induzierbarer *WT1*-Vektor und zum anderen ein konstitutiv exprimierender *WT1*-(/-)-Vektor kloniert. Beide Konstrukte werden über mehrere Klonierungsschritte in virale Vektoren eingebracht, damit die Infektion der Wilms1-Cl.31-Zellen mit dem *WT1*-Konstrukt über virale Partikel erfolgt. Durch die Transduktion der Zellen wird eine höhere Effizienz von infizierten Zellen gewährleistet und die Integration des gewünschten DNA-Fragments ins Wirtsgenom der Wilms1-Cl.31-Zellen ermöglicht.

Klonierung des induzierbaren *WT1*-(/-) Vektors

Für die Klonierung des induzierbaren Vektors werden zwei verschiedene Ausgangsvektoren benötigt. Im pCDNA3.3-TOPO-Vektor liegt die *WT1*-(/-)-Isoform vor (Abb. 4.33 A). Die Doxycyclin induzierbare Kasette wird aus dem TRE-AutoV14-Vektor verwendet (Abb. 4.27. B). Im ersten Schritt der Klonierung wird die *WT1*-(/-)-Isoform mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* aus dem pCDNA3.3-TOPO-Vektor geschnitten. Aus dem TRE-Auto-V14 wird mit dem gleichen Enzym das kodierende DNA-Fragment für GFP herausgeschnitten (siehe 3.11.2). Nach dem Restriktionsverdau des pCDNA3.3-TOPO-Vektors entstehen zwei Fragmente von der Größe 5413 und 1307 Bp. Das 1307 Bp große Fragment wird aus dem Agarosegel herausgeschnitten und aufgereinigt (Abb. 4.34). Beim Restriktionsverdau von TRE-AutoV14 entstehen ebenfalls zwei Fragmente, deren Größe 8557 und 908 Bp beträgt.

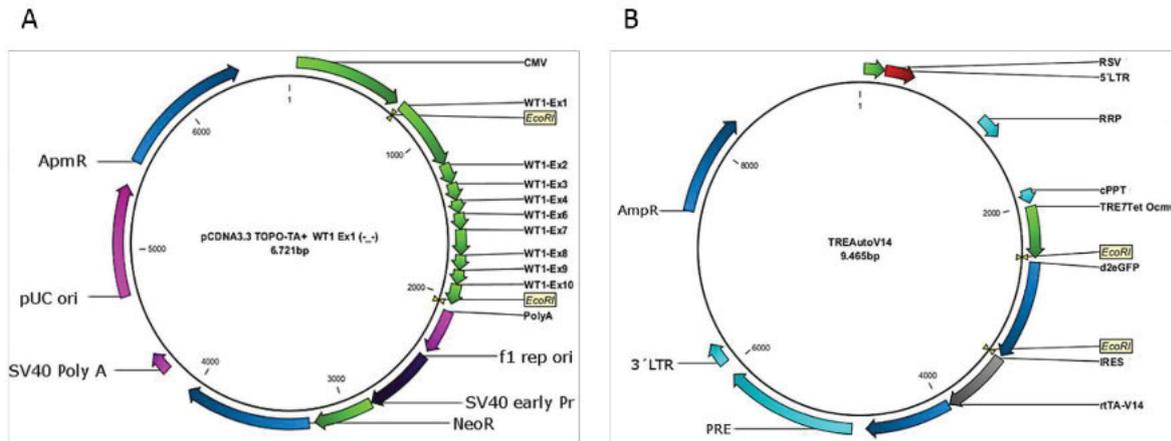


Abb. 4.33: Ausgangsvektoren für die Klonierung des induzierbaren *WT1(-/-)*-Konstrukts. **A:** Der pCDNA3.3-TOPO-Vektor, in dem die *WT1(-/-)* Isoform vorliegt. **B:** TRE-AutoV14-Vektor mit Doxycyclin induzierbarer Kassetten. 3'-LTR= *long terminal repeat*, d2eGFP= *destabilized enhanced green fluorescent protein*, AmpR= Ampicillin Resistenz, CMV= *cytomegalovirus promoter*, cPPT= *central polypurine tract*, IRES= *internal ribosomale Eintrittsstelle*, NeoR= Neomycin Resistenz, PRE= *post-transcriptional regulatory element*, RRP= *relative recombination potential*, rTA= *reverse Tet transcriptional transactivator*, TRE7TetO= Zusammengesetzt aus *Tc-responsive Element* und *tetracycline operator*, SV40 early pr= Simian-Virus 40 Promotor, *WT1-Ex1-10*= das Wilms-Tumor-Gen1 (Isoform *-/-*).

Hier wird das größere Fragment aus dem Gel geschnitten (Abb. 4.34 A) und mittels QIAquick Kit eluiert. Anschließend erfolgt wie in 3.11.2 beschrieben die Ligation des *WT1(-/-)* Fragments in den TRE-AutoV14-Vektor bzw. in dessen Doxycyclin induzierbare Kassetten. Der Ligationansatz wird in die Sure2-E.coli-Zellen transformiert und auf Amp-Agarplatten ausgestrichen. Nachfolgend werden von vier Kolonien Starterkulturen angesetzt und aus diesen die Plasmid-DNA isoliert (3.8.3). Der anschließende Restriktionsverdau mit *EcoRI* dient zum Nachweis einer erfolgreichen Ligation des *WT1(-/-)*-Fragments in dem TRE-AutoV14-Vektor.

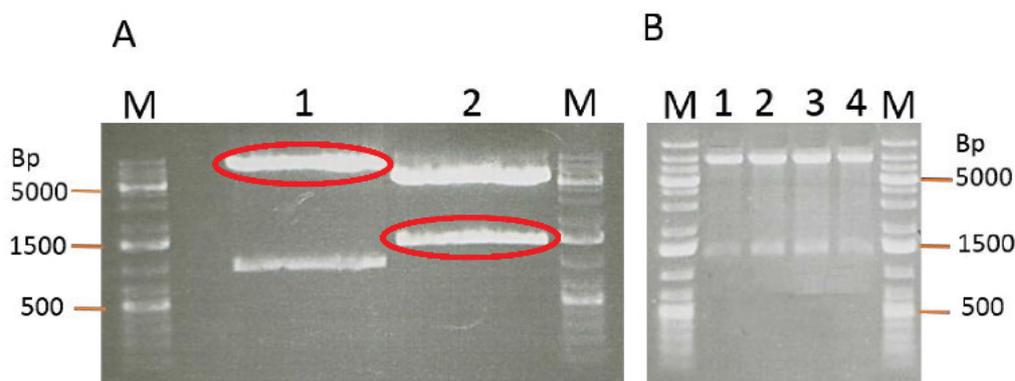


Abb. 4.34: 0,8%-iges analytisches Agarosegel. **A:** Ein Low-Melt Agarosegel 1= TRE-AutoV14 mit *EcoRI* geschnitten. Zwei Fragmente der Größe 8557 Bp und 908 Bp entstehen. 2= pCDNA-TOPO-*WT1(-/-)* mit *EcoRI* geschnitten, es entstehen zwei Banden der Größe 5413 und 1307 Bp. Die rot markierten Banden werden jeweils ausgeschnitten. **B:** Restriktionsverdau mit *EcoRI* von vier Klonen nach der Ligation. Es entstehen zwei Fragmente, die 8557 und 1307 Bp groß sind. M= O'GeneRuler 1 kb Plus DNA Leiter, Bp= Basenpaare.

Liegt das *WT1*^(-/-)-DNA-Fragment vor, wird dieses durch *EcoRI* wieder herausgeschnitten und läuft auf der Höhe von 1307 Bp. Insgesamt werden vier Kolonien auf das *WT1*-Insert untersucht und in allen Proben wird ein ca. 1307 Bp großes DNA-Fragment herausgeschnitten (Abb. 4.34 B). Die Umklonierung der neu zusammengesetzten regulatorischen Kasette in den pENTR4-Vektor findet über mehrere Zwischenschritte statt. Dabei wird der TRE-AutoV14-*WT1*^(-/-)-Vektor so konfiguriert, dass er am 5′ ein Sticky und am 3′ ein Blunt-Ende aufweist. Um die entsprechenden komplementären Enden im pENTR4-Vektor zu erzeugen, wird dieser mit den beiden Restriktionsenzymen *NotI* und *EcoRV* geschnitten. Nach der anschließenden Aufreinigung des geschnittenen pENTR4-Vektors wird die regulatorische Kasette (TRE-AutoV14-*WT1*^(-/-)) in diesen kloniert (Abb. 4.35 A).

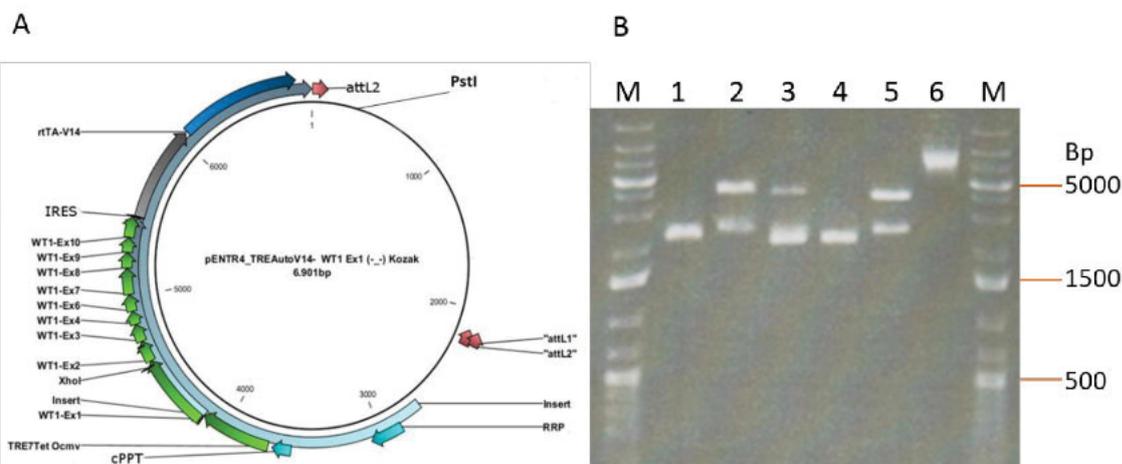


Abb. 4.35: Klonierung der Doxycyclin regulatorischen *WT1*^(-/-)-Kasette in den pENTR4-Vektor. **A:** Schematische Plasmidkarte des pENTR4-Vektors mit der regulatorischen Kasette (TRE-AutoV14-*WT1*^(-/-) Vektors). **B:** 0,8%iges analytisches Agarosegel. Die Klone 1 bis 5 werden mit *XhoI* und *PstI* geschnitten. Bei Klonen mit Insert entstehen nach dem Restriktionsverdau zwei Banden von der Größe 2427 und 4497 Bp. In Spur 6 ist ein nicht geschnittener Klon als Kontrolle aufgetragen. attL= attachment sites, cPPT= *central polypurine tract*, IRES= interne ribosomale Eintrittsstelle, RRP= relative recombination potential, rTA= *reverse Tet transcriptional* transactivator, TRE7TetO= Zusammengesetzt aus *Tc-responsive Element* und *tetracycline operator*, *WT1*-Ex1-10= das Wilms-Tumor-Gen1 (Isoform ^(-/-)), M= O'GeneRuler 1 kb Plus DNA Leiter, Bp= Basenpaare.

Zum Nachweis der Insertion des TRE-AutoV14+*WT1*^(-/-) DNA-Fragments wird von fünf Klonen die Plasmid-DNA mit *PstI* und *XhoI* geschnitten. Liegt das gewünschte DNA-Fragment vor, wird die Plasmid-DNA zweimal geschnitten und es liegen zwei Banden auf der Höhe von 2404 und 4497 Bp vor. Die Klone 2 und 5 enthalten die richtigen Banden (Abb. 4.35 B). Die drei Klone 1, 3 und 4 werden verworfen, für das weitere Vorgehen wird Klon 5 verwendet. Für die Fertigstellung des induzierbaren *WT1*^(-/-)-Vektors folgt als letzter Schritt eine *Clonase*-Reaktion nach dem Prinzip der Gateway-Klonierung (Invitrogen) in den *pLenti-X1-Destination*-Vektor. Nach der Integration des Fragments beträgt die neue Vektorgröße 12031 Bp (Abb. 4.36 A). Zur Überprüfung wird das neue Konstrukt mit den Restriktionsenzymen *ClaI* und *SpeI* geschnitten. Dabei schneidet *SpeI* im Rückgrat (*Backbone*) von *pLenti-X1* und *ClaI* nur im Insert. Drei ausgewählte Klone werden einem Verdau

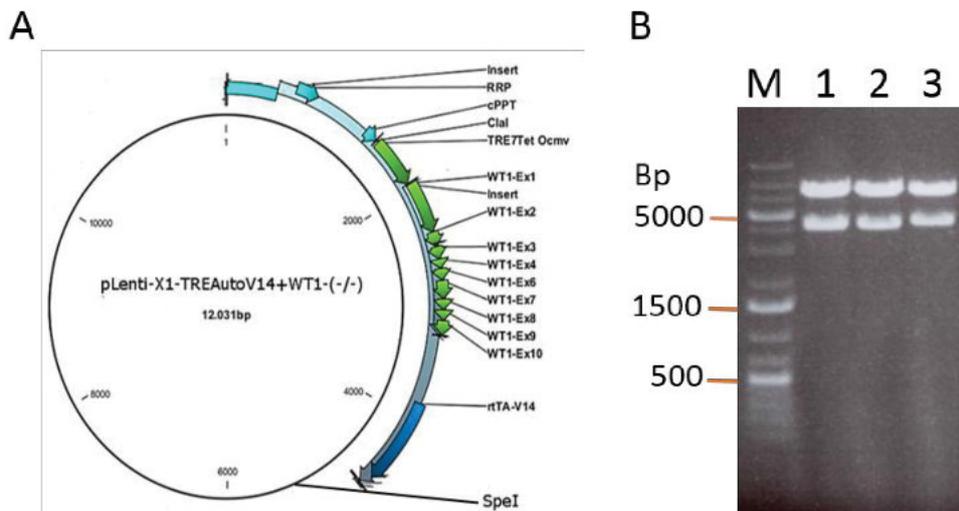


Abb. 4.36: Klonierung der regulatorischen TRE-Auto+WT1(-/-)-Einheit in den pLenti-X1-Destination-Vektor. **A:** Schematische Plasmidkarte vom pLenti-X1-TREAutoV14+WT1(-/-). **B:** Restriktionsverdau zur Überprüfung der Clonase-Reaktion von drei Klonen 1, 2 und 3 mit *Clal* und *SpeI*. cPPT= *central polypurine tract*, RRP= *relative recombination potential* rTA= *reverse Tet transcriptional transactivator*, TRE7TetO= Zusammengesetzt aus *Tc-responsive Element* und *tetracycline operator*, WT1-Ex1-10= das Wilms-Tumor-Gen1 (Isoform -/-), M= O'GeneRuler 1 kb Plus DNA Leiter, Bp= Basenpaare.

unterzogen. Sind die jeweiligen Schnittstellen vorhanden, entstehen zwei Banden der Größe 4112 und 7919 Bp. Alle drei untersuchten Klone zeigen diese beiden Banden auf (Abb. 4.36 B). Das fertige Konstrukt wird mit den entsprechenden lentiviralen Plasmiden, die für das VSV-G Hüllprotein und gag/pol kodieren, in HEK293T2-Zellen transfiziert, um virale Partikel herzustellen (3.2). Diese werden anschließend für eine Infektion der Wilms1-CI.31-Zelllinie verwendet.

Klonierung des konstitutiv exprimierenden WT1(-/-)-Vektors

Für die Herstellung eines konstitutiv exprimierenden WT1(-/-)-Vektors wird, wie bereits bei der Klonierung des induzierbaren Konstrukts, die WT1(-/-)-Isoform, die im pCDNA3.3-TOPO-TA Vektor vorliegt, zunächst in den pENTR4-Vektor kloniert. Für die Klonierung werden beide Vektoren mit *EcoRI* geschnitten, ehe anschließend die Ligation des WT1(-/-)-Fragments in den pENTR4-Vektor erfolgt (3.11.3). Bei einer erfolgreichen Insertion des Fragments entsteht ein 3599 Bp großes Plasmid (Abb. 4.37 A). Durch einen Restriktionsverdau der Plasmid-DNA mit *PstI* und *SaI* wird die Klonierung überprüft. Das *PstI* Enzym schneidet im Backbone vom pENTR4-Vektor und *SaI* schneidet im Insert. Sind beide Restriktionsschnittstellen vorhanden, entsteht ein 2141 und ein 1460 Bp großes Fragment. Wie

in Abbildung 4.37 B zu erkennen ist, enthalten fünf der sechs Klone die richtigen zwei Banden. Bei Klon 5 hat die Ligation nicht funktioniert.

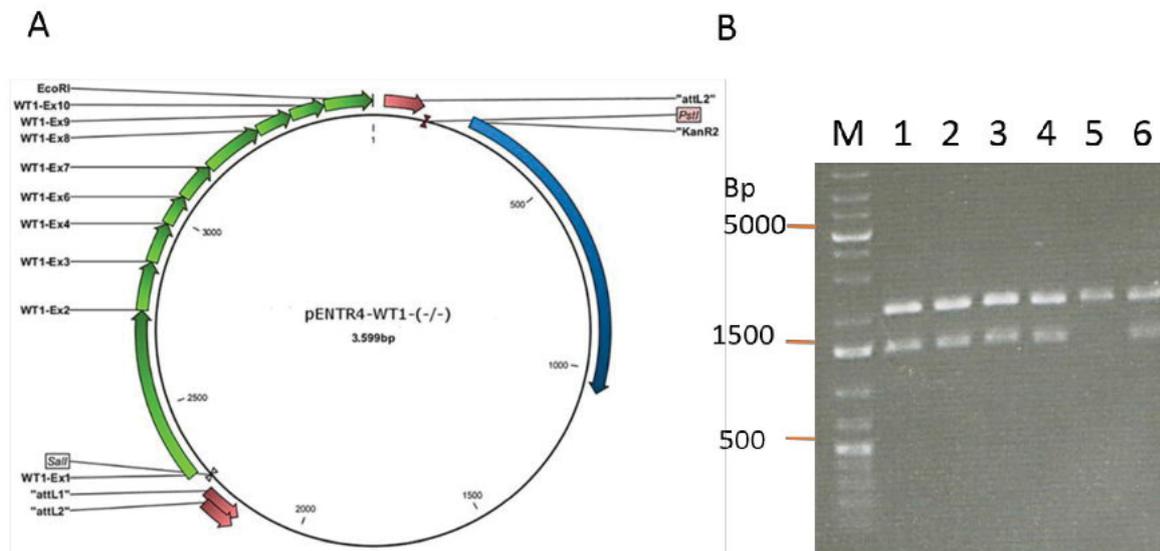


Abb. 4.37: **A:** Plasmidkarte nach Ligation des *WT1(-/-)*-Fragments in den pENTR4-Vektor. **B:** Restriktionsverdau mit *SaI* und *PstI* zur Kontrolle der Ligation. Positive Klone zeigen nach dem Restriktionsverdau zwei Banden von der Größe 1460 und 2141 Bp. Insgesamt werden sechs Klone bzw. deren Plasmid-DNA kontrolliert. KanR= Kanamycin Resistenz, attL= attachment sites, *WT1-Ex1-10*= das Wilms-Tumor-Gen1 (Isoform -/-), M= O'GeneRuler 1 kb Plus DNA Leiter, Bp= Basenpaare.

Ausgehend vom pENTR4-*WT1(-/-)*-Vektor wird dieser für die Clonase-Reaktion zur Umklonierung des *WT1(-/-)*-Fragment in den *pLenti-CMV*-Vektor verwendet. Das fertige lentivirale Expressionskonstrukt hat nach dem Einbau des *WT1(-/-)*-Fragments eine Größe von 9.322 Bp. Der anschließende Restriktionsverdau von sechs Klonen wird mit dem Enzym *XhoI* durchgeführt. Liegt das *WT1(-/-)*-Fragment im *pLenti*-Vektor vor, entstehen drei unterschiedlich große Fragmente.

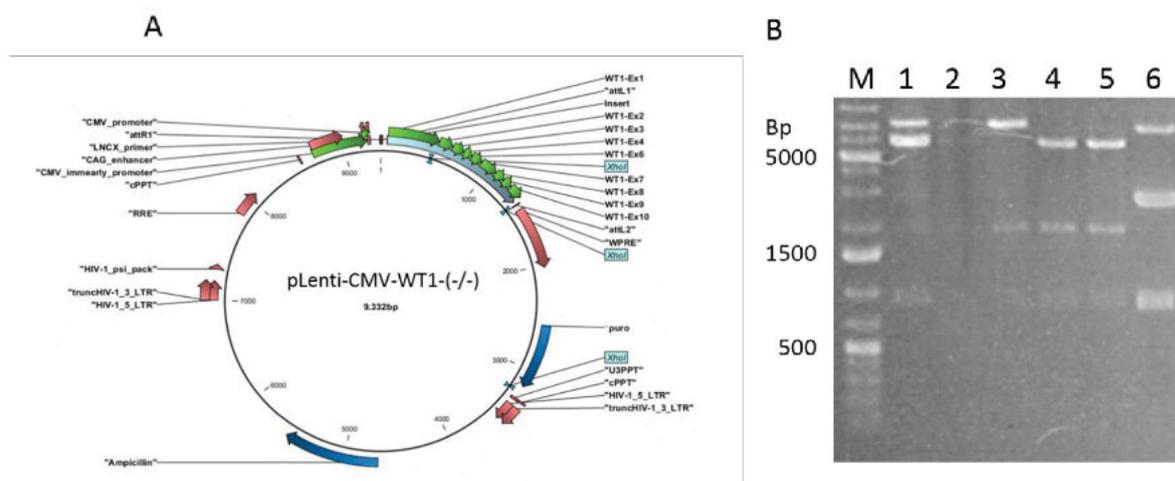


Abb. 4.38: Clonase-Reaktion zur Herstellung eines lentiviralen *WT1(-/-)*-Konstrukts. **A:** Plasmidkarte des *pLenti-CMV*-Vektors mit *WT1(-/-)*-Inserts. **B:** Restriktionsverdau von sechs Plasmid-DNAs von sechs Klonen mit *XhoI*. , attL= attachment sites, cPPT= central polypurine tract RRP= relative recombination pote, LTR= Long terminal repeats, puro = Puromycin Resistenz, WPRES= Woodchuck hepatitis virus post-transcription regulatory element, *WT1-Ex1-10*= das Wilms-Tumor-Gen1 (Isoform -/-), M= O'GeneRuler 1 kb Plus DNA Leiter, Bp= Basenpaare.

Die Größe dieser Fragmente beträgt 898, 1856 und 6596 Bp. Wie in Abbildung 4.38 B zu erkennen ist, zeigen zwei der sechs untersuchten Plasmid-DNAs das entsprechende Bandenmuster auf (Spur 4 und 5). Für die Fertigstellung eines infektiösen Virus wird die Plasmid-DNA von Klon vier verwendet.

4.5.1 Analyse des induzierbaren und konstitutiv exprimierenden *WT1*^(-/-)-Konstrukts in der Wilms1-CI.31-Zelllinie.

Nach der Herstellung des induzierbaren TRE-Auto-*WT1*^(-/-) und des konstitutiv exprimierenden *pLenti*-CMV-*WT1*^(-/-) Konstrukts werden diese für die Herstellung von infektiösen Viren verwendet. Die fertigen Viren werden zur Transduktion der Wilms1-CI.31-Zelllinie eingesetzt. Die Produktion der Viren sowie die Infektion der Zellen werden wie schon in Abschnitt 3.2 beschrieben durchgeführt. Um sicher zu stellen, dass nur die Zellen überleben, die das gewünschte Konstrukt im Genom integriert haben, werden diese über eine Dauer von zwei Wochen mit Puromycin (2 µg/ml) selektioniert. Nach zwei Wochen werden die mit dem TRE-Auto-*WT1*^(-/-) transduzierten Wilms1-CI.31-Zellen im Doxycyclin haltigem Medium (100 µg/ml) kultiviert. Die RNA-Isolierung erfolgt sieben Tage nach der Zugabe von Doxycyclin. Zeitgleich wird auch die RNA aus den *pLenti*-CMV-*WT1*^(-/-) transduzierten Wilms1-CI.31-Zellen isoliert. Als Kontrolle dient die RNA von nicht induzierten bzw. von shc-transduzierten (Kontrolle)-Zellen. Zur Verifikation der *WT1*-Expression in den Wilms1-CI.31-Zellen wird eine qRT-PCR durchgeführt.

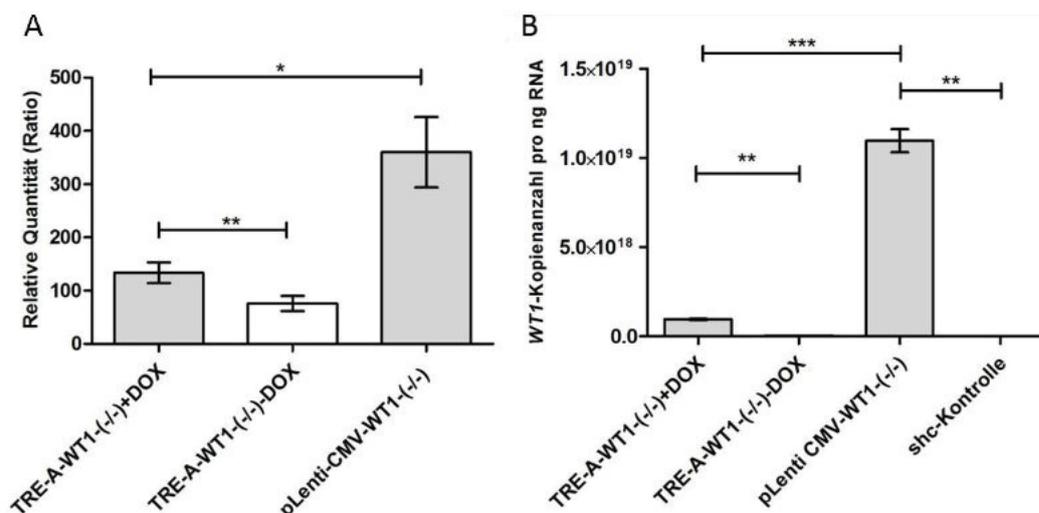


Abb. 4.39: *WT1*-RNA-Expression in Wilms1-CI.31-Zellen. **A:** Dargestellt ist die relative Quantität der *WT1*-Expression jeweils auf die transduzierte shc-Kontrolle bezogen und auf das Kontrollgen (*Housekeeping gene*) *RER1* normiert. Die TRE-A-*WT1*^(-/-) + DOX wird sieben Tage nach Doxycyclin Zugabe untersucht. **B:** Die absolute Quantifizierung der *WT1*-Kopienanzahl (pro ng RNA) in den induzierten und konstitutiv exprimierenden Wilms1-CI.31-Zellen. Signifikanz wurde mit dem t-Test bestimmt, dabei gilt folgendes: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

Die qRT-PCR-Daten zeigen deutlich, dass die beiden klonierten Konstrukte funktionsfähig sind. Die Expression von *WT1* ist sowohl in Zellen nachweisbar (Abb. 4.39 A), die das induzierbare, als auch in den Zellen die das konstitutiv exprimierende Konstrukt enthalten. Das *pLenti-CMV-WT1*-Konstrukt zeigt gegenüber dem *TRE-A-WT1*-Konstrukt eine signifikant höhere Expression an *WT1*. Des Weiteren fällt auf, dass *WT1* auch in Zellen exprimiert wird, die ohne Zugabe von Doxycyclin kultiviert werden (Abb. 4.39 A). Die Expression an *WT1*-mRNA fällt zwar geringer aus als in den induzierten Zellen, dennoch ist sie deutlich höher als in den Zellen, die mit der *shc*-Kontrolle transduziert wurden. Die meisten Kultivierungsmedien enthalten im Serum eine geringe Konzentration an Tetracyclin, welches durch seine strukturelle Ähnlichkeit zu Doxycyclin in der Lage ist, das *TRE-A-WT1(-/-)*-Konstrukt in geringem Ausmaß zu aktivieren.

Die Berechnung der *WT1*-Molekülmenge belegt, dass die beiden Konstrukte unterschiedlich stark *WT1* exprimieren. Zellen mit dem induzierbaren *WT1(-/-)*-Vektor zeigen eine *WT1*-Molekülmenge von $9,55 \times 10^{17}$ auf. Im Fall des konstitutiv exprimierenden Konstrukts werden $1,19 \times 10^{19}$ *WT1*-Moleküle ermittelt. Vergleicht man die *WT1*-Molekülmenge mit der errechneten *WT1*-Molekülmenge in 4.1 und 4.2 wird deutlich, dass bei den transienten Transfektionen die *WT1*-Menge mit $5,91 \times 10^{22}$ Molekülen (Faktor: 4.966) deutlich höher ist. Eine unterschiedlich starke Expression an *WT1* in den Zellen kann unter Umständen eine differenzierte Regulation in Abhängigkeit der Menge an *WT1* nach sich ziehen.

4.5.2 Expressionsanalyse der stabil transduzierten Wilms1-CI.31-Zelllinie

Nach der Verifikation der *WT1*-Expression in den Wilms1-CI.31-Zellen mittels qRT-PCR folgt anschließend eine Genexpressionsanalyse. Untersucht wird jeweils das Genexpressionsprofil der Wilms1-CI.31-Zellen, die das *TRE-A-WT1(-/-)*-Konstrukt und das *pLenti-CMV-WT1(-/-)*-Konstrukt im Genom integriert haben. Für die anstehende Analyse wird zunächst in beiden Fällen die RNA isoliert und auf ihre Qualität überprüft, um im Anschluss nach dem *One Color* Expressionsprotokoll aufgearbeitet zu werden (3.12). Zum Einsatz kommt hier das *4x44K Whole Genome Oligo Microarray* Format der Firma Agilent.

Bei der Auswertung der Daten werden zum einen die Doxycyclin induzierten (*TRE-A-WT1(-/-)*) und zum anderen die konstitutiv exprimierenden Wilms1-CI.31-Zellen mit den *shc*-transduzierten (Kontrolle) Wilms1-CI.31-Zellen verglichen. Um den Einfluss von *WT1* bestmöglich zu untersuchen, werden die Expressionsdaten von den nicht induzierten Wilms1-CI.31-Zellen nicht als Referenzkontrolle herangezogen. Der Grund dafür liegt in der relativ

hohen Expression an *WT1*-RNA gegenüber den Doxycyclin induzierten Wilms1-CI.31-Zellen (Abb. 4.39 A).

In beiden Fällen werden nur die Daten berücksichtigt, die eine Expressionsintensität von ≥ 200 und einen Foldchange von $\geq 1,5$ gegenüber der jeweiligen Kontrolle aufzeigen. Nach diesen Kriterien werden bei den Doxycyclin induzierten Wilms1-CI.31-Zellen insgesamt 2773 Gene/Oligos identifiziert, die differenziell reguliert sind. Davon werden 1247 Gene/Oligos hochreguliert und 1526 Gene/Oligos herunterreguliert. Bei der Analyse des konstitutiv exprimierenden *CMV-WT1(-/-)*-Konstrukts in den Wilms1-CI.31-Zellen werden 823 differenziell exprimierte Gene/Oligos identifiziert, von denen 536 Gene/Oligos hochreguliert und 287 Gene/Oligos herunterreguliert sind. Um zu ermitteln, ob diese Gene einem bestimmten molekularen Mechanismus oder Signalweg zuzuordnen sind, werden die gefilterten Daten mit Hilfe der Datenbank *DAVID* untersucht.

Die analysierten Expressionsdaten der Wilms1-CI.31-Zellen, die einerseits mit dem induzierbaren *WT1(-/-)*-Konstrukt und andererseits mit dem konstitutiv exprimierenden *WT1(-/-)*-Konstrukt transduziert werden, zeigen keine Übereinstimmung bei den regulierten Signalwegen auf. Sowohl die hochregulierten Gene als auch die herunterregulierten Gene lassen sich keinem Signalweg zuordnen, der in beiden Ansätzen wiederzufinden ist (Abb. 4.40). Auffallend ist ebenfalls, dass in allen vier analysierten Datensets (zwei hochregulierte/zwei herunterregulierte) der jeweils erstplatzierte Signalweg bereits eine niedrige Signifikanz darlegt. Im Vergleich zu den in 4.2.1 und 4.4.2 identifizierten Signalwegen liegt eine deutliche Diskrepanz zwischen der Signifikanz vor. Darüber hinaus ist die oxidative Phosphorylierung bei den hochregulierten Signalwegen nicht vertreten und kann somit die Ergebnisse von 4.2.1 nicht verifizieren.

Einzig bei den herunterregulierten Signalwegen gibt es zwischen der Doxycyclin induzierten *WT1*-Expression in den Wilms1-CI.31-Zellen und den primären Wilms1-Zellen, die mit dem *CMV-WT1(+/-)*-Konstrukt transfiziert sind, zwei Übereinstimmungen. Die fokale Adhäsion und der MAPK Signalweg sind bei den Transduktionen negativ reguliert (Abb. 4.32 und 4.11).

		TRE-A- <i>WT1</i> ^{-/-} vs. shc-Kontrolle					CMV- <i>WT1</i> ^{-/-} vs. shc-Kontrolle				
		Term	Count	%	P-Value	Term	Count	%	P-Value		
Hochregulierte Signalwege	Pathways in cancer		29	2.5	1.4E-2	Base excision repair	4	0.8	4.7E-2		
	Acute myeloid leukemia		8	0.7	4.0E-2	Viral myocarditis	5	1.0	8.2E-2		
	Pantothenate and CoA biosynthesis		4	0.4	4.7E-2						
	Lysosome		12	1.1	5.8E-2						
	Adherens junction		9	0.8	6.2E-2						
Runterregulierte Signalwege	Neurotrophin signaling pathway		22	1.5	2.0E-4	Lysosome	6	2.2	4.1E-2		
	Focal adhesion		29	2.0	5.6E-4	Selenoamino acid metabolism	3	1.1	6.6E-2		
	MAPK signaling pathway		35	2.4	8.0E-4						
	Progesterone-mediated oocyte maturation		16	1.1	1.2E-3						
	Apoptosis		16	1.1	1.3E-3						

Abb. 4.40: DAVID-Analyse der Expressionsdaten von Wilms1-CI.31-Zellen. Dargestellt sind jeweils die ermittelten hoch- und herunterregulierten Signalwege nach *WT1*-Expression. TRE-A-*WT1*^{-/-} : Zellen, die nach der Zugabe von Doxycyclin *WT1*-exprimieren. CMV-*WT1*^{-/-} : Wilms1-CI.31-Zellen, die konstitutiv *WT1*-exprimieren. Unter Count ist die Anzahl der beteiligten Gene angegeben, die in diesen biologischen Prozessen reguliert werden. Die Prozent geben an, wie groß der Anteil an der Gesamtzahl der regulierten Gene ist. Die einzelnen Signalwege sind nach ihrer Signifikanz, nach dem p-Wert angeordnet, beginnend mit der höchsten Signifikanz.

4.6 Molekularbiologische Untersuchung von Patient Wilms10

Bei der Patientin Wilms10 handelt es sich um ein zweijähriges Mädchen, bei dem eine eingekapselte Nierenmasse diagnostiziert wird. Der Wilms-Tumor (WT) wird unmittelbar nach der Diagnose entfernt und zeigt eine charakteristische triphasische Histologie mit einer fokalen Anaplasie auf, die mit einer p53-Überexpression einhergeht. Der Tumor infiltriert sowohl die Nierenkapsel (*Capsula fibrosa renalis*), als auch die Nierenbucht (*Sinus renalis*). Aber weder die Gefäße, noch der Ureter sind betroffen. Die Untersuchung der benachbarten Lymphknoten ergibt keine Infiltration mit dem Tumorgewebe und ein hochauflösendes Thorax-CT ist unauffällig. Aufgrund der Anaplasie wird der Wilms-Tumor dem dritten Stadium zugeordnet und gemäß den NWTSG5-Kriterien mit Actinomycin D, Doxorubicin und Vincristin behandelt.

Neben den Chemotherapeutika erfolgt eine sechsmonatige Bestrahlung in Form einer Radiotherapie. Während einer Routineuntersuchung wird sechs Monate nach der Behandlung ein einzelner Knoten in der Lunge diagnostiziert und operativ entfernt. Der histologische Befund belegt einen monomorphen rhabdomyomatösen Tumor, ohne fokale Anaplasie und nur eine geringe Menge positiver Ki67-Zellen. Nach der Entfernung des Knotens erhält die Patientin bis zu ihrem fünften Lebensjahr monatlich Vincristin und Actinomycin D. Bei dieser

Wilms10-Patientin können 3,5 Jahren nach der Erstdiagnose keine weiteren Tumore diagnostiziert werden, das heißt, es liegt bis zum heutigen Zeitpunkt eine komplette Remission vor. Da es sich um einen stromareichen WT handelt und eine große Menge positiver Ki67-Zellen vorliegt, wird eine *WT1*-Mutationsanalyse angefordert.

4.6.1 *WT1*- und *CTNNB1*-Mutationsanalyse

Aufgrund des diagnostizierten Wilms-Tumors in der linken Niere von Wilms10, werden alle zehn Exons des *WT1*-Gens amplifiziert und mittels DHPLC untersucht, wobei Exon 8 und 9 direkt sequenziert werden. Weder im Blut, noch im Tumor von Wilms10 kann eine pathogene Mutation nachgewiesen werden. Diese Analyse findet im hiesigen Institut statt (Daten nicht gezeigt). Nachdem bei Wilms10 nach einer sechsmonatigen Radiochemotherapie eine Metastase in der Lunge mit rhabdomyomatöser Histologie diagnostiziert wird, folgt eine MLPA-Untersuchung (*multiplex ligation-dependent probe amplification*) der Blut-, Tumor- sowie Metastasen-DNA von Wilms10 (siehe Abb. 4.41). Dafür wird das Kit P118 der Firma MRC-Holland verwendet und die Analyse von Dr. med. Leube durchgeführt.

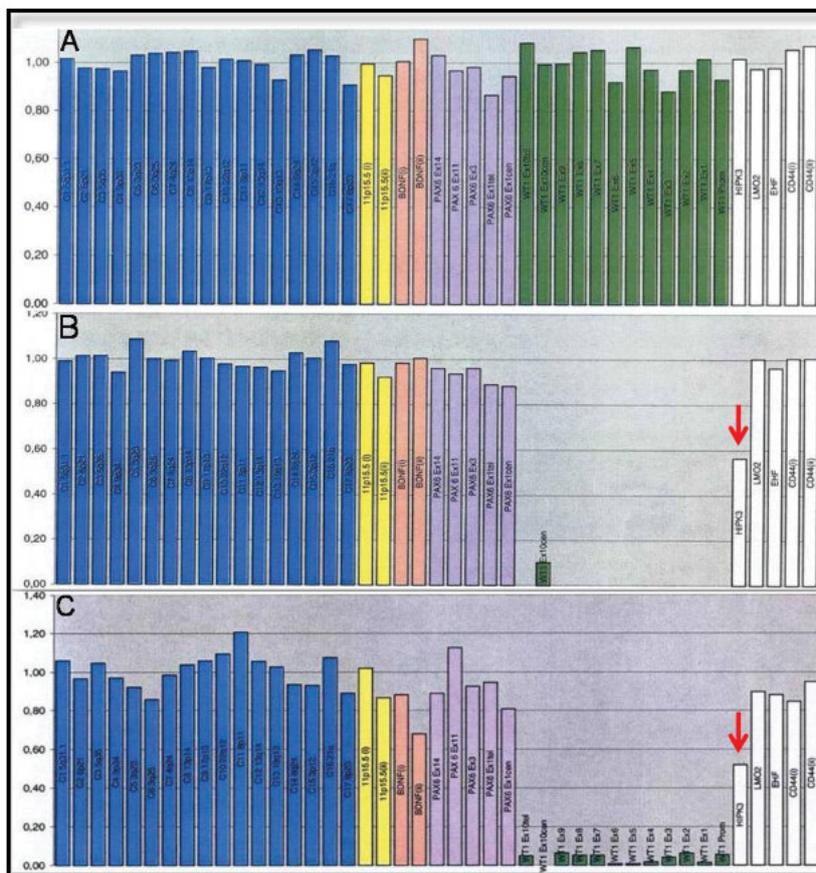


Abb. 4.41: MLPA-Analyse der Blut, Tumor und Metastasen-DNA von Wilms10.

MLPA-Analyse von **A:** Blut, **B:** Tumor, **C:** Metastasen-DNA. Die roten Pfeile markieren das *HIPK3*-Gen.

Im Blut von Wilms10 zeigt die MLPA-Analyse ein wildtypisches Muster für das *WT1*- Gen auf (Abb. 4.41 A). Im Tumor hingegen liegen eine homozygote Deletion des gesamten *WT1*-Gens (Abb. 4.41 B) und eine heterozygote Deletion des benachbarten *HIPK3*-Gens vor (Abb. 4.41 B, roter Pfeil). Die untersuchte Metastasen-DNA zeigt bei allen Exons des *WT1*-Gens schwache PCR-Produkte (Abb. 4.41 C), was tendenziell dafür spricht, dass bei der DNA-Isolierung nicht ausschließlich Zellen enthalten sind, die von dem Tumor bzw. der Metastase abstammen. Die heterozygote Deletion des *HIPK3*-Gens kann auch in der Metastase nachgewiesen werden (Abb. 4.41 C, roter Pfeil). Die MLPA-Ergebnisse zeigen, dass die Wilms10-Patientin eine tumorspezifische homozygote *WT1*-Deletion und eine heterozygote *HIPK3*-Deletion aufweist. Dieses Resultat impliziert, dass es sich um einen *WT1*-assoziierten Wilms-Tumor handelt.

Häufig zeigen Wilms-Tumore, die eine *WT1*-Mutation tragen, auch eine Mutation im *CTNNB1*-Gen auf. Die überwiegenden genetischen Aberrationen befindenden sich dabei in der Hotspot-Region im Exon 3 des *CTNNB1*-Gens (Koesters et al., 1999). Die DNA-Sequenzierung, die direkt aus dem Tumor und der Metastase von Wilms10 isoliert wird, zeigt zwei unterschiedliche Mutationen im Exon 3 des *CTNNB1*-Gens (Abb. 4.42).

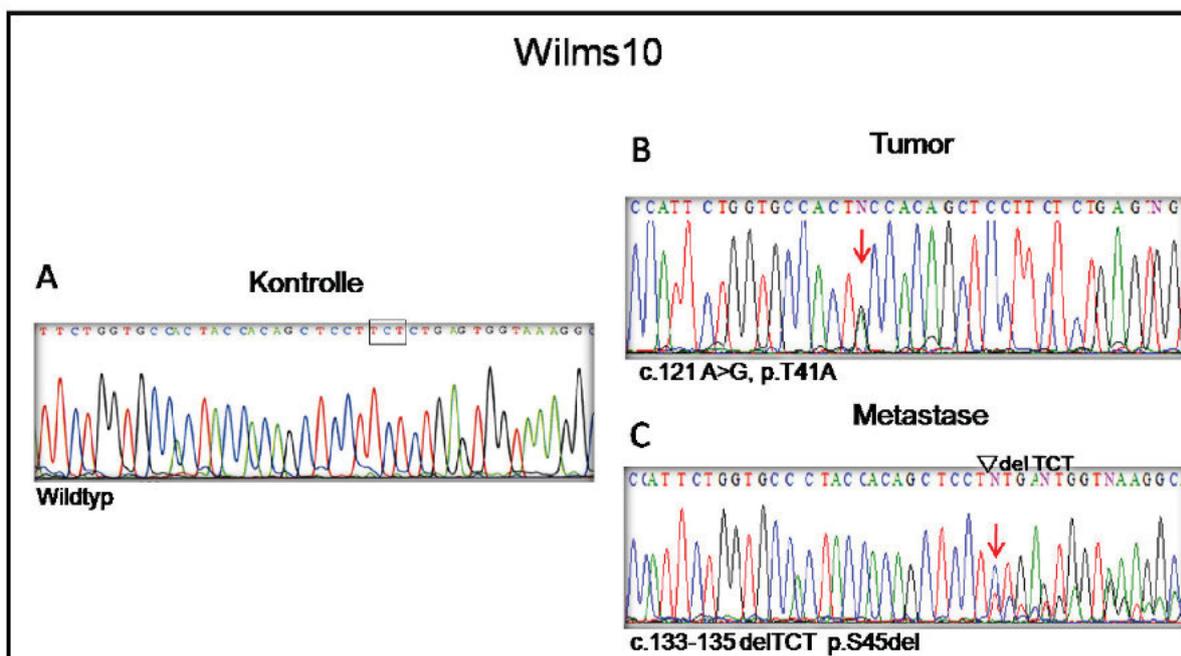


Abb. 4.42: Sequenzierung von Exon 3 des *CTNNB1*- Gens von Wilms10. **A:** Isolierte DNA aus dem Blut der Patientin. **B:** DNA direkt aus dem Tumor von Wilms10 isoliert, die heterozygote Mutation ist mit einem roten Pfeil gekennzeichnet **C:** Direkte Isolierung aus der Metastase von Wilms10, der rote Pfeil gibt die Position der heterozygoten Deletion an.

Im Tumor liegt an Position c.121 eine heterozygote Punktmutation vor (Abb. 4.42 B). Der Austausch von A (Adenin) zu G (Guanin) bewirkt auf der Aminosäureebene einen Wechsel

von Threonin zu Alanin. In der Metastase hingegen ist eine heterozygote Deletion an Position c.133-135 erkennbar (Abb. 4.42 C). Der Verlust der Basen TCT führt zum Verlust der Aminosäure Serin an Position p.45. Das verdeutlicht, dass die Mutationen im Exon 3 des *CTNNB1*-Gens, in dem Tumor und der Metastase in ihrer Art und Position unterschiedlich sind.

4.6.2 Etablierung der Wilms10 Zellkultur und deren weiterführende Untersuchung

Der Tumor und die Metastase von Wilms10 werden entsprechend des etablierten Protokolls für die Kultivierung der primären Zellen aus dem Tumorgewebe behandelt (siehe 3.1.1). Dazu wird das Metastasen- und Tumormaterial zerkleinert und anschließend in T12,5 cm Ø Zellkulturflaschen mit sehr wenig MSCB-Medium kultiviert. Nachdem sich die Gewebestückchen abgesetzt haben, wachsen unter optimalen Kulturbedingungen die ersten Zellen heraus, welche die primäre Zellkultur vom Tumor bzw. der Metastase bilden (Abb. 4.43).

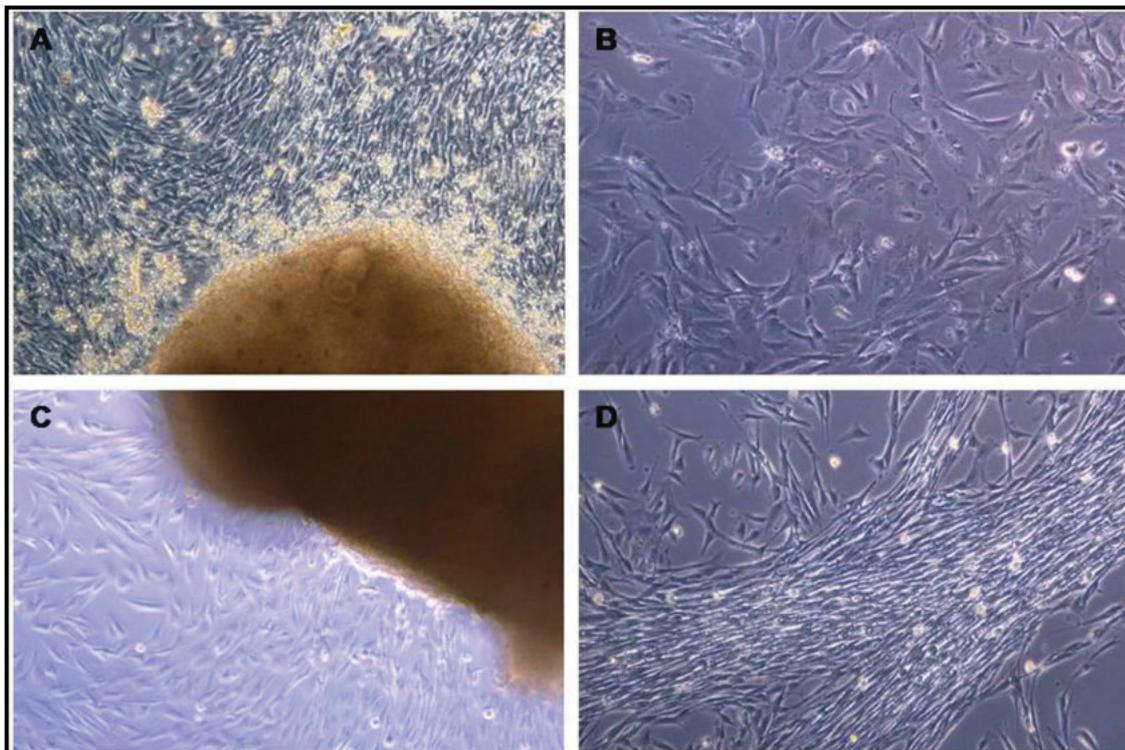


Abb. 4.43: Etablierung und Kultivierung der Wilms10-Tumor Zellen und Wilms10-Metastasen Zellen. A: Wilms10-Tumorstück und die aus diesen wachsenden Zellen. **B:** Passage 7 der Wilms10- T Zellkultur. **C:** Wilms10- Metastasenstück und die aus diesem auswachsenden Zellen. **D:** Passage 3 der Wilms10-M Zellkultur. (20-fache Vergrößerung im Phasenkontrastmikroskop).

Aus dem Tumor und der Metastase von Wilms10 können erfolgreich Zellen etabliert (Abb. 4.43 A und C) und über mehrere Passagen kultiviert werden (Abb. 4.43 B und D). In der Regel ist die Lebensspanne von Wilms-Tumorzellen in der Zellkultur stark limitiert und ihre

Etablierung sehr schwierig (Garvin et al., 1987; Hazen-Martin et al., 1993). Dass eine Langzeitkultivierung von *WT1*-assoziierten Wilms-Tumoren möglich ist, wird bereits 2010 von Royer-Pokora detailliert beschrieben (Royer-Pokora et al., 2010).

Es ist festzuhalten, dass die Zellen, die aus dem Tumor und der Metastase kultiviert werden, sich morphologisch voneinander unterscheiden. Die Zellen aus dem Tumor ähneln mesenchymalen Zellen (Abb. 4.43 B), die kultivierten Zellen aus der Metastase sind eher langgestreckt und haben damit Ähnlichkeit mit Myoblasten. Die Lebensspanne von Wilms10-M liegt deutlich unter der von Wilms10-T. Bereits nach der fünften Passage findet keine Zellteilung mehr statt. Die Wilms10-T-Zellen werden bis Passage 13 kultiviert und anschließend eingefroren (siehe 3.1.4). Die maximal mögliche Passagenanzahl von Wilms10-T ist bisher nicht bestimmt worden.

CTNNB1-Mutationsanalyse

Die etablierte Tumor- und Metastasen-Zelllinie wird jeweils auf ihre *CTNNB1*-Mutation hin überprüft. Dies dient zum Abgleich der etablierten Zelllinien mit dem ursprünglichen Tumor bzw. der Metastase. Wie schon beschrieben, hat der Tumor eine heterozygote Punktmutation an Position c.121 im *CTNNB1*-Gen, hier liegt ein Austausch von A (Adenin) zu G (Guanin) vor (Abb. 4.44. A). Die etablierte Zelllinie, die dem Tumor entstammt, hat eine homozygote Deletion der drei Nukleotide TCT an Position c.133-135 (Abb. 4.44. B). Dadurch kommt es zum Verlust der Aminosäure Serin an Position p.45. Die im Tumor vorliegende Mutation an Position c.121 (A>G) ist in der Wilms10-T-Zelllinie nicht auffindbar.

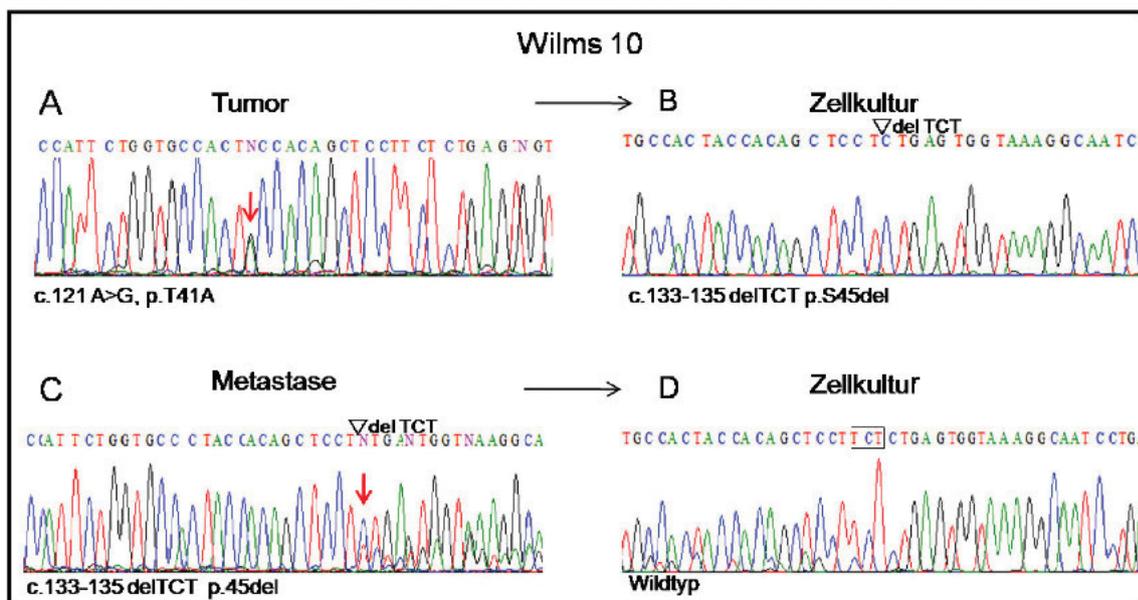


Abb. 4.44: Sequenzierung von Exon 3 des *CTNNB1*-Gens. DNA wird aus Tumor, Metastase und der dazugehörigen Zellkultur isoliert. A: Direkte DNA-Isolierung aus dem Tumor von Wilms10. **B:** DNA aus der Zellkultur von Wilms10-T isoliert. **C:** DNA direkt aus der Metastase isoliert. **D:** DNA aus der Zellkultur von Wilms10-M isoliert. Roter Pfeil markiert die Position der Mutation. Die von der Deletion betroffenen Basen TCT sind durch einen schwarzen Kasten hervorgehoben.

Die in der Metastase zuvor detektierte heterozygote Deletion (del TCT) im Exon 3 des *CTNNB1*-Gens auf Position c.133-135 (Abb. 4.44.C) kann in der etablierten Zelllinie, die der Metastase entstammt, nicht mehr nachgewiesen werden. In diesem Fall liegt eine wild-typische Sequenz im Exon 3 des *CTNNB1*-Gens vor (Abb. 4.44.D).

qRT-PCR-Analyse von Wilms10-T Zellkultur

Neben der *CTNNB1*-Mutationsanalyse wird mit Hilfe der qRT-PCR die *WT1*-Expression in der Wilms10-T-Zelllinie überprüft. Durch die zuvor durchgeführte MLPA-Analyse des Tumors von Wilms10 kann eine homozygote Deletion des *WT1*-Gens nachgewiesen werden. Auf dieser Grundlage ist zu erwarten, dass bei der etablierten Zellkultur von Wilms10-T keine nachweisbare *WT1*-Expression detektierbar ist, unter der Voraussetzung, es handelt sich bei den kultivierten Zellen um reine Tumor-Zellen. Für die qRT-PCR-Analyse wird die RNA aus der Passage 3 und 7 von Wilms10-T isoliert und anschließend in cDNA umgeschrieben. Als Positivkontrolle wird die RNA aus der Passage 9 der Wilms1-Zelllinie verwendet, die ebenfalls in cDNA umgeschrieben wird. Die Wilms1-Zelllinie trägt eine homozygote Punktmutation im Exon1 des *WT1*-Gen an der Position c.149. Durch den Austausch von C zu A wird ein Stopcodon generiert (*nonsense mutation*) und es kommt zum vorzeitigen Abbruch des Proteins an der Position S50 (p.S50X). Derartige Mutationen werden von dem *nonsense-mediated mRNA decay* Kontrollmechanismus erkannt und es kommt zu einem vorzeitigen Abbau der verkürzten mRNA (Gatfield et al., 2003). Eine minimale *WT1*-mRNA-Expression kann jedoch in zahlreichen vorangegangenen Experimenten nachgewiesen werden.

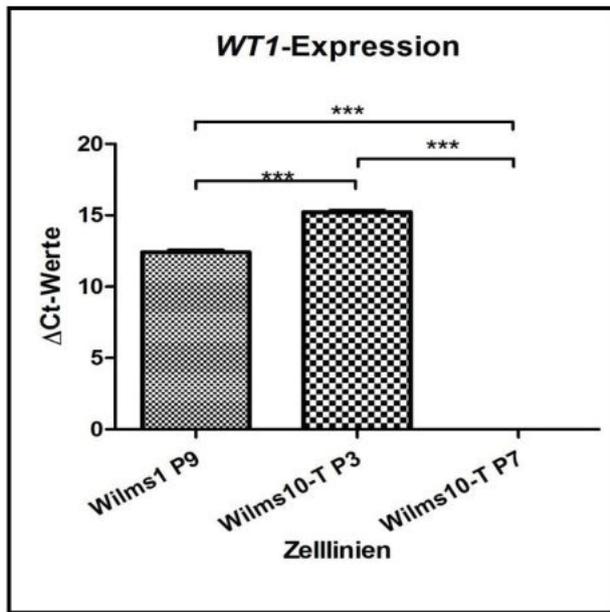


Abb. 4.45: Grafische Darstellung der qRT-PCR-Ergebnisse der *WT1*-Expression in den Zelllinien Wilms1 und Wilms10-T. Abgebildet sind die ΔC_T -Mittelwerte der *WT1*-Expression, bezogen auf *RER1* (Referenzen). Die Signifikanz wird mittels t-Test bestimmt. Für die Verteilung der Signifikanz gilt * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ (P= Passage).

In der dritten Passage von Wilms10-T wurden noch *WT1*-Transkripte nachgewiesen. Verglichen mit Wilms1 P9, ist die Menge an *WT1*-Molekülen bei Wilms10-T P3 signifikant erhöht. Dagegen ist auch nach 40 Zyklen bei Wilms10-T P7 keine *WT1*-mRNA messbar (Abb. 4.45). Der durchgeführte t-Test zeigt, dass alle gemessenen Proben zueinander einen hoch signifikanten Unterschied zeigen ($p \leq 0,001$). Dies zeigt, dass zu Beginn der Kultivierung der Tumorzellen noch normale Zellen vorliegen und erst nach sieben Passagen nur noch Tumorzellen vorhanden sind.

Zytopenetische Untersuchung der Wilms10-T- und -M-Zelllinie

Nach erfolgreicher Etablierung der Wilms10-Tumor- und Metastasen-Zellkultur wird im hiesigen Institut (Abteilung für Tumorzytogenetik) eine zytopenetische Untersuchung der zwei Zelllinien durchgeführt. Die beiden Zelllinien zeigen einen normalen Karyotyp 46, XX (Abb. 4.46) was bedeutet, dass keine zytopenetisch erfassbaren chromosomalen Aberrationen vorliegen. Die Nachweisgrenze für strukturelle Veränderungen bei der konventionellen Chromosomenanalyse beträgt 5-10 Mb.

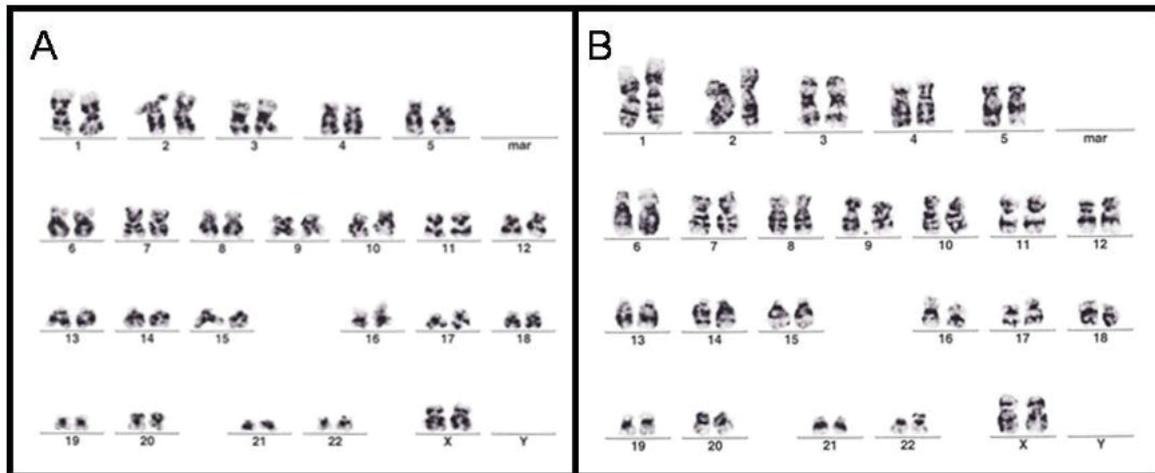


Abb. 4.46: Darstellung von zwei Karyogrammen. Ein diploider Chromosomensatz 46, XX ohne auffällige zytogenetische Aberrationen **A:** Von Wilms10-Tumor Passage 7 **B:** Von Wilms10-Metastase Passage 5.

4.6.3 Array basierende CGH/SNP-Analyse

Um eine detaillierte Aussage über den *WT1*-Status bzw. die Größenordnung der vorliegenden Deletion auf Chromosom 11 der Patientin Wilms10 zu treffen, wird ein 2x400K Oligonukleotid aCHG/aSNP Microarray der Firma Agilent durchgeführt. Mit diesem Array-Format sind neben Deletionen und Amplifikationen auch genomische Kopienzahlveränderungen sowie kopienzahlneutrale Veränderungen, wie *uniparentale Disomie* (UPD) und *Loss of heterozygosity* (LOH) nachzuweisen. Untersucht wird die DNA, die direkt aus dem Tumor und der Metastase isoliert wird. Auch die DNA der etablierten Zellkultur vom Tumor und der DNA, die direkt aus dem Tumor von Wilms10 isoliert wird, ist eine homozygote Deletion von 226 kb (Logratio > -4) nachweisbar. Sie umfasst das *WT1*-Gen sowie einige benachbarte Oligonukleotide (Abb. 4.40 A). Zusätzlich liegt eine 1.05 Mb große heterozygote Deletion vor, welche unmittelbar upstream am *WT1*-Gen startet und die Gene *EIF3M*, *CCDC73*, *PRRG4*, *QSER1*, *DEPDC7*, *TCP11L1*, *CSTF3* und *HIPK3* umfasst. Auf dem Chromosomenabschnitt 11p15pter wird eine *uniparental disomy* (UPD) lokalisiert, deren Spannweite 12.8 Mb beträgt (Chromosomen-Position: 219.089-13.058.405).

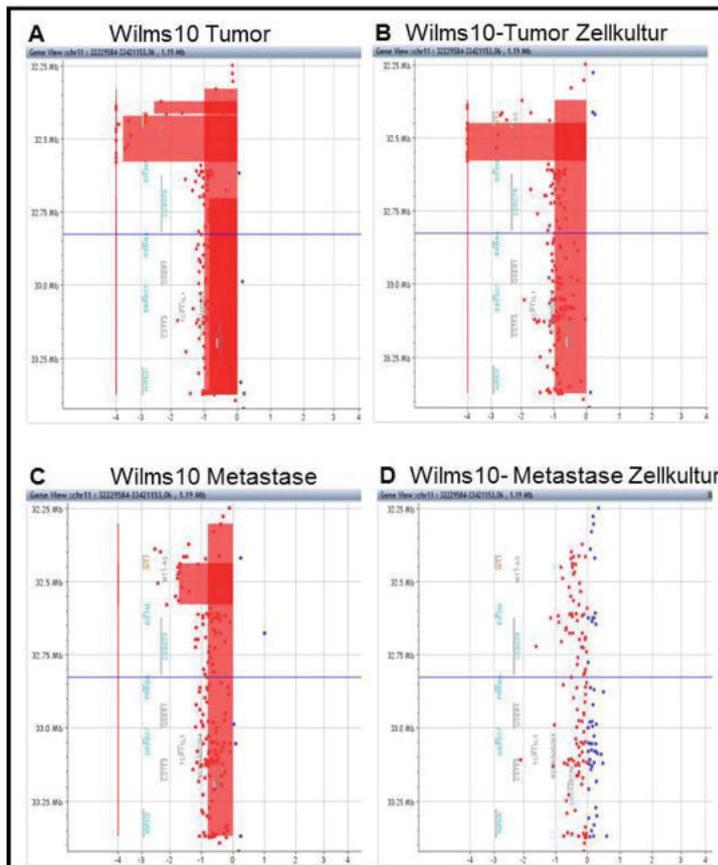


Abb. 4.47: aSNP/aCGH Array-Analyse der 11p13 homozygoten und heterozygoten *WT1*-Deletion. A: DNA-Isolierung direkt aus dem Wilms10-Tumor. **B:** DNA-Analyse aus der Zellkultur von Wilms10-Tumor (Passage 8). **C:** Direkte DNA-Isolierung aus der Metastase. **D:** DNA-Analyse aus der Zellkultur der Metastase (Passage 5).

Eine weitere UPD liegt auf 3p21.3pter und hat eine Größe von 40.3 Mb (Chromosomen Position: 107.994-49.449.638). In diesem Bereich liegt das mit WT assoziierte *CTNNB1*-Gen. Außerdem konnte auf 1p eine weitere kleinere UPD-Region von 3.7 Mb detektiert werden (Chromosomen-Position: 568.868.276-60.605.708). Identische Ergebnisse liefert die analysierte DNA, die aus den kultivierten Tumorzellen (Passage 8) isoliert wird (Abb. 4.47 B). Auch hier ist unter anderem die homo- und heterozygote Deletion vorzufinden. Das aCHG/aSNP-Resultat bestätigt somit, dass die kultivierten Zellen aus einer reinen Population von Tumorzellen bestehen.

Die Analyse der DNA, die direkt aus der Lungenmetastase isoliert wird, zeigt die gleiche *WT1/11p13*-Deletion (Abb. 4.47 C), wie die Tumor-DNA von Wilms10, allerdings mit einer geringeren *log ratio*. Die geringe Logration von -1.8 in der DNA der Lungenmetastase ist ein Indiz dafür, dass die homozygote Deletion des *WT1*-Gens nicht in allen Zellen vorhanden ist. Hingegen weist die DNA, die aus der etablierten Metastasen-Zellkultur (Passage 5) stammt ein unauffälliges Hybridisierungsmuster auf (Abb. 4.47 D). Es ist weder die tumor-spezifische homozygote *WT1*, noch die heterozygote 11p13-Deletion nachzuweisen. Das Fehlen dieser spezifischen Mutationen in der Zellkultur ist ein Nachweis dafür, dass die etablierten Zellen nicht die genetische Aberration der Metastase tragen und die kultivierten

Zellen somit nicht diejenigen sind, die die Metastase der Wilms10-Patientin gebildet haben. Dies bedeutet, dass die kultivierten Zellen, normalen Zellen von der Patientin entsprechen.

4.6.4 Custom-Array

Ein 4x44K Oligonukleotid-Custom-Array wird designt, um durch eine hochauflösende Abdeckung der Region 11p13 die Position der homozygoten bzw. heterozygoten Deletion genauer zu bestimmen. Die Hybridisierung der DNA, die aus der Zellkultur vom Tumor etabliert wird, erfolgt gegen eine entsprechende weibliche Referenz-DNA. Gleichermäßen wird die DNA behandelt, die direkt aus der Metastase isoliert wird. Die untersuchten DNAs zeigen ein ähnliches Muster der homozygoten und heterozygoten Deletionen untereinander

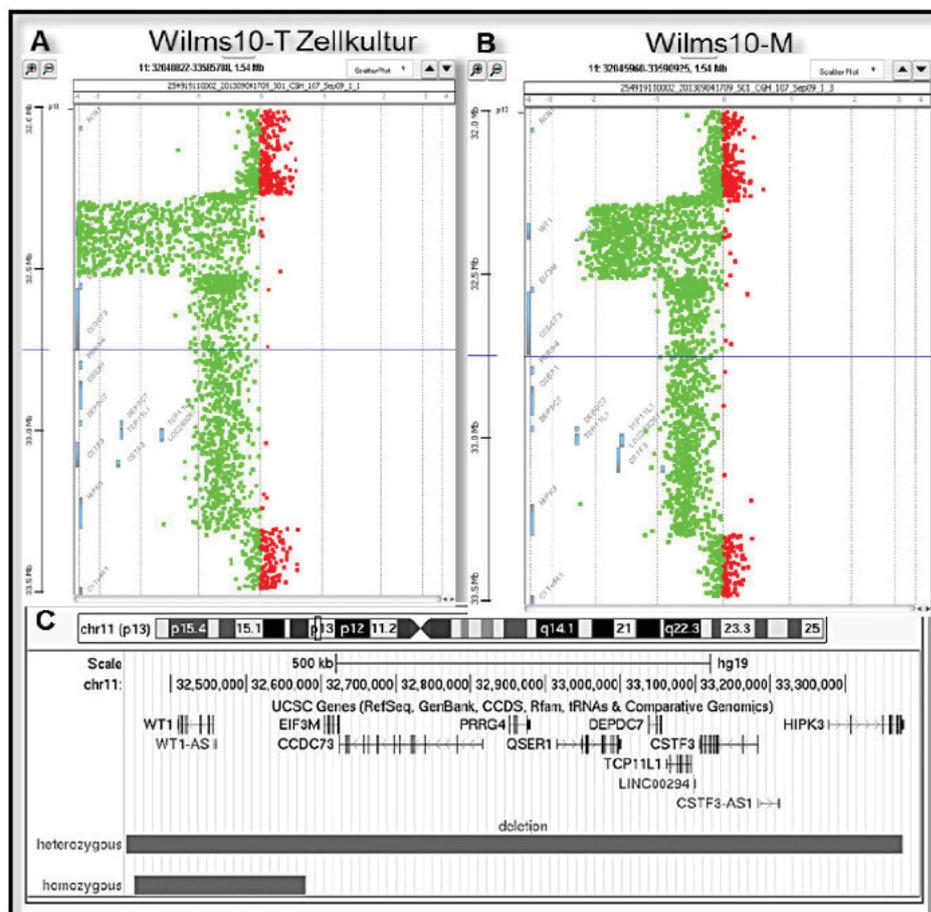


Abb. 4.48: Charakterisierung der homozygoten/heterozygoten Wilms10-*WT1*-Deletion mittels *aCGH custom Array*. **A:** Hybridisierung der DNA, die aus der etablierten Zellkultur vom Tumor zu Passage 8 isoliert wird. **B:** *aCGH*-Array von der Hybridisierung der DNA, die direkt aus der Lungenmetastase isoliert wird. **C:** Genaue chromosomale Positionsangabe der homozygoten und heterozygoten Deletion von 11p13 (Darstellung durch die Zuhilfenahme des *UCSC-Genome Browsers*).

auf (Abb. 4.48 A und B) und verifizieren sowie präzisieren die vorher dargestellten Ergebnisse der aCGH/aSNP (siehe 4.3.3). Die heterozygote Deletion in der DNA aus der Zellkultur vom Tumor erstreckt sich von 32.325.826 bis 33.376.575 auf Chromosom 11. Innerhalb dieser befindet sich die homozygote Deletion, die an der Position 32.351.861 startet und bei 32.579.832 auf Chromosom 11 endet.

Die untersuchte Metastasen-DNA von Wilms10 zeigt eine nur minimal abweichende Position der heterozygoten und homozygoten Deletion in 11p13. Die heterozygote Deletion liegt dabei zwischen 32.323.944 und 33.377.234, die homozygote zwischen 32.351.497 und 32.580.825 auf Chromosom 11. Eine Übersicht über die heterozygote/homozygote Deletion ist in Abbildung 4.10 C dargestellt und veranschaulicht die genaue Position auf dem Chromosom 11 sowie das Größenverhältnis zueinander. Die geringe *Log Ratio* in der Metastasen-DNA deutet darauf hin, dass ca. 75% der Zellen in der Probe der Lungenmetastase eine homozygote Deletion tragen.

4.6.5 Expressionsanalysen von Wilms10

Die Auswirkung einer Langzeitchemotherapie auf Wilms-Tumore wird am Fallbeispiel von Wilms10 untersucht. Hier steht der primäre Wilms-Tumor - der unmittelbar nach der Diagnose operativ entfernt wird und keine präoperative Behandlung erfährt - gegenüber der Lungenmetastase, die nach einer sechsmonatigen postoperativen Radiochemotherapie entstanden ist. Für die Genexpressionsanalyse wird die gesamte RNA aus dem primären Tumor (WT) und der Lungenmetastase von Wilms10 isoliert und auf einem 4x44K *Whole Human Genome Oligo Microarray* (Agilent) hybridisiert. Die Anwesenheit von intakter Metastasen-RNA deutet darauf hin, dass die Tumorzellen nach der Langzeitchemotherapie immer noch vital sind. In die Analyse fließen acht weitere Proben von *WT1*-assoziierten Wilms-Tumore mit ein. Diese wurden bereits im hiesigen Institut molekularbiologisch charakterisiert, damit die Expressionsdaten zu Vergleichszwecken in die vorliegende Auswertung mit einfließen können. Welche Tumore behandelt werden, welche Chemotherapeutika die einzelnen Patienten erhalten und welchen Zeitraum die Behandlung in Anspruch nimmt, verdeutlicht Tabelle 4.3.

Die Datenanalyse wird nach folgenden Kriterien durchgeführt: Alle Expressionsdaten, die in der Lungenmetastase einen *Foldchange* von ≥ 2 mit einer Expressionsintensität von ≥ 200 gegenüber dem nicht behandelten Tumor aufweisen, werden für die weiterführende Datenauswertung berücksichtigt

Tumor	Behandlung vor der Operation	Genetische Veränderung in der Tumor-DNA
Wilms1-1r; Erster Tumor von Patient Wilms1 in der rechten Niere	4 Wochen mit Actinomycin D und Vincristin	<i>WT1</i> : homozygot p.S50X, <i>CTNNB1</i> : heterozygot pS45Δ
Wilms1-1l; Erster Tumor von Patient Wilms1 in der linken Niere	4 Wochen mit Actinomycin D und Vincristin	<i>WT1</i> : homozygot p.S45X, <i>CTNNB1</i> : heterozygot p.S45P
Wilms1-2r; Zweiter Tumor von Patient Wilms1 in der rechten Niere	Keine Behandlung vor Operation	<i>WT1</i> : homozygot p.S50X, <i>CTNNB1</i> : heterozygot p.S45C
Wilms1-2l; Zweiter Tumor von Patient Wilms1 in der linken Niere	Keine Behandlung vor Operation	<i>WT1</i> : homozygot p.S50X, <i>CTNNB1</i> : heterozygot p.S45F
Wilms2	Keine Behandlung vor Operation	<i>WT1</i> : homozygot p.R362X, <i>CTNNB1</i> heterozygot p.S45F
Wilms3*	4 Wochen mit Actinomycin D und Vincristin	<i>WT1</i> : homozygot p.V432fsX87, <i>CTNNB1</i> : wildtypisch
Wilms4 (WAGR)	Keine Behandlung vor Operation	<i>WT1</i> : Deletion und hemizygot p.H438Pfs79, <i>CTNNB1</i> : heterozygot S45Δ
Wilms6	Insgesamt 8 Wochen: 4 Wochen Actinomycin D und Vincristin zusätzlich 4 Wochen mit Doxorubicin	<i>WT1</i> : homozygot R390X, <i>CTNNB1</i> : homozygot p.S45Δ
Wilms10*	Keine Behandlung vor Operation	<i>WT1</i> : homozygot deletiert und heterozygote 11p13 Deletion <i>CTNNB1</i> : heterozygot p.T41A
Wilms10 Lungenmetastase	NWTSG5 Protokoll; Behandlung DD-4A mit Actinomycin D, Vincristin und Doxorubicin, zusätzlich Strahlentherapie, Behandlungsdauer insgesamt 6 Monate	<i>WT1</i> : homozygot deletiert und heterozygote 11p13 Deletion <i>CTNNB1</i> : p.S45Δ

Tab. 4.3: Übersicht über die Behandlung der Wilms-Tumor Patienten und ihre genetischen Aberrationen

*Diese Patienten haben eine somatische/tumorspezifische *WT1*-Mutation

Nach diesen festgelegten Kriterien wird ein Datensatz von 1619 hochregulierten Genen (*up-regulated*) und ein Datensatz von 1801 herunterregulierten Genen (*down-regulated*) in der Lungenmetastase identifiziert (TATAR). Die regulierten Gene werden mit Hilfe der internetbasierenden Plattform *MetaCore* auf ihre biologischen Funktionen hin untersucht. Dabei wird das implementierte Tool *process networks* für die Identifizierung von biologischen

Prozessen, die mit den regulierten Genen in Zusammenhang stehen können, verwendet. Das Tool ist eine Kombination aus den wichtigsten zellularen Prozessen der *pathway maps* und *network models* und basiert auf Gen-Ontologie-Prozessen.

Die ersten 15 signifikanten *networks* sind in Abbildung 4.49 dargestellt. Die Analyse der hochregulierten Gene zeigt, dass die beteiligten Gene an der Skelettmuskelentwicklung (*development_skeletal muscle development*) mit einem Wert von $p=5.97^{-30}$ die höchste Signifikanz haben, gefolgt von der Muskelkontraktion (*muscle contraction*), die einen Wert von $p=4.84^{-29}$ zeigt (Abb. 4.49). Eine detaillierte Darstellung der beteiligten Gene an der Skelettmuskelentwicklung und welche von ihnen in der Lungenmetastase reguliert sind, ist in Abbildung 4.43 zu sehen. Von insgesamt 144 Genen, die an diesem *network* beteiligt sind, werden über 50% nach der Chemotherapie in der Lungenmetastase von Wilms10 reguliert. Die Skelettmuskelentwicklung wird durch eine Genfamilie von Transkriptionsfaktoren gesteuert, die als myogene regulatorische Faktoren (MRF) bezeichnet werden. Zu diesen Faktoren zählen unter anderen MYOD, MYF5, MYOG und MYF6 (MRF4), deren Expression in der Lungenmetastase hochreguliert ist (Abb. 4.43).

#	Networks	0	3	6	9	12	15	18	21	24	-log(pValue)	pValue ↑
1	Development_Skeletal muscle development											5.97e-30
2	Muscle contraction											4.839e-29
3	Cell adhesion_Leucocyte chemotaxis											1.476e-11
4	Inflammation_Complement system											4.248e-11
5	Cytoskeleton_Actin filaments											4.758e-11
6	Cytoskeleton_Regulation of cytoskeleton rearrangement											7.120e-10
7	Immune response_Phagocytosis											7.596e-8
8	Development_Neuromuscular junction											2.101e-7
9	Chemotaxis											3.044e-7
10	Cell adhesion_Platelet aggregation											5.056e-7
11	Cell adhesion_Attractive and repulsive receptors											2.257e-4
12	Cell adhesion_Integrin-mediated cell-matrix adhesion											3.237e-4
13	Inflammation_Neutrophil activation											3.570e-4
14	Cardiac development_BMP_TGF beta signaling											8.275e-4
15	Cardiac development_Wnt_beta-catenin, Notch, VEGF, IP3 and integrin signaling											1.499e-3

Abb. 4.49: Hochregulierte Signalwege in der Lungenmetastase von Wilms10 gegenüber dem Tumor nach der Chemotherapie. *Meta Core*-Analyse der hochregulierten Gene in der Metastase und die daraus resultierenden 15 signifikanten *network* Prozesse, nach p-Wert sortiert.

Die beiden Faktoren MYOD und MYF5 sind jeweils für die Determinierung von myogenen Zellen zuständig, während MYOG und MRF4 mit der terminalen Differenzierung von Skelettmuskeln und mit der Homöostase von Myofibrillen assoziiert sind (Tapscott, 2005; Singh und Dilworth, 2013). Ein Indiz dafür, dass die terminale Differenzierung der Skelettmuskeln in der Lungenmetastase induziert wird, ist die sechsfach höhere Expression an *MYOG* und die 749-fach höhere Expression an *MRF4* als im Tumor. Bestätigt wird das Ganze durch ebenfalls erhöhte Expressionswerte an den Genen, die für schwere und leichte Myosinketten kodieren, wie *MYH8* (9643-fach), *MYL1* (4360-fach), *MYLPPF* (3040-fach) und die embryonalen Marker für die Skelettmuskelentwicklung *MYL4* (2179-fach) und *MYH7* (1069-

fach). Weitere Gene wie *ACTA1* (Actin, alpha 1, skeletal muscle), *DES* (Desmin), *MYOT* (Myotilin) und *TTN* (Titin), die in der Skelettmuskulatur exprimiert werden, zeigen in der Lungenmetastase eine erhöhte Expression auf.

Die bisher vorliegenden Daten belegen, dass eine Langzeitchemotherapie bestimmte Gene, die während der Skelettmuskeldifferenzierung essential sind, induziert. Ein weiterer signifikanter *network process*, der identifiziert wird, ist der *cardiac development_BMP_TGF-beta signaling pathway* mit einem Wert von $p = 8.27^{-4}$. Hier zeigt die Lungenmetastase von Wilms10 gegenüber dem Tumor eine erhöhte Expression an Genen, die charakteristisch für reife Kardiomyozyten sind. In diesem Fall zählen dazu die Gene *TNNT2*, *TNNC1*, *MYL2*, *MYH7*, *VEGFR2*, *NKX2-5*, *ACTC1* und *TBX1*. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Langzeitchemotherapie verschiedene differenzierungsrelevante Gene induziert.

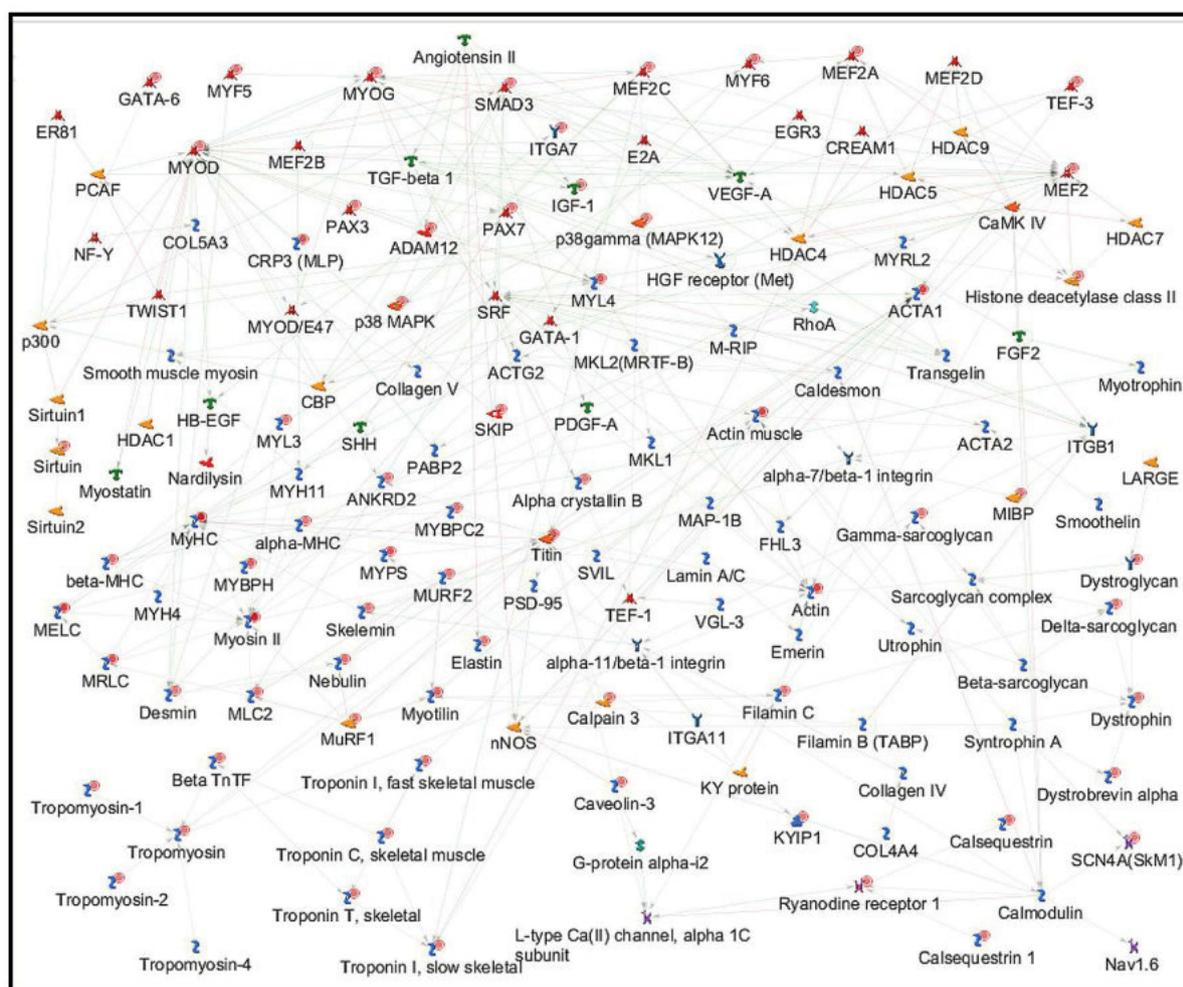
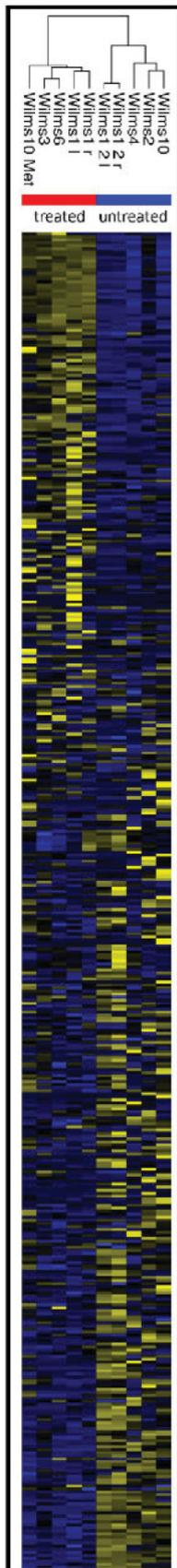


Abb. 4.50: Process-Network Darstellung der Skelettmuskelentwicklung und der beteiligten Gene bei der Wilms10-Metastase. Dargestellt sind alle an der Skelettmuskelentwicklung beteiligten Faktoren. Die hochregulierten Gene sind mit einem roten Kreis über dem Gensymbol markiert.

Die Analyse der herunterregulierten Gene zeigt, dass ein hoher Anteil von ihnen an der Regulation des Zellzyklus beteiligt ist. Dabei können den Genen folgende Networks zugeordnet werden: Die Regulation der S-Phase vom Zellzyklus mit einem Wert von $p=8.94^6$ (*Cell cycle S phase*), die Regulation von Wachstumsfaktoren während der G1-S-Phase vom Zellzyklus mit einem Wert von $p=1.78^4$ (*Cell cycle G1-S growth factor regulation*) und die Regulation der G2/M-Phase des Zellzyklus mit einem Wert von $p=4.78^3$ (*Cell cycle G2/M*).

Es ist bekannt, dass während der Differenzierung der Skelettmuskulatur der Zellzyklus herunterreguliert wird. Die beiden Prozesse der Differenzierung und der Proliferation sind gegenläufig gerichtet und können somit nicht gleichzeitig stattfinden. Faktoren wie p21, die bei differenzierenden Myocyten exprimiert werden, inhibieren gleichzeitig den Cyclin E/CDK2-Komplex, der für die Regulation der Myoblastenproliferation zuständig ist (Piette 1997; Galderisi et al., 2003). Weitere signifikant regulierte Prozesse, die bei der Analyse der Expressionsdaten identifiziert werden, sind an der DNA-Reparatur beteiligt (*DNA damage repair*). Das demonstriert, dass die terminale Skelettmuskeldifferenzierung mit der "Herunterregulierung" von Genen assoziiert ist, die an der DNA-Reparatur beteiligt sind. Weitere negativ regulierte Prozesse bzw. Signalwege, die detektiert werden können, sind:

Signal Transduktion_TGF-beta, GDF und Activin Signalisierung (*signal transduction_TGF-beta, GDF and Activin signaling*), mit einer Signifikanz von $p=1.82^6$. Ein weiterer negativ regulierter Signalweg in der Metastase ist das *signal transduction_Wnt signaling* mit einem Signifikanzwert von $p=5.97^6$. Die beobachtete Repression von Genen, die zu verschiedenen Zeitpunkten vom Zellzyklus exprimiert werden und damit an differenziellen Phasen vom Zellzyklus involviert sind, kann dazu beitragen, dass die Zellen leichter aus dem Zellzyklus in die Skelettmuskeldifferenzierung übergehen. Es ist zu beobachten, dass trotz der nachgewiesenen *CTNNB1*-Mutation in der Metastase (siehe 4.6.1) die Zellen nach der Chemotherapie zu Skelettmuskelzellen differenziert sind.



Um die bisherigen Ergebnisse zu verifizieren, dass eine Langzeitchemotherapie die Differenzierung von Skelettmuskelzellen induziert, und um eine mögliche Korrelation zwischen Behandlungsdauer und dem Differenzierungsgrad der Zellen in den Tumoren aufzuzeigen, werden die Genexpressionsdaten von fünf unbehandelten und fünf behandelten *WT1*-assoziierten Wilms-Tumoren miteinander verglichen. Alle genetischen Merkmale der untersuchten Wilms-Tumore sowie deren Behandlungsart und Dauer sind in Tabelle 4.3 angegeben. Aus den Genexpressionsdaten der chemotherapierten WTs und den nicht chemotherapierten WTs wird zunächst ein Clusterbaum generiert, der aus 500 Oligonukleotidproben/Genen besteht. Diese weisen den höchsten Variationskoeffizienten der \log_2 -Intensitäten zwischen den regulierten Oligos auf, die mit Hilfe des Wards-Verfahrens und des euklidischen Abstands für das Clustern erstellt werden. Anhand der *Heatmap* lässt sich erkennen, dass jeweils die chemotherapierten und nicht chemotherapierten Wilms-Tumore eine eigene Gruppe bilden (Abb. 4.51).

Ausgehend von diesem Ergebnis erfolgt die weiterführende Analyse der Expressionsdaten mit der Spearman's Rho-Statistik, um gezielt die regulierten Gene zu extrahieren, die im Zusammenhang mit der Chemotherapie-Dauer stehen. Dabei können 1895 Gene identifiziert werden, die hochreguliert werden, und 1668 Gene, die herunterreguliert werden. Die beiden Datensets beinhalten nur Gene, die einen *Foldchange* (fc) $\geq \pm 1.5$ und eine Signifikanz von $p \leq 0.05$ aufweisen. Die beiden Datengruppen der ermittelten hoch- und runterregulierten Gene werden ebenfalls mittels der *MetaCore*-Plattform analysiert. Durch das Verfahren *process networks* werden die fünfzehn höchst signifikanten *process networks* der beiden Datensets identifiziert (Abb. 4.52). Die *MetaCore*-Analyse der fünf chemotherapierten Wilms-Tumore bestätigt die zuvor ermittelten Expressionsresultate, welche bereits die Einzelanalyse der Wilms10-Metastase ergeben hat (Abb. 4.49).

Abb. 4.51: Heatmap der 500 differenziell regulierten Gene zwischen den beiden Kohorten von chemotherapierten und nicht therapierten Wilms-Tumoren. Erstellung des hierarchischen Clusters durch die Verwendung des Wards-Verfahrens und des euklidischen Abstands. Für das Clustern werden die 500 Gene/Oligos mit dem höchsten Variationskoeffizienten der \log_2 Intensitäten verwendet

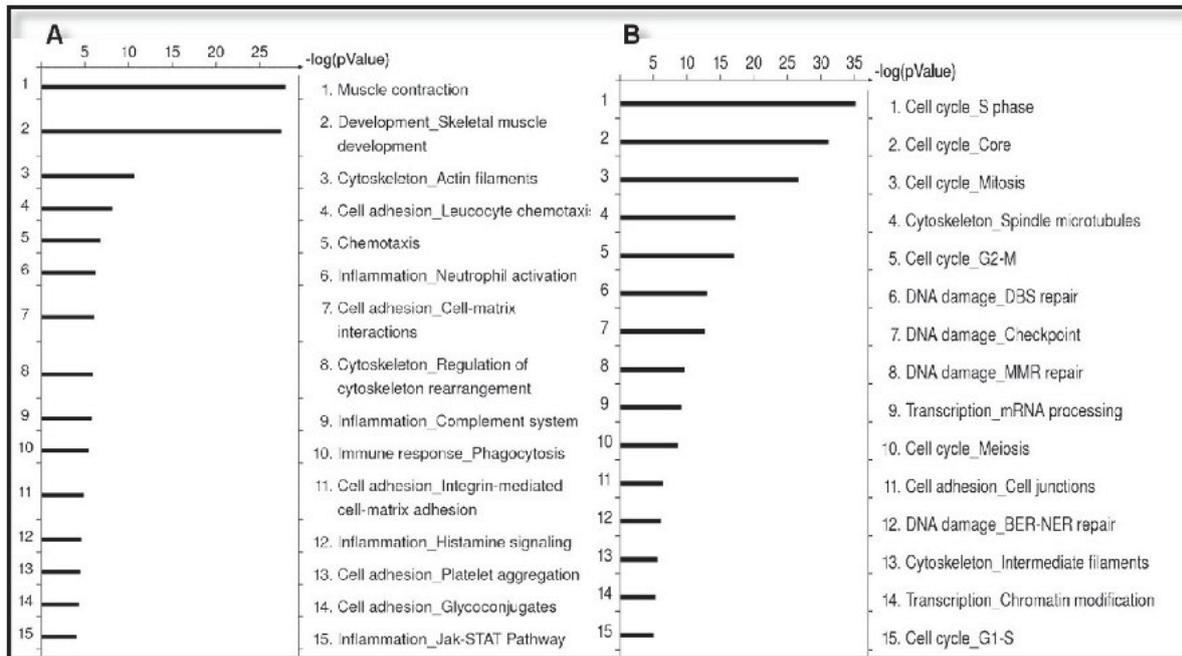


Abb. 4.52: MetaCore-Analyse von fünf präoperativ behandelten und fünf unbehandelten WT1-assoziierten Wilms-Tumoren. Die 15 signifikanten network prozesse sind nach p-Wert sortiert. A: Analyse der hochregulierten Gene in den chemotherapierten Tumoren. B: Analyse der herunterregulierten Gene.

Auch bei der Analyse der chemotherapierten Kohorte an Wilms-Tumoren gehört die Skelettmuskelentwicklung mit einer Signifikanz von $p=9.4^{-32}$ (*Development_Skeletal muscle development*) zu den am stärksten regulierten Prozessen, die ermittelt werden (Abb. 4.52 A). Hier wird deutlich, dass es nicht nur nach der Chemotherapie zur Induktion von Genen in der Wilms10-Metastase kommt, die essentiell für die terminale Skelettmuskelentwicklung sind, sondern dass dies ein gemeinsames Merkmal aller fünf chemotherapierten WTs ist. Um aufzuzeigen, dass die beiden WT-Gruppen (behandelt/unbehandelt) sich deutlich in ihrem Expressionsmuster unterscheiden, wird eine *Heatmap* erstellt, die auf den zuvor identifizierten Genen für die terminale Differenzierung der Skelettmuskulatur basiert (Abb. 4.52 A). Eine detaillierte Übersicht der Expressionsintensität der regulierten Gene, die an der terminalen Skelettmuskeldifferenzierung in den behandelten Wilms-Tumoren beteiligt sind, ist in Tabelle II vorzufinden. Die *process network*-Analyse der negativ regulierten Gene bringt unter den 15 hoch signifikanten Prozessen sechs Prozesse hervor, die mit dem Zellzyklus assoziiert sind (Abb. 4.52 B). Dabei zeigt der Signalweg, der mit der S-Phase des Zellzyklus assoziiert ist, die höchste Signifikanz ($p=2.4^{-27}$). Um die beteiligten Gene während der Skelettmuskelentwicklung und der S-Phase des Zellzyklus aufzuzeigen, wird eine *Heatmap* generiert, die auf den zuvor ermittelten Daten der *MetaCore*-Analyse basiert. In Abbildung 4.46 befinden sich nur die regulierten Gene mit ihrem entsprechenden Gensymbol, die an der Skelettmuskelentwicklung und an der S-Phase vom Zellzyklus beteiligt sind.

Das Farbschema spiegelt die relative Expressionsintensität wider (Abb. 4.53 A und B). Innerhalb dieser beiden Prozesse bilden die behandelten und unbehandelten WTs jeweils ein zusammenhängendes Cluster

Wilms Tumore												
Gen-Symbol	Behandelt						Unbehandelt					
	Wilms10 Met	Wilms3	Wilms6	Wilms1 1r	Wilms1 1l	Wilms10	Wilms4	Wilms2	Wilms1 2r	Wilms1 2l		
	Expressionsintensität (One Color Microarray)											
	Gene die an der Entwicklung der Skelettmuskulatur beteiligt sind und in den Wilms Tumoren reguliert werden											
ACTA1	235598	233576	348969	276465	248594	58	259	120087	31914	33759		
ACTA2	64923	56175	95079	48207	41211	52123	21309	20215	17261	12680		
ACTC1	223882	199585	211743	106296	95298	157	1401	67428	171998	123962		
AGT	874	1138	8366	5999	4401	773	227	850	416	685		
ANKRD2	2189	4875	29239	5408	744	47	85	680	33	49		
CAPN3	6368	7007	12034	8808	3838	288	27	651	227	158		
CASQ1	4146	777	7448	18704	16914	71	13	585	25	23		
CASQ2	5484	4686	10907	5376	4700	7	7	468	923	459		
COL5A3	427	497	661	304	632	363	12	470	120	55		
CRYAB	20018	13092	33081	46691	40287	4642	3615	9599	3564	3251		
CSRP3	43121	45918	107067	71417	94424	15	7	24060	146	436		
DES	55940	68142	111910	93954	63754	14363	1221	14521	11539	11276		
DTNA	3472	1522	3628	3591	5016	80	249	601	1167	976		
FLNC	6343	5562	10630	1451	480	413	62	232	2651	1040		
IGFN1	612	324	914	3760	920	186	69	533	92	130		
ITGA7	35413	24427	57130	50346	43752	5023	3172	26685	12553	12521		
ITGB1BP3	901	4821	1641	989	817	14	8	137	65	79		
KAT2B	1110	711	691	405	1321	586	99	132	496	499		
MAPK11	4615	2587	3357	3009	2703	4198	2372	2510	724	948		
MAPK12	295	218	910	122	228	178	144	33	154	121		
MEF2C	22630	22375	41305	41084	39841	1056	1332	6609	4246	4751		
MYBPC1	23308	21972	51874	70566	49290	9	7	6559	1017	361		
MYBPC2	26794	9521	40051	10322	38134	137	542	1942	909	1330		
MYBPH	172912	268821	313969	77389	72604	74	456	50287	59701	82260		
MYF5	4285	2190	12199	1356	4218	10	11	1396	1147	2132		
MYF6	5468	7700	33656	24765	32757	7	8	4763	140	247		
MYH13	112	177	2984	100	196	6	6	123	15	19		
MYH2	27163	1366	5871	1954	14052	42	8	508	137	341		
MYH3	219097	217373	272441	284735	139411	563	568	85887	54387	58353		
MYH7	69023	84240	235598	83427	106541	64	88	38784	160	343		

Wilms Tumore											
Gen-Symbol	Behandelt						Unbehandelt				
	Wilms10 Met	Wilms3	Wilms6	Wilms1 1r	Wilms1 1l	Wilms10	Wilms4	Wilms2	Wilms1 2r	Wilms1 2l	
	Expressionsintensität (One Color Microarray)										
	Gene die an der Entwicklung der Skelettmuskulatur beteiligt sind und in den Wilms Tumoren reguliert werden										
MYH8	64045	40819	59516	36819	54664	6	8	20088	16732	12823	
MYL1	38492	41851	62237	90388	110082	8	83	22849	13985	15889	
MYL2	8522	21126	72746	5919	35249	20	42	3793	25	30	
MYL5	19670	21928	30306	41166	23630	1229	1184	5084	854	1250	
MYL6B	120389	103010	202998	222291	153039	26663	37030	65136	47624	46925	
MYL7	110	38	240	57	152	19	87	75	29	27	
MYLPF	98080	109834	93759	153039	127952	32	324	48947	58029	57794	
MYOM1	28419	27977	45591	57130	29369	278	1072	6545	897	1091	
MYOT	10997	9260	28545	15991	22390	6	17	1447	2687	2652	
NEB	41759	20837	54797	77658	53074	62	90	13664	7220	6638	
PAX3	5044	3471	2233	664	2705	74	1035	296	1864	2324	
PAX7	268	80	127	113	79	68	132	79	64	50	
RYR1	4336	3227	5451	9145	4413	121	38	714	1586	971	
SCN4A	839	239	732	1839	662	41	51	130	49	51	
SGCA	43323	37185	50045	70344	55075	701	680	15739	17698	18717	
SGCD	540	1439	1585	2159	2552	315	288	627	150	339	
SGCG	1563	1644	6043	8875	6956	67	7	864	776	581	
SIRT5	941	712	485	656	833	622	330	428	78	223	
SMAD3	1784	1592	2700	2170	1951	1051	1690	954	1060	1197	
SMTN	2147	4781	3276	1647	2085	2538	1067	1392	1106	524	
TEAD4	6938	4178	9015	5732	2937	641	1149	852	2606	2654	
TNNI1	2228	2850	7138	4266	2293	82	360	624	1231	592	
TNNI2	84549	84872	136985	265633	211743	154	441	53502	30577	30472	
TNNT1	93175	90185	307197	272441	223882	1569	245	31914	34415	30440	
TPM1	122570	110082	171165	198557	143422	3331	13687	74337	16191	26336	
TPM2	32333	27307	29188	21094	7146	15579	7919	5229	12095	8863	
TRIM63	12052	11942	21589	34945	26536	33	63	3223	552	1958	
UTRN	6766	6335	4517	4502	7759	5349	2978	3777	2223	3449	

Tab. 4.4: One Color Microarray Expressionsdaten der behandelten und unbehandelten Wilms-Tumore. Angegeben ist die Expressionsintensität der regulierten Gene, während der Skelettmuskularentwicklung. 1l: Erster Tumor der linken Niere von Wilms1. 1r: Erster Tumor in der rechten Niere von Wilms1. 2l: Zweiter Tumor der linken Niere (Rezidiv) von Wilms1. 2r: Zweiter Tumor der rechten Niere (Rezidiv) von Wilms1. Wilms10-Met: Metastase von Wilms10

Wilms Tumore											
Gen-Symbol	Behandelt						Unbehandelt				
	Wilms10 Met	Wilms3	Wilms6	Wilms1 1r	Wilms1 1l	Wilms10	Wilms4	Wilms2	Wilms1 2r	Wilms1 2l	
	Expressionsintensität (One Color Microarray)										
	Gene, die an der Regulation der S-Phase des Zellzyklus beteiligt sind und in den Wilms Tumoren reguliert werden										
ANAPC1	434	486	403	458	408	665	691	562	1260	829	
BRCA1	471	527	347	610	620	900	1107	1192	1203	1953	
BUB1	224	445	254	71	194	374	1019	689	2802	2174	
CBX1	18754	19078	14684	12150	19516	23162	28613	26860	19922	27595	
CBX5	3905	3741	1908	1956	2018	5679	3719	4690	21358	8182	
CCNB1	1872	2433	1304	1045	1333	3053	6202	2986	13414	13131	
CCNB2	4219	6210	4174	1990	2789	5092	14708	9252	15171	23727	
CDC23	1635	1848	1789	2854	2609	2197	2283	2852	5805	4344	
CDC45	2736	3021	1754	1117	1040	4522	5164	5966	6856	13047	
CDC6	584	690	349	211	331	815	1481	1204	2330	2903	
CDC7	1043	882	293	880	646	1878	1456	2421	3762	4213	
CDK1	1728	3036	1869	572	1151	2494	4667	2044	5577	9733	
CHAF1A	2301	4059	2392	2990	2095	3471	3809	5274	10011	10658	
CHAF1B	1350	1372	1114	769	678	2269	2925	2672	2771	4528	
DBF4B	37	66	70	67	68	108	129	139	547	287	
DSCC1	214	225	158	119	437	275	547	342	885	1455	
E2F1	441	906	643	215	234	539	1489	1008	1064	1276	
ESPL1	733	947	639	643	316	698	1403	1789	7695	4708	
FBX05	884	1381	863	438	896	905	2100	1487	4141	4807	
FEN1	369	528	771	203	196	905	1329	678	2122	1466	
GMNN	4174	4058	3474	3092	5414	7286	9702	7226	9934	15898	
HIST1H1B	134	242	138	61	79	288	1828	273	175	388	
HIST1H4B	10346	11635	6214	10602	7591	16763	47033	32427	20011	18087	
HIST1H4C	93759	121856	63252	52322	43584	151805	193100	140253	115798	105548	
HIST1H4D	1797	2358	904	1463	1310	3541	12815	6056	3848	4332	
HIST1H4I	184	319	311	513	433	315	2969	622	381	1264	
HIST1H4J	639	1405	1210	2651	2082	1628	11948	2474	1502	5516	
HIST1H4L	27523	30748	15227	15443	11517	40650	69770	48087	31673	29663	
LIG1	8319	7420	7049	5742	3729	11193	8157	12292	12789	11629	
MCM2	4515	7538	5773	4660	2123	7340	11371	8096	23558	11505	

Wilms Tumore											
Gen-Symbol	Behandelt						Unbehandelt				
	Wilms10 Met	Wilms3	Wilms6	Wilms1 1r	Wilms1 1l	Wilms10	Wilms4	Wilms2	Wilms1 2r	Wilms1 2l	
	Expressionsintensität (One Color Microarray)										
MCM3	18493	19991	19614	13342	12372	29715	31133	31505	33304	31700	
MCM4	625	427	449	310	151	680	694	1006	4334	2053	
MCM5	4725	6464	5630	3964	1851	9337	9894	9063	10101	8025	
MCM6	12310	10194	6556	7186	8198	13574	12407	15056	24350	17305	
MCM7	24231	20749	19718	19404	10296	35305	40867	39764	64420	59416	
ORC1	32	88	55	28	39	91	61	250	407	249	
ORC6	293	486	305	49	207	448	669	598	2565	2683	
PCNA	5793	6437	5816	3679	6171	11675	12163	10248	21203	23818	
PRIM1	478	777	543	385	534	1276	1447	847	1173	2792	
PRIM2	523	918	512	1093	1131	813	2699	1959	1602	2328	
RAD51	1156	2564	1132	962	1593	1834	4239	3057	3864	7518	
RFC2	911	903	1027	677	866	1140	1061	936	2761	1937	
RFC4	4486	5698	3581	3271	3674	7569	6149	5814	7661	12876	
RFC5	2337	1942	1521	2117	1876	3900	4026	4601	3291	5376	
SGOL1	54	167	50	46	44	58	292	148	634	628	
TLK2	1251	1429	1498	1468	1570	1653	2359	1813	3566	1915	
TOP2A	903	1896	1527	518	504	1365	3069	2175	16538	6757	
TOP2B	20342	21171	16258	20779	26143	31529	27258	29952	40222	37185	
TOP3A	312	356	229	358	256	367	681	752	553	570	
UHRF2	957	2535	1339	2494	4092	2789	3158	3324	4583	4696	
XPO1	3621	5414	3980	4158	4797	5136	4813	4754	1260	8956	

Gene, die an der Regulation der S-Phase des Zellzyklus beteiligt sind und in den Wilms Tumoren reguliert werden

Tab. 4.5: One Color Microarray Expressionsdaten der behandelten und unbehandelten Wilms-Tumore. Angegeben ist die Expressionsintensität der regulierten Gene, während der S-Phase des Zellzyklus. **1l:** Erster Tumor der linken Niere von Wilms1. **1r:** Erster Tumor in der rechten Niere von Wilms1. **2l:** Zweiter Tumor der linken Niere (Rezidiv) von Wilms1. **2r:** Zweiter Tumor der rechten Niere (Rezidiv) von Wilms1. **Wilms10-Met:** Metastase von Wilms10.

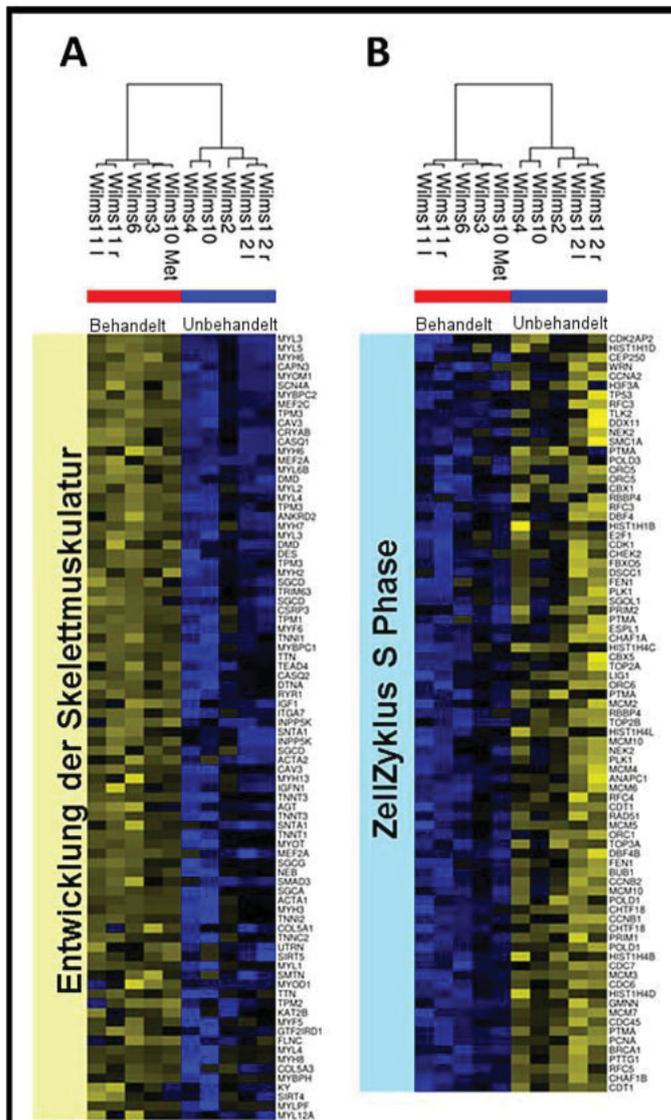


Abb. 4.53: Heatmap-Darstellung von differenziell regulierten Genen in den behandelten und unbehandelten Wilms-Tumoren. A: Zeigt die differenziell exprimierte Gene zwischen behandelten und unbehandelten WTs und die daraus resultierende Gruppierung der behandelten und unbehandelten WTs. Dabei werden von insgesamt 271 Proben/Genen 84 Proben/Gene in den behandelten Wilms-Tumoren hochreguliert, was einem Anteil von 31% entspricht. **B:** Zeigt die differenziell exprimierte Gene zwischen behandelten und unbehandelten WTs im Zellzyklus der S-Phase. Von insgesamt 238 Proben/Genen, die am Zellzyklus beteiligt sind, werden 81 Proben/Gene in den behandelten Wilms-Tumoren negativ reguliert, was einem Anteil von 34% entspricht.

Welche Gene an der Regulation der S-Phase beteiligt sind und wie diese miteinander verknüpft sind, ist in Abbildung 4.54 detailliert dargestellt. Neben der Verknüpfung der einzelnen Gene wird zusätzlich aufgezeigt, welche von ihnen in den chemotherapierten Wilms-Tumoren negativ reguliert sind. Dies wird mit einem blauen Kreis symbolisiert. Die Intensität des Blautons gibt die relative Stärke der Regulation im Verhältnis zu den nicht behandelten WTs an. Zu den regulierten Genen gehört unter anderem das *MCM10*-Gen, das in der frühen und späten S-Phase exprimiert wird und an das Chromatin bindet, um die Replikation zu initiieren (Izumi et al., 2004). Ein weiteres Gen, das während der S-Phase an der Replikation der DNA beteiligt ist und auch in den behandelten WTs reprimiert wird, ist das *DRF1*-Gen. Es ist bekannt, dass dieses das Voranschreiten der Replikationsgabel reguliert (Yoshizawa-Sugata et al., 2005). Auch das *DCC1*-Gen bzw. das DCC1-Protein werden negativ reguliert.

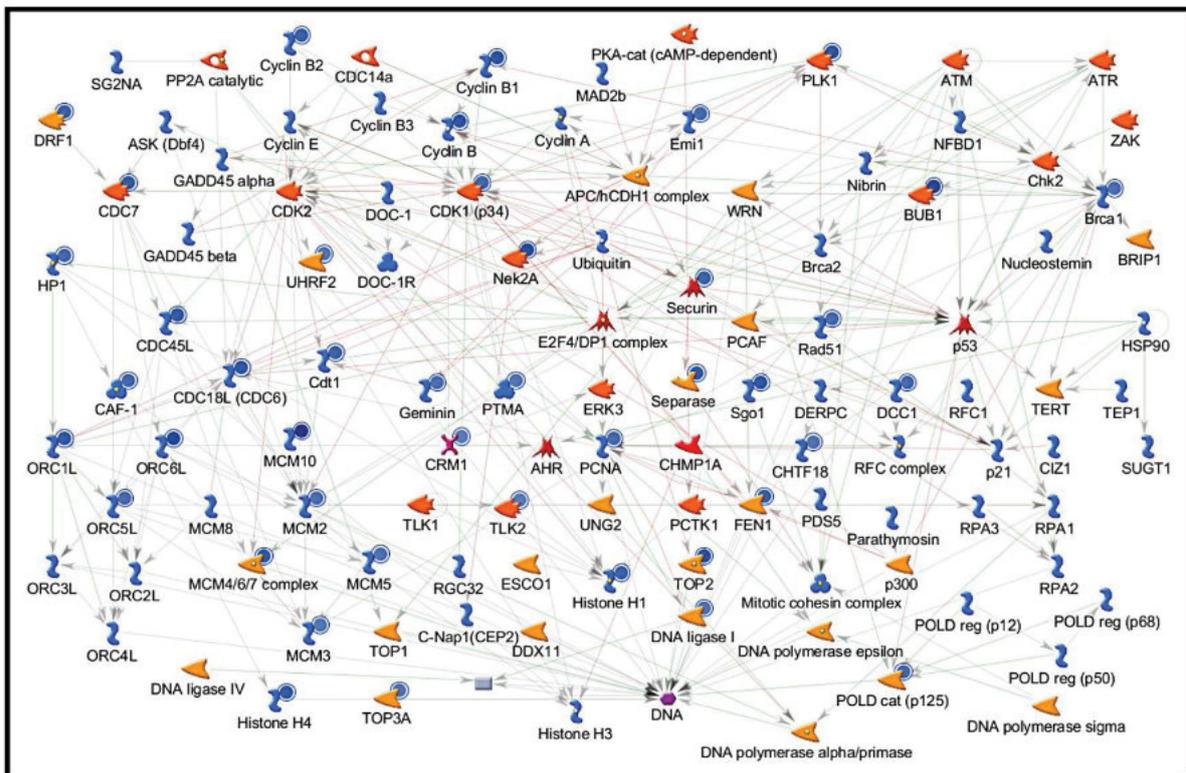


Abb. 4.54: Netzwerk vom Zellzyklus der S-Phase. Dargestellt sind die identifizierten herunterregulierten Gene, die mit der Dauer der Chemotherapie assoziiert sind. Die Gene, die negativ reguliert werden, sind mit einem blauen Kreis markiert. Die Stärke der negativen Regulation wird durch die Intensität der blauen Farbe markiert. Wenn der *Foldchange* (*fc*) hoch ist, symbolisiert ein hellblauer Kreis eine schwächere Regulation bzw. einen *Foldchange*. Die Stärke der Herunterregulation entspricht dem *Foldchange* der mittleren Intensität der Gene in der unbehandelten Gruppe ($n=5$) versus behandelter Wilms-Tumore ($n=5$). Für die Auswertung der Gene, die mit der Dauer der Chemotherapie zusammenhängen, wird ein cut-off von -1.5 (*fc*) und einer Signifikanz von $p \leq 0.05$ angewendet.

Das DCC1-Protein interagiert zusammen mit CHFT18 sowie CHTF8 und bildet daraufhin den alternativen Replikationsfaktor C (RFC), der während der S-Phase das PCNA-Protein auf die DNA auflädt (Merkle et al., 2003; Bermudez et al., 2003). Dieser Faktor spielt wiederum eine wichtige Rolle bei der Replikationsgabel und der Rekrutierung von verschiedenen Enzymen, die für die DNA-Replikation und -Reparatur notwendig sind (Baple et al., 2014). Die Expressionsintensitäten der negativ regulierten Gene während der S-Phase des Zellzyklus sind in Tabelle III aufgeführt. Die Herunterregulation S-Phasen-relevanter Gene bzw. Zellzyklus-relevanter Gene bestätigt die These, dass Wilms-Tumore nach einer Chemotherapie aufhören, weiter zu proliferieren und die Differenzierung der Wilms-Tumor-Zellen eingeleitet wird. Die Analyse der bisherigen Expressionsdaten zeigt eine gezielte Auswirkung der Chemotherapie auf die *WT1*-assoziierten Wilms-Tumore. Zum einen induziert die Chemotherapie bei allen fünf behandelten Wilms-Tumoren die Differenzierung der Tumorzellen zu Skelettmuskelzellen. Zum anderen wird die S-Phase vom Zellzyklus repräsentiert. Dabei ist festzuhalten, dass sogar eine vierwöchige Behandlung mit Actinomycin D

und Vincristin (z.B. Wilms1-1r und Wilms3) gleichermaßen erfolgreich ist, wie eine sechsmonatige Therapie mit denselben Chemotherapeutika plus Doxorubicin und einer zusätzlichen Strahlentherapie. Das bedeutet, dass anhand der beschriebenen Fälle die identischen Gene durch die Chemotherapie reguliert werden.

5. Diskussion

5.1 Analyse der Wilms1-Zelllinien

Der erste Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Untersuchung des WT1-Proteins in einem *in vitro* Zellkultursystem. Für die Analyse wird die Wilms1-Zelllinie herangezogen. Diese ist *WT1*-defizient und trägt eine *CTNNB1*-Mutation, die zu einem konstitutiven Wnt-Signalweg führt. Um zu verstehen, welchen Effekt der Verlust von WT1 durch die Mutation hat und welche Gene oder Signalwege durch Rekonstitution mit WT1 reguliert werden, wird die DNA-bindende *WT1*-(+/-)-Isoform in die Wilms1-Zelllinie transfiziert. Des Weiteren wird die Auswirkung eines *PAX3*-Knockdowns auf die Wilms1-Zelllinie näher analysiert.

5.1.1 *PAX3*-Knockdown und dessen Auswirkung auf die Wilms1-Zelllinie

PAX3 gehört zu der *paired-box* Transkriptionsfaktorfamilie und wird unter anderem während der frühen Phase der Embryogenese im Dermatomyotom des paraxialen Mesoderms exprimiert. Darüber hinaus ist es an der frühen Muskelentwicklung beteiligt und in den Myozyten vorzufinden. Eine *PAX3*-Expression konnte auch im myogenen Subtyp von Wilms-Tumoren nachgewiesen werden. Es konnte gezeigt werden, dass *PAX3* in Vorläuferzellen des Stromas der Niere exprimiert wird (Hueber et al., 2009). Im Zuge der Erstellung der eigenen Diplomarbeit wurde in den Wilms1-Zellen eine *PAX3*-Expression nachgewiesen (Diplomarbeit: Biologische Charakterisierung von Wilms-Tumorzelllinien mit *WT1*-Mutation). Zwecks Bestimmung vom *PAX3*-Einfluss auf die Wilms1-Zelllinie wird zunächst dessen Expression mittels eines shRNA vermittelten Knockdowns ausgeschaltet und dabei auf 30% der eigentlichen Expression minimiert (gegenüber den untransfizierten Wilms1-Zellen).

Die anschließende Analyse der RNA-Expression mittels eines Microarrays hat unter anderem den *PAX3*-Knockdown verifiziert (Abb. 4.14). Darüber hinaus zeigt die Prüfung der Expressionsdaten, dass nach einem *PAX3*-Knockdown insgesamt 6647 Gene/Oligos in den Wilms1-Zellen reguliert werden. Davon sind 3568 Gene/Oligos hoch- und 3079 herunterreguliert. Nach der Auswertung der herunterregulierten Gene mit *David* wird deutlich, dass die ersten sechs signifikanten Pathways eine wichtige Funktion bei der Teilung/Proliferation von Zellen einnehmen (z.B. DNA-Replikation, *Mismatch*- und *Base-excision-repair*).

Die Auswertung der hochregulierten Gene belegt, dass diese teilweise in Signalwegen involviert sind, die entweder die Apoptose auslösen oder die Zellen im G1-Arrest vom Zellzyklus verharren lassen. Nach einer genaueren Betrachtung der aktiven sowie reprimierten Signalwege, die durch den *PAX3*-Knockdown in den Wilms1-Zellen hervorgerufen werden,

lässt sich die Schlussfolgerung ziehen, dass das Fehlen von PAX3 in den Wilms1-Zellen zur Seneszenz führt oder die Apoptose eingeleitet wird.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass eine Korrelation zwischen Wilms-Tumoren mit *WT1*-Mutation und einer *PAX3*-Expression vorliegt. Beobachtungen von Hueber sowie der hier beschriebene Fall zeigen, dass eine *PAX3*-Expression in Wilms-Tumoren nachgewiesen werden kann, die kein funktionsfähiges WT1-Protein besitzen. Des Weiteren kann in HEK293-Zellen ein negativer Effekt von WT1 beobachtet werden. Hier führt eine exogene WT1-Expression zu einer verminderten Expression des endogenen *PAX3*-Proteins (Hueber et al., 2009). Auf dieser Grundlage lässt sich postulieren, dass WT1 in der Lage ist, die *PAX3*-Expression zu inhibieren. Somit hat das *PAX3*-Protein in Abwesenheit des WT1-Proteins während der Nephrogenese eine Onkogene Funktion bzw. Eigenschaft. Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine *PAX3*-Expression zusammen mit dem ETS1-Protein die Expression von MET positiv steuern und dadurch zur Entstehung von Melanomen beiträgt (Kubic et al., 2015). Diese Expressionsergebnisse deuten darauf hin, dass eine *PAX3*-Expression an der Entstehung von WT1-assoziierten Wilms-Tumoren eine Rolle spielen kann.

5.1.2 Absolute *WT1*-Quantifizierung mittels Standardkurve

Die Expression von *WT1* findet überwiegend während der Embryogenese bei der Ausbildung verschiedener Organe statt, wie der Niere oder dem Herzen statt (Mrowka und Schedl, 2000; Gise et al., 2011). Neben der posttranslationalen Modifikation hängt die Wirkungsweise eines Transkriptionsfaktors auch von dessen Expressionsmenge ab (Everett et al., 2010). Um Rückschlüsse auf die *WT1*-Molekülmenge in den untersuchten Proben nehmen zu können, wird mit Hilfe einer reinen *WT1*-RNA bzw. cDNA eine Standardkurve erstellt. Mit dieser Standardkurve ist eine Molekülmenge messbar, die in dem Bereich von 10^5 bis 10^9 *WT1*-Molekülen liegt (Abb. 4.5). Bei jeder quantitativen *WT1*-Bestimmung mittels qRT-PCR kann auf diese Standardkurve zurückgegriffen werden.

5.1.3 Expressionsanalyse von *WT1*-transfizierten Wilms1-Zellen

Mutationen im *WT1*-Gen tragen in bis zu 20% aller Fälle zur Bildung von Wilms-Tumoren bei (Jeanpierre et al., 1998; Fischbach et al., 2005). Häufig kommt es durch eine Mutation zum vorzeitigen Einbau eines Stopcodon, was wiederum zur Bildung eines verkürzten Proteins führt. Dies hat zu Folge, dass das WT1-Protein seine Funktion als Tumorsuppressor nicht mehr erfüllen kann da oft durch die Mutation das ZF-Motiv verloren geht und dadurch

keine DNA-Bindung mehr stattfinden kann (Kim et al., 1999). Neben seiner Funktion als Tumorsuppressor, hat in manchen Fällen eine Überexpression von WT1 eine onkogene Wirkung (Yang et al., 2007). Um die Wirkungsweise von WT1 besser verstehen zu können und dessen biologische Funktion aufzudecken, wird die WT1-defiziente Wilms1-Zelllinie verwendet. Da die Wilms1-Zelllinie kein funktionsfähiges WT1-Protein synthetisieren kann, stellt sich die Frage, ob ein wieder in die Zellen eingeschleustes WT1, in der Lage ist, die früh arretierten Nierenvorläuferzellen wieder zu differenzieren. Dafür wird die DNA-bindende *WT1-(+/-)*-Isoform in die Wilms1-Zellen transfiziert.

Analysiert werden RNA-Proben, mittels eines Expressionsarrays die nach 24h und 48h nach der Transfektion gewonnen wurden. Zuvor wird die Transfektionseffizienz bzw. die *WT1*-Molekülmenge durch eine qRT-PCR bestimmt. Die *WT1*-Molekülzahl beträgt nach 24h $1,6^{22}$ und nach 48h reduzierte sich diese auf $3,87^{21}$ Moleküle (Abb. 4.6.B). Dies liegt an der Methode der transienten Transfektion, hier kommen mehrere Faktoren zusammen, die eine entscheidende Rolle spielen. Bei jeder Zellteilung wird die Plasmid-DNA nicht dupliziert und somit wird nur die Hälfte der aufgenommenen DNA an die Tochterzelle weitergegeben. Ein weiterer Punkt ist die Degradation der Plasmid-DNA durch ihre ungeschützte cytoplasmatische Lokalisation in der Zelle. Zusätzlich wird durch die Zellteilung der untransfizierten Zellen der Anteil an *WT1*-RNA-Molekülen in der Gesamt-RNA reduziert. Alle diese Mechanismen führen mit fortschreitender Zeit zu einer Abnahme der *WT1*-Molekülmenge in den untersuchten Proben. Zusätzlich zeigt die Immunfluoreszenz, dass nach der Transfektion *WT1* auch als Protein vorliegt und durch seine Lokalisation im Zellkern (Abb.4.6 C) seine transkriptionelle Funktion ausüben kann (Mundlos et al., 1993).

Die anschließende vergleichende Genexpressionsanalyse von den Wilms1-Zellen, die mit *WT1-(+/-)*-Isoform transfiziert werden und den Wilms1-Kontrollzellen, die mit dem pENTR4-Leervektor behandelt wurden ergab, dass 1377 Gene signifikant differenziell exprimiert werden. Davon sind 560 Gene hoch- und 817 Gene herunterreguliert. Bei der Analyse der hochregulierten Gene mittels David wird der Signalweg der oxidativen Phosphorylierung als hochsignifikant eingestuft, mit einem p-Wert von $6,2^{-10}$. Die weiterführende Analyse der hochregulierten Gene mit *MetaCore* hat die mit DAVID gewonnenen Ergebnisse bestätigt. Auch hier wird der Signalweg der oxidativen Phosphorylierung als hochsignifikant identifiziert (Abb. 4.9). Durch die Regulation zahlreicher Gene, die zu verschiedenen Komplexen der Atmungskette gehören wird deutlich (Tab. 4.1), dass die *WT1-(+/-)*-Isoform einen direkten oder indirekten Einfluss auf die Steuerung der oxidativen Phosphorylierung hat. Die oxidative Phosphorylierung ist ein wichtiger Bestandteil des Energiestoffwechsels und dient der Energiegewinnung in Form von ATP über die Atmungskette, die in den Mitochondrien stattfindet. Dieser Prozess ist in den meisten Tumoren bzw. Tumorzellen nicht aktiv. In der

Regel erfolgt die Energiebeschaffung von Tumorzellen über die Glykolyse (Zhang und Yang, 2013). Dabei wird Glucose über mehrere Zwischenschritte zu Lactat umgewandelt, wobei Energie in Form von ATP gewonnen wird (Solaini et al., 2010). Hingegen erfolgt die Energiegewinnung von normalen und sich differenzierenden Zellen über die effizientere oxidative Phosphorylierung. Besonders Zellen, die sich in einer Differenzierung befinden, haben einen erhöhten Energiebedarf in Form von ATP, der eher durch die oxidative Phosphorylierung gedeckt werden kann (Varum et al., 2011; Zheng, 2012). Eine interessante Korrelation liegt in dem Metabolismus von Tumorzellen und den humanen embryonalen Stammzellen (hESCs) vor. Beide halten ihren Metabolismus durch die Glykolyse aufrecht, erst wenn die hESCs in eine Differenzierung übergehen und somit einen bestimmten Zelltyp ausbilden, erfolgt der metabolische *switch* von der Glykolyse zur oxidativen Phosphorylierung (Cho et al., 2006).

Die Analyse der Expressionsdaten der hochregulierten Gene zeigt, dass durch die exogene Expression von WT1 in den Wilms1-Zellen, Gene reguliert werden, die zur oxidativen Phosphorylierung gehören. Dadurch steht den Zellen mehr Energie in Form von ATP zur Verfügung. Es kann angenommen werden, dass die WT1-(+/-)-Isoform, in diesem Fall, die Zellen dazu anregt, die Differenzierung einzuleiten. Dies belegt, dass WT1 ein wichtiger Faktor für die Nierendifferenzierung ist und dass dessen exogene Expression, die früh arretierten Nierenvorläuferzellen, die den Wilms-Tumor bilden, wieder zur Differenzierung vorbereitet.

Die Untersuchung der herunterregulierten Gene mittels *David* und *MetaCore* zeigt, dass diese in den Zellzyklus involviert sind bzw. diesen steuern. Dies würde mit den Ergebnissen der hochregulierten Gene, die an der oxidativen Phosphorylierung beteiligt sind übereinstimmen. Zellen, in denen die Differenzierung eingeleitet wird, muss nicht die Expression von Genen die die einzelnen Phasen des Zellzyklus regulieren. Ein Beispiel dafür ist die Hemmung des *MCM7*-Gens in den transfizierten Wilms1-Zellen. Die primäre Aufgabe des *MCM7*-Proteins liegt in der Regulation des Übergangs von der G1 zur S-Phase (Petrocca et al., 2008). Dies bedeutet, dass auch hier die Herunterregulation des Zellzyklus durch WT1 zu einer Differenzierung der Zellen beiträgt.

Es ist zu beachten, dass der hier beobachtete Effekt von WT1-(+/-) auf dessen temporäre Überexpression zurückzuführen ist. Um dieses Ergebnis zu verifizieren, ist eine stabile und dauerhafte WT1-Expression nötig. Aufgrund einer stark limitierten Teilungsrate der Wilms1-Zelllinie, müsste diese zuvor immortalisiert werden. Dann steht ein System zur Verfügung, in dem der Langzeiteffekt von WT1 analysiert werden kann, um die anschließenden mit den bisherigen Resultaten abgeglichen werden kann (4.5).

LDH-Messung

Die Messung der Lactatdehydrogenase (LDH) ergab widererwartend keinen signifikanten Unterschied zwischen den Wilms1-Zellen, die mit *WT1*-(+/-) und denen, die mit der pENTR4-Kontrolle transfiziert wurden. Zu erwarten wäre, dass die Wilms1-Zellen, die mit der *WT1*-(+/-)-Isoform transfiziert wurden, durch den *switch* zur oxidativen Phosphorylierung den Stoffwechsel über die Glykolyse einstellen bzw. minimieren, was eine Reduzierung der LDH-Konzentration zur Folge haben sollte. Dies konnte anhand der LDH-Messwerte nicht bestätigt werden. Die Ursache hierfür kann in diesem Fall auch auf den nur kurzen Effekt von WT1 auf die Wilms1-Zellen sein. Außerdem werden nur ca. 30% der Zellen transfiziert. Dadurch gelingt es nicht, in allen Zellen den metabolischen *switch* zu vollziehen. Eine signifikante Messveränderung der LDH-Konzentration wäre höchstwahrscheinlich erst möglich gewesen, wenn alle Zellen die Differenzierung eingeleitet hätten bzw. differenziert wären. Aus diesem Grund ist ein längerer Versuchsablauf, mit den immortalisierten Wilms1-Zellen anzustreben.

5.2 Etablierung von immortalisierten Wilms-Tumor-Zelllinien

Die Immortalisierung der drei Zelllinien Wilms1, Wilms6 und Wilms10-T erfolgt durch die Transduktion der humanen Telomerase (*hTERT*) und des großen SV40 T-Antigens. Deren Integration ins Wirtsgenom soll die begrenzte Teilungsfähigkeit (Lebensspanne) der Zellen erhöhen. Der Einsatz des modifizierten T-Antigens (U19 Δ 89-97tsA58) hat den Vorteil, dass das temperatursensitive T-Antigen bei einer permissiven Temperatur von 33°C aktiv vorliegt. Bei einer Kultivierung der Zellen bei 37°C sollte der regulatorische Effekt des T-Antigens aufgehoben werden. Daher werden die Experimente an den immortalisierten Zellen bei 37°C durchgeführt. Weitere Modifikationen an der kodierenden Sequenz des T-Antigens verhindern dessen DNA-Interaktion (Bildung an DNA) sowie die Wechselwirkung mit dem mitotischen *Checkpoint* Protein BUB1 (Cotsiki et al., 2009). Dies bewirkt, dass die Zellen chromosomal stabil bleiben, was beim wildtypischen großen T-Antigen nicht der Fall ist.

Die Notwendigkeit mit zwei verschiedenen Faktoren die Wilms-Tumorzellen zu immortalisieren beruht auf eigenen Beobachtungen. Vorangegangene Versuche, die Zellen nur mit *hTERT* zu immortalisieren, waren nicht erfolgreich. Diese Feststellung machte bereits Mutsumara, der herausfand, dass bei einigen primären Zelllinien nur die Kombination mit zwei verschiedenen Genen eine Immortalisierung möglich macht (Matsumura et al., 2004). Die Kultivierung der drei Wilms-Tumorzelllinien über ihre bisher übliche Passagenanzahl

hinaus weg, zeigt dass die Immortalisierung erfolgreich war (Abb. 4.21). Während der Kultivierung wurden die immortalisierten Klone abwechselnd im Selektionsmedium (G418 und Hygromycin) gehalten. Die anschließende Erstellung eines Karyogramms vom Einzellklon Wilms1-Cl.31 hat aufgedeckt, dass die Immortalisierung keine chromosomalen Veränderungen hervorruft, da ein unauffälliger stabiler weiblicher Chromosomensatz bestätigt werden konnte (Abb. 4.22 A). Die Mutationsanalyse des *WT1*- und *CTNNB1*-Gens der Wilms1-Cl.31-Zelllinie legt offen, dass beide Aberrationen, die zuvor in der primären Wilms1-Zelllinien vorhanden waren, auch in der immortalisierten Wilms1-Cl.31-Zelllinie vorliegen (Abb. 4.22 B). Dadurch ist die Identität der immortalisierten Wilms1-Cl.31-Zelllinie verifiziert.

Der Nachweis der *hTERT*-Expression im immortalisierten Klon 31 der Wilms1-Zelllinie erfolgte über eine RT-PCR. Als Negativkontrolle dient in diesem Fall die RNA der primären Wilms1-Zelllinie. Es kann deutlich gemacht werden, dass nur in dem immortalisierten Klon 31 *hTERT* exprimiert wird (Abb. 2.23). In einer vorangegangenen Arbeit konnte bereits bei mehreren immortalisierten Wilms-Tumorzelllinien das temperatursensitive T-Antigen immunologisch mittels Western-Blot nachgewiesen werden. Dazu zählt auch die Wilms1-Cl.31-Zelllinie (Masterarbeit, Frau Tenbusch: Genetische Heterogenität von Wilms-Tumoren und deren etablierten Zelllinien). Basierend auf den hier gewonnen Erkenntnissen ist die Immortalisierung von Wilms-Tumorzelllinien in der Kombination mit zwei verschiedenen Vektoren erfolgreich.

5.2.1 Charakterisierung immortalisierter Wilms-Tumorzelllinien

Um zu ermitteln, ob die immortalisierten Wilms-Tumorzelllinien ein Differenzierungspotential besitzen, wird dieses *in vitro* untersucht und gegebenenfalls mit bereits vorliegenden Resultaten der primären Wilms-Tumorzellen verglichen. Primäre Wilms-Tumorzelllinien zeigen unter speziellen Kultivierungsbedingungen das Potential, zu verschiedenen mesenchymalen Zelltypen differenzieren zu können, unter anderem zu Muskelzellen, Adipozyten oder Osteozyten (Royer-Pokora et al., 2010).

Bei der Osteozytendifferenzierung werden die beiden Klone 31 (Wilms1) und 10 (Wilms6) auf ihr Differenzierungspotential, Osteozyten auszubilden, untersucht. Die primäre hMSC- sowie eine immortalisierte hMSC-Zelllinie dienen als Positivkontrolle. Sowohl die hMSC-Zelllinie als auch die immortalisierte hMSC-Zelllinie (hMSC-Telo/SV40) zeigen mit Alizarin Red S sichtbar angefärbte Calciumablagerungen in den Zellen, wobei die immortalisierten hMSC-Zellen eine geringere Menge Calcium gebildet haben. Die Messung der Calcium-

konzentration verifiziert die Alizarin Red S Färbung. Die immortalisierten hMSC-Zellen haben gegenüber den nicht immortalisierten hMSC-Zellen eine geringere Calciumkonzentration. Bei der quantitativen Bestimmung der Calciumkonzentration wurde eine ältere Probenmessung der primären Wilms1-Zelllinie herangezogen, um diese mit den Calciumwerten der immortalisierten Wilms1-CI.31-Zelllinie zu vergleichen. Dieser Vergleich ergibt, dass bei der immortalisierten Wilms1-CI.31-Zelllinie eine deutlich geringere Calciumkonzentration als bei der primären Wilms1-Zelllinie vorliegt. Dies wiederum deutet darauf hin, dass die Immortalisierung einen negativen Einfluss auf die Calciumbildung bzw. auf das Differenzierungspotential der Zellen hat. In Anbetracht der Positivkontrolle zeigen sowohl die immortalisierte als auch die primäre Wilms1-Zelllinie eine so geringe Calciumkonzentration, was dafür spricht, dass nicht nur die immortalisierte, sondern auch die primäre Wilms1-Zelllinie kein Potential zur Osteozytendifferenzierung besitzt.

Nach Ablauf der Adipozytendifferenzierung haben sich sowohl in den hMSC- als auch in den immortalisierten hMSC-Zellen Lipidvesikel gebildet, die durch die Oil Red O-Färbung sichtbar gemacht worden sind. Auch hier zeigt die immortalisierte hMSC-Zelllinie (hMSC-Telo/SV40) eine schwächere Lipidvesikelbildung gegenüber der primären hMSC-Zelllinie auf. Die beiden immortalisierten Zelllinien Wilms1-CI.31 und Wilms6-CI.10 weisen keine Bildung von Lipidvesikeln auf (Abb. 4.26), d.h. dass sie kein Potential zur Adipozytendifferenzierung besitzen.

Die Induktion der Muskeldifferenzierung der Wilms1-CI.31-Zelllinie geschieht unter serumreduzierten Kultivierungsbedingungen. Unter gleichen Bedingungen werden die hSMM-Zellen als Positivkontrolle kultiviert. Über die immunologische Detektion von Titin erfolgt der Nachweis der Muskeldifferenzierung. Es wird in gesteihten Muskelzellen exprimiert und gilt als ein früher Marker der Muskeldifferenzierung. Titin kann sowohl in den induzierten hSMM-Zellen und in den induzierten immortalisierten Wilms1-CI.31-Zellen nachgewiesen werden. Darüber hinaus kann in beiden Fällen eine Wachstumshemmung der induzierten Zellen festgestellt werden. Multinukleäre Zellen hingegen werden nur in den induzierten hSMM-Zellen beobachtet. Dies bedeutet, dass die immortalisierten Wilms1-CI.31-Zellen nur bis zu einem gewissen Grad die Differenzierung zu Muskelzellen einleiten.

Wilms-Tumore mit einer *CTNNB1*-Mutation zeigen durch die Akkumulation von β -Catenin einen dauerhaft aktiven Wnt-Signalweg im Kern (Royer-Pokora et al., 2008; Ruteshouser et al., 2008). Die Untersuchung des kanonischen Wnt-Signalwegs der primären Wilms1-Zelllinie und der immortalisierten Wilms1-CI.31-Zelllinie zeigt bei beiden Zelllinien einen ak-

tiven kanonischen Wnt-Signalweg, deren Aktivität beinahe gleich stark ist. Nach der Berechnung der TOP/FOP-Ratio wird deutlich, dass die immortalisierten Wilms1-CI.31-Zelllinie einen sogar noch stärker aktiven Wnt-Signalweg aufweist (Abb. 4.28 B).

Ein Überblick über alle Versuchsergebnisse legt offen, dass sich neben der primären hMSC-Zelllinie die immortalisierte hMSC-Telo/SV40-Zelllinie ebenfalls als Positivkontrolle für die Adipozyten- und Osteozytendifferenzierung eignet. Bei der Immortalisierung von hMSC-Zellen mit *hTERT* und *E6* des humanen Papillomavirus ist ein eingeschränktes Potential der hMSC-Zellen zu Adipozyten, Osteozyten und Chondrozyten zu differenzieren bekannt, unterliegt aber Einschränkungen. Je nach dem isolierten Klon ist es möglich, dass dieser sich nur zu einer oder zwei verschiedenen Zelltypen differenzieren lässt (Okamoto et al., 2002). Zu beachten ist, dass die hier verwendeten immortalisierten hMSC-Zellen zwar zu Adipozyten und Osteozyten differenziert sind, aber im Vergleich zu den primären hMSC-Zellen dieses Potential zur Differenzierung geringer ausfällt. Die immortalisierten Wilms1-CI.31- und Wilms6-CI.10-Zelllinien können weder zu Adipozyten noch zu Osteozyten differenziert werden. Bei der Muskeldifferenzierung hingegen zeigt die Wilms1-CI.31-Zelllinie wie die primäre Wilms1-Zelllinie ein Differenzierungspotential zu Muskelzellen. Im Fall der Wilms1-CI.31-Zelllinie hat die Immortalisierung keinen Einfluss auf dieses Differenzierungspotential.

Bei der Analyse des kanonischen Wnt-Signalwegs wird deutlich, dass die immortalisierten Wilms1-CI.31-Zellen eine signifikant höhere Aktivität als die primären Wilms1-Zellen haben. Eine mögliche Ursache dafür kann in der höheren Proliferationsrate der immortalisierten Wilms1-CI.31-Zellen liegen. Bei identischen Kultivierungsbedingungen teilen sich die immortalisierten Wilms-Tumorzellen schneller als die primären. Die höhere Proliferationsrate führt in den teilenden Zellen zu einem stärkeren Metabolismus und kann zu einem stärker aktiven kanonischen Wnt-Signalweg führen.

5.2.2 Genexpressionsanalyse der immortalisierten Wilms1-CI.31-Zellen

Um zu bestimmen, welchen Einfluss die Immortalisierung auf die Genexpression der Wilms1-CI.31-Zelllinie hat, wird mit Hilfe von Genexpressionsanalysen gearbeitet. Diese werden anschließend mit den Daten der primären Wilms1-Zelllinie verglichen. Dadurch wird die Auswirkung von *hTERT* und dem großen temperatursensitiven SV40-T-Antigen auf das Wirtsgenom näher beleuchtet. Festzuhalten ist, dass das temperatursensitive T-Antigen bei 37°C inaktiv sein sollte und unter diesen Kultivierungsbedingungen somit keinen Einfluss

auf die Genexpression der immortalisierten Wilms1-CI.31-Zellen haben sollte. Jedoch haben Western-Blot-Analysen gezeigt, dass nicht nur bei 33°C, sondern auch bei 37°C und 39°C das temperatursensitive T-Antigen-Protein in den Wilms1-CI.31-Zellen vorliegt (Masterarbeit, Frau Tenbusch, s.o). Allerdings deutet der Nachweis des T-Antigens bei 37°C und 39°C nicht direkt daraufhin, ob dieses funktionsfähig in den Zellen vorliegt.

Als erstes erfolgt die Analyse der Genexpressionsdaten der Wilms1-CI.31-Zellen, die bei 33°C durchgeführt wird, um diese anschließend mit den Genexpressionsdaten der primären Wilms1-Zellen zu vergleichen. Hierbei konnten 3754 differenziell regulierte Gene bestimmt werden. Davon werden 2036 Gene hochreguliert und deren Analyse hat gezeigt, dass diese überwiegend an den zellulären Prozessen beteiligt sind, die während des Zellzyklus eine wichtige Rolle spielen. Dazu zählen auch die Mechanismen der DNA-Replikation und DNA-Reparatur (*Mismatch-repair*, *Nucleotide-excision-repair* und *Base-excision-repair*). Durch die positive Regulation von Genen, die an der Pyrimidin- und Purin-Synthese beteiligt sind, wird gewährleistet, dass genügend Grundbausteine für die DNA-Replikation vorhanden sind. Zellen, die besonders stark proliferieren, benötigen eine entsprechend gesteigerte Nukleotid-Synthese, die für die DNA-Replikation sowie die RNA-Produktion notwendig sind um genügend Proteine herzustellen, die für die Regulation der verschiedenen Abschnitte vom Zellzyklus verantwortlich sind (Lane und Fan, 2015). Die Auswertung der hochregulierten Gene bei 37°C ergibt ein nahezu identisches regulatorisches Muster. Auch hier werden die verantwortlichen Gene im Vergleich zu den nicht immortalisierten Wilms1-zellen für den Zellzyklus, die DNA-Replikation, die DNA-Reparatur und die Synthese von Pyrimidinen und Purinen hochreguliert.

Die Analyse der herunterregulierten Gene bei 33°C und 37°C ergibt keinen signifikanten Unterschied. Bei beiden Temperaturen werden Gene inhibiert, die an der Initiation der p53 vermittelten Apoptose beteiligt sind. Dazu zählen die Gene *CASP9*, *CASP8* und *BID*, die eine wichtige Funktion in der p53- ausgelösten Signaltransduktion einnehmen und mittels entsprechender Stimuli den Zelltod auslösen (Billen et al., 2008). Neben der Hemmung von Genen, die für die Initiation der Apoptose zuständig sind, werden auch Gene reprimiert, die die Zelldifferenzierung steuern. Davon betroffen sind die beiden Rezeptoren RXRA und PPAR γ , die zusammen den heterodimeren Komplex ARF6 bilden und somit als Transkriptionsfaktor agieren. Dabei steuern sie die Transkription von Genen, die für die Adipozytendifferenzierung essentiell sind (Tontonoz et al., 1994). Davon betroffen ist das *MMP1* (matrix metalloprotease-1)-Gen, dessen Expression wichtig für die Bildung und Aufrechterhaltung von Fettgewebe ist und durch die Immortalisierung negativ reguliert wird. Des Weiteren werden mehrere Gene herunterreguliert, die an der Regulation der oxidativen Phos-

phorylierung beteiligt sind (Tab. 4.2). Dies wiederum zeigt, dass die oxidative Phosphorylierung und die Zelldifferenzierung oft miteinander verbunden sind, d.h. in den primären Wilms1-Zellen sind Signalwege aktiv, die die Apoptose und Differenzierung regulieren.

Nach Betrachtung der Expressionsergebnisse der immortalisierten Wilms1-CI.31-Zelllinie und deren Abgleich mit der primären Wilms1-Zelllinie wird deutlich, dass durch die Immortalisierung mit *hTERT* und dem großen SV40-T-Antigen zwei gegensätzliche Gruppen von Genen bzw. Mechanismen reguliert werden. Zum einen werden Gene hochreguliert, die für die zelluläre Aufrechterhaltung und Proliferation der Wilms1-CI.31-Zellen verantwortlich sind. Die herunterregulierten Gene steuern im Gegenzug dazu Vorgänge wie die Apoptose, die Differenzierung zu Adipozyten sowie die oxidative Phosphorylierung. Das neue Expressionsprofil der Wilms1-CI.31-Zellen stellt einen optimierten Metabolismus dar, der eine erhöhte Teilungsrate der Zellen gewährleistet. Das Expressionsprofil der primären Wilms1-Zellen legt offen, dass Gene positiv reguliert werden, die die Apoptose und die Differenzierung steuern. Beide Gengruppen werden nach der Immortalisierung gehemmt, was unter anderem zur Langlebigkeit der Zellen führt und durch die Reprimierung der beiden Transkriptionsfaktoren *RXR α* und *PPAR γ* entgegen der Adipozytendifferenzierung wirkt. Die Hemmung der oxidativen Phosphorylierung verstärkt diesen Effekt, da die dadurch gewonnene Energie mit einer Differenzierung einhergehen würde. Des Weiteren kann festgehalten werden, dass keine signifikanten Expressionsunterschiede zwischen den Zellen ermittelt werden konnten, die bei 33°C und 37°C kultiviert wurden. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die Eigenschaft des T-Antigen erst ab 39°C komplett inaktiviert vorliegt (May et al., 2005).

5.2.3 Einfluss von WT1-(+/-) auf die immortalisierte Wilms1-CI.31-Zelllinie

Nach der Etablierung der immortalisierten Wilms1-CI.31-Zelllinie wird diese ebenfalls mit der DNA-bindenden *WT1*-(+/-)-Isoform transfiziert. Unter identischen Versuchsbedingungen erfolgt die Transfektion und Verifikation der *WT1*-Expression auf RNA und Proteinebene, wie bereits bei der primären Wilms1-Zelllinie beschrieben (4.2). Zu erwarten war, dass nach der Transfektion der *WT1*-(+/-)-Isoform in die Wilms1-CI.31-Zellen die gleichen Gene bzw. Signalwege gesteuert werden, die in Abschnitt 4.2.1 identifiziert werden konnten. Insbesondere liegt das Augenmerk auf der oxidativen Phosphorylierung. Vor der Expressionsanalyse mittels eines Microarrays erfolgt der quantitative Nachweis der RNA-Expression und des *WT1*-Proteins (Abb. 4.26 B und C). Bis zu diesem Schritt ähneln die Ergebnisse dem Versuchsablauf der transfizierten primären Wilms1-Zelllinie. Die anschließende Analyse der regulierten Gene mit TATAR hat aufgezeigt, dass insgesamt 161

Gene/Oligos nach den angewandten Parametern differenziell zur Kontrolle (Wilms1-CI.31 mit pENTR4) reguliert werden. Davon sind 96 Gene hochreguliert und 65 Gene herunterreguliert. Die weiterführende Analyse mit David zeigt, dass weder die hochregulierten noch für die herunterregulierten Gene einem signifikant betroffenen Signalweg/Mechanismus zugeordnet werden können. Dieses Resultat lässt die Vermutung zu, dass der Effekt der Immortalisierung antagonistisch zur Differenzierung wirkt. Durch die hohe Proliferationsrate der immortalisierten Wilms1-CI.31-Zellen wird der Effekt von *WT1*(+/-) aufgehoben bzw. kommt nicht zum Tragen. Um diesem Umstand entgegen zu steuern, wird die *WT1*(-/-)-Isoform durch eine virale Infektion stabil in das Wirtsgenom der Wilms1-CI.31-Zelllinie integriert. Bereits 1993 bemerkten Gonas und Spandidos, dass eine Immortalisierung von Zellen einen negativen Effekt auf dessen Differenzierung hat (Gonas und Spandidos, 1993).

5.2.4 Expressionsanalyse von stabil transduzierten Wilms1-CI.31-Zellen

Es sind erfolgreich zwei verschiedene *WT1*(-/-)-Konstrukte hergestellt worden, die anschließend jeweils ins Wirtsgenom der immortalisierten Wilms1-CI.31-Zelllinie integriert werden. Beim ersten Konstrukt (TRE-Auto-*WT1*(-/-)) wird die Expression von *WT1* durch die Zugabe von Doxycyclin induziert (Abb. 4.30). Das zweite Konstrukt (*pLenti*-CMV-*WT1*(-/-)) exprimiert *WT1* konstitutiv nach Einbau ins Wirtsgenom (4.32). Beide Konstrukte ermöglichen es den Einfluss von *WT1* über einen längeren Zeitraum auf die Wilms1-CI.31-Zelllinie zu untersuchen. Dabei ist zu beachten, dass bei beiden Versuchsansätzen die *WT1*-Expression im Vergleich zu den transient durchgeführten Transfektionen geringer ausfällt. Bedingt durch die transiente Transfektion kann jede einzelne Zelle mehrere Plasmide aufnehmen, diese werden jedoch nicht ins Genom eingebaut, was die Transkriptionsrate von *WT1* erhöht. Die durchgeführte qRT-PCR belegt, dass die *WT1*-Expression in den viraltransduzierten Wilms1-CI.31-Zellen geringer ausfällt als in den transfizierten. Dies ist unabhängig von der untersuchten Zelllinie (primäre oder immortalisierte Wilms1-Zelllinie). Bei den transient transfizierten Zellen wird eine *WT1*-Molekülanzahl von bis zu 10^{22} -Molekülen erreicht. Bei den transduzierten Zellen wird eine *WT1*-Molekülmenge von maximal 10^{19} -Molekülen gemessen. Ein Unterschied in der *WT1*-Molekülmenge ist ebenfalls zwischen dem induzierten und dem konstitutiv exprimierenden *WT1*-Konstrukten messbar (Abb. 4.33). Hier basiert der Unterschied in der *WT1*-Molekülmenge auf der Notwendigkeit, in regelmäßigen Abständen Doxycyclin ins Medium hinzuzufügen, bevor dieses aufgebraucht wird und dadurch die Expression zum Erliegen kommt.

Nach dem Nachweis der *WT1*-Expression in den Wilms1-CI.31-Zellen werden die RNA-Proben der induzierten und konstitutiv exprimierenden *WT1*-Zellen für eine Genexpressionsanalyse verwendet. Diese hat belegt, dass bei den Doxycyclin induzierten Wilms1-CI.31-Zellen 2773 Gene reguliert werden. Bei den Wilms1-CI.31-Zellen mit dem konstitutiv exprimierenden *WT1*-Konstrukt werden insgesamt 823 Gene reguliert. Die Analyse der hochregulierten Gene bei den induzierten und den konstitutiv *WT1*-exprimierenden Wilms1-CI.31-Zellen ergibt keine Übereinstimmung untereinander. In beiden Ansätzen werden keine Gene signifikant hochreguliert, die bei der oxidativen Phosphorylierung involviert sind. Ähnlich verhält es sich mit den herunterregulierten Genen, es werden weder die gleichen Signalwege untereinander reguliert, noch gibt es eine Übereinstimmung mit den herunterregulierten Genen bzw. Signalwegen, bei denen *WT1* transient in die primäre und die immortalisierte Wilms1-CI.31-Zelllinie transfiziert wird. Hier sind keine Mechanismen betroffen, die den Zellzyklus negativ regulieren, was zu erwarten war, wenn Anzeichen für eine Induktion der Zelldifferenzierung vorhanden gewesen wären. Wie bereits bei der Analyse der Expressionsdaten der immortalisierten Wilms1-CI.31-Zellen angemerkt wurde, verursacht die Immortalisierung eine Expressionshemmung von Genen, die an der oxidativen Phosphorylierung beteiligt sind. Somit wirkt die Immortalisierung dem Effekt von *WT1* entgegen. Eine weitere Möglichkeit der differentiellen Expressionsergebnisse wäre, dass der Effekt der oxidativen Phosphorylierung nur durch eine unnatürlich hohe *WT1*-Expression hervorgerufen werden kann. Dies aber auch nur dann, wenn keine weiteren entgegen gerichteten Faktoren in Form einer gesteigerten Proliferationsrate vorliegen.

Um gänzlich auszuschließen, dass die immortalisierten Wilms1-CI.31-Zellen durch eine *WT1*-Expression die oxidative Phosphorylierung nicht induzieren können und somit das Potential enthalten, die Differenzierung einzuleiten, muss sichergestellt werden, dass das verwendete T-Antigen wirklich inaktiv bei 37°C vorliegt. Ein Ansatz dafür wäre die Durchführung dieser Versuche bei 39°C, bei dem das temperatursensitive T-Antigen tatsächlich inaktiv vorliegen soll (May et al., 2005). Auch der Eingriff der Telomerase (*hTERT*) auf die Regulation der Expression muss als mögliche Ursache für die nicht Reproduzierbarkeit der Daten nach einer *WT1*-Expression in den Wilms1-CI.31-Zellen in Betracht gezogen werden (Cong et al., 2002).

5.3 Molekulargenetische Untersuchungen von Tumorzellen des Wilms10 Patienten

Im dritten Teil der Arbeit wird ein seltener und komplexer Fall einer Wilms-Tumor Patientin genauer beschrieben und molekularbiologisch untersucht. Nach der Tumorentfernung und dessen pathologischer Klassifikation wird der Tumor nach den NWTSG5-Kriterien dem dritten Stadium zugeordnet. Basierend auf diesen Kriterien erfolgt die Behandlung mit Actinomycin D, Doxorubicin und Vincristin (Tongaokar et al., 2007) mit anschließender Strahlentherapie. Nach einer erfolgreichen Behandlung des Wilms-Tumors, ist die Ausbildung einer Lungenmetastase bei Wilms10, ein seltenes Ereignis und kommt nur in 10% der Wilms-Tumor Fällen vor. Abgesehen von diesem seltenen Ereignis muss zunächst geklärt werden, welche genetische Veränderung für die Entstehung von dieses Tumors verantwortlich ist. Der histologische Befund, dass es sich in diesem Fall um einen stromareichen Wilms-Tumor handelt, legt eine Aberration im *WT1*-Gen nahe (Geller, 2008; Schumacher et al., 1997). Um dies genauer zu untersuchen wird neben dem *WT1*-Gen auch das *CTNNB1*-Gen genauer untersucht.

Anschließend werden die Expressionsdaten des nicht behandelten Wilms10-Tumors mit der behandelten Metastase von Wilms10 verglichen. Darauf aufbauend werden vergleichende Expressionsanalysen von unterschiedlich lang therapierten Wilms-Tumoren darüber Aufschluss geben, inwieweit eine Langzeitbehandlung mit Chemotherapeutika nach der Entfernung der Metastase als Prophylaxe notwendig ist.

5.3.1 *WT1*- und *CTNNB1*-Mutationsanalyse

Aufgrund des histologischen Befunds von Wilms10 und der damit einhergehenden Korrelation zwischen stromareichen Wilms-Tumoren und Aberrationen im *WT1*-Gen wird die Tumor-DNA auf Mutationen im *WT1*-Gen analysiert. Die zuletzt durchgeführte Untersuchung des *WT1*-Gens mittels Sequenzierung und DHPLC hat keine nachweisbaren Mutationen aufzeigen können. Schlussfolgernd ist anzunehmen, dass die Entstehung des Wilms-Tumors in diesem Fall auf eine andere genetische Veränderung zurückzuführen ist, wie z.B. dem *WTX*-Gen (Ruteshouser et al., 2008). Sechs Monate nach einer intensiven Radiochemotherapie wird bei Wilms10 eine Lungenmetastase mit rhabdomyomatöser Histologie diagnostiziert. Die rhabdomyomatöse Histologie der Metastase unterstreicht die Verbindung von *WT1*-Mutationen bei einem stromareichen Subtyp der Wilms-Tumore, die ebenfalls Muskelzellen enthalten (Royer-Pokora et al., 2010). Aus diesem Grund wird die Metastasen- und Blut-DNA sowie erneut eine Tumor-DNA Probe von Wilms10 auf eine Deletion im *WT1*-Gen untersucht. Die MLPA-Analyse zeigt, dass sowohl in der Tumor- als auch der

Metastasen-DNA von Wilms10 das *WT1*-Gen homozygot deletiert ist (Abb. 4.34). Da die Blutprobe unauffällig ist, handelt es sich hier um eine tumorspezifische Mutation.

Zusätzlich zur homozygoten *WT1*-Deletion, zeigt die MLPA-Analyse, dass das *HIPK3*-Gen in der Metastase- und Tumor-DNA heterozygot deletiert ist. Eine heterozygote Deletion von *HIPK3* wird auch bei einem Fall einer 1 Mb großen Deletion bei einem Patienten mit Azoospermie und Kryptorchismus beschrieben. Von der heterozygoten Deletion auf 11p13 sind ebenfalls die Gene *WT1*, *EIF3M*, *CCDC73*, *PRRG4*, *QSER1*, *DEPDC7*, *TCP11L1* und *CSTF3* betroffen (Seabra et al., 2014). *WT1* spielt nicht nur eine wichtige Rolle während der Nierendifferenzierung, sondern auch bei der Reifung der männlichen Geschlechtsorgane. Eine fehlende *WT1*-Expression in den Sertoli-Zellen in den Hoden während der Embryogenese führt zu einer gestörten Ausbildung der Spermien (Chang et al., 2008). Daher kann das Krankheitsbild der Azoospermie und Hodendystopie (Kryptorchismus) als ein diagnostischer Marker für ein erhöhtes Risiko, zusätzlich einen *WT1*-assoziierten Wilms-Tumor auszubilden, gesehen werden.

Mit der anschließenden Untersuchung der Tumor- und Metastasen-DNA auf eine Mutation im *CTNNB1*-Gen werden in diesen beiden Proben von Wilms10 zwei unterschiedliche heterozygote Mutationen identifiziert (Abb. 4.35). Zum einen erfolgt ein Austausch von A (Adenin) zu G (Guanin) auf Position c.121 in der Tumor-DNA, zum anderen gibt es eine Deletion der drei Nukleotide TCT an Position c.133-135 in der Metastasen-DNA. Beide Mutationen liegen in der bekannten *Hotspot*-Region, dem Exon 3 des *CTNNB1*-Gens (Koester et al., 1999). Einerseits wird dadurch die Verbindung zwischen dem stromareichen Wilms-Tumor Subtypen und den Mutationen im *WT1*- und *CTNNB1*-Gen bestätigt (Maiti et al., 2000; Royer-Pokora et al., 2008), Andererseits wird auch gezeigt, wie heterogen ein Wilms-Tumor sein kann. Nach der zeitlichen Entstehungsabfolge und der vorliegenden *WT1*-Deletion in der Metastase müssen die Zellen, die die Metastase gebildet haben vom primären Wilms-Tumor abstammen. Während der Entstehung eines Tumors können mehrere unabhängige Mutationen in diesem stattfinden, die dazu führen, dass ein Tumor aus mehreren subklonalen Populationen besteht, die verschiedene Mutationen tragen (Campbell et al., 2010). Im Fall der Metastase von Wilms10 spricht alles dafür, dass eine Zelle dieser subklonalen Populationen mit der Deletion SΔ45 die Grundlage für die Entstehung dieser Metastase bildet (Yachida et al., 2010).

Eine Detektion von genetischen Veränderungen hängt sehr stark von dem Verhältnis von normalen Zellen zu Tumorzellen in der untersuchten Probe ab. Ist der Anteil an normalen Zellen zu hoch, lässt sich zunächst ein PCR-Produkt des untersuchten Abschnitts amplifizieren. Alleine die Möglichkeit, einzelne Exons von *WT1* zu amplifizieren, deutet darauf hin,

dass keine Deletion des gesamten *WT1*-Gens vorliegen kann. Diese Problematik betrifft nicht nur die Detektion von Deletionen, sondern auch Punktmutationen oder Insertionen. Somit hat die heterogene Zusammensetzung eines Tumors einen Einfluss auf die Analyse der Tumor-DNA von Wilms10 mittels DHPLC und Sequenzierung und erklärt warum in dieser Analyse keine *WT1*-Mutation nachzuweisen war.

5.3.2 Etablierung der Wilms10-Zellkultur und deren weiterführende Untersuchungen

Die Etablierung eines *in vitro* Zellkultursystems von *WT1*-assoziierten Wilms-Tumoren ist unter bestimmten Kulturbedingungen möglich und wurde bereits publiziert (Royer-Pokora et al., 2010). Daher wird im Rahmen dieser Arbeit unter den gleichen Kultivierungsbedingungen der Tumor sowie die Metastase von Wilms10 kultiviert. Tumor sowie Metastase können im MSCG-Medium kultiviert werden, wobei die kultivierten Zellen morphologische Unterschiede aufweisen. Die Zellen, die dem Tumor entstammen, verteilen sich gleichmäßig in der Kulturflasche, hingegen zeigen die Zellen, die der Metastase entstammen, eine Struktur die den Fibroblasten ähnlich ist (Abb. 4.36 B und D) und haben eine langgestreckte Form. Auffallend ist, dass bereits nach kurzer Zeit in der Kultur sich die Zellen, die aus der Metastase stammen nicht weiter geteilt haben. Ihre Kultivierung ist nur bis Passage fünf möglich gewesen. Hingegen haben die kultivierten Tumorzellen von Wilms10 eine deutlich höhere Lebensspanne und lassen sich bis mindestens Passage 13 kultivieren.

Die Mutationsanalyse des *CTNNB1*-Gens der kultivierten Wilms10-T und M-Zellen hat ein unerwartetes Resultat ergeben. Die kultivierten Tumorzellen zeigen nicht mehr wie im Tumor selbst die heterozygote Mutation an Position c.121 (A>G), sondern eine homozygote Deletion der Nukleotide TCT an Position c.133-135. Bei den kultivierten Metastasenzellen ist hingegen keine Mutation im Exon 3 des *CTNNB1*-Gen vorzufinden. Im Fall der kultivierten Tumorzellen von Wilms10 deutet alles darauf hin, dass das zur Kultivierung verwendete Tumorstück aus einer Population von Tumorzellen besteht, welche die beschriebene *CTNNB1*-Mutation trägt und dementsprechend aus diese Zellen ausgewachsen sind. Basierend auf diesem Ergebnis muss die Mutationsanalyse von Wilms10-M neu betrachtet werden. Es ist wahrscheinlicher, dass es sich bei der heterozygoten Deletion von drei Nukleotiden im *CTNNB1*-Gen in Wirklichkeit um eine homozygote Deletion handelt, die durch den Anteil an normalen Zellen im Metastasenstück kaschiert wird. Dadurch erfolgt irrtümlich die Schlussfolgerung, dass eine heterozygote Deletion in der Wilms10-Metastase vorliegt. Die etablierte Zellkultur aus der Metastase zeigt eine wildtypische Exon 3 Sequenz des *CTNNB1*-Gens auf, was darauf hin deutet, dass die kultivierten Zellen nicht vom Tumor

abstammen und es sich bei diesen Zellen somit um normale Fibroblasten handelt. Aus eigenen Beobachtungen lässt sich sagen, dass die Kultivierung von Wilms-Tumoren sehr stark von der Behandlungsdauer (Radiochemotherapie) abhängt. Je länger ein Tumor behandelt wird, umso schwieriger lassen sich Tumorzellen kultivieren. Überträgt man diese Erkenntnis auf die Metastase und betrachtet dabei den Behandlungszeitraum von sechs Monaten, kann man postulieren, dass nur normale Zellen auswachsen und die Chemotherapie keine Auswirkungen auf die normalen Zellen hat, bedingt durch die beobachtete mögliche Kultivierung dieser Zellen.

Liegt ein Gen vollständig deletiert vor, wie es die MLPA-Analyse für das *WT1*-Gen im Tumorstück zeigt, kann auch keine *WT1*-mRNA gebildet werden. Demnach dürfte in den kultivierten Wilms10-T-Zellen keine messbare *WT1*-mRNA Expression nachweisbar sein. Um dies zu überprüfen werden die beiden Passagen drei und sieben der Wilms10-T-Zelllinie auf eine *WT1*-Expression mit Hilfe der qRT-PCR untersucht. Als Referenzkontrolle wird die RNA der Wilms1-Zelllinie verwendet. In den Wilms1-Zellen liegt das *WT1*-Gen mutiert vor und in zahlreichen im Vorfeld durchgeführten qRT-PCR Untersuchungen konnte nur eine sehr schwache *WT1*-Expression nachgewiesen werden.

Die Expressionsergebnisse liefern zunächst widersprüchliche Resultate, die sich in einer messbaren *WT1*-mRNA Menge in der dritten Passage bzw. der nicht messbaren *WT1*-mRNA Menge in der siebten Passage der Wilms10-T-Zelllinie widerspiegeln. Aufgrund der MLPA-Ergebnisse für das *WT1*-Gen in der Tumor-DNA war zu erwarten, dass in beiden untersuchten Passagen der Wilms10-T-Zelllinie keine *WT1*-mRNA vorzufinden ist. Erneut wird hier deutlich, dass auch in diesem Fall aus dem Tumorstück zwei verschiedene Zelltypen/Zellpopulationen herausgewachsen sein müssen. In der Anfangsphase der Kultivierung besteht die Wilms10-T-Zelllinie aus Tumorzellen sowie aus nicht tumorigenen Zellen. Dieser Zustand ändert sich im Laufe der Kultivierungsdauer dahingehend, dass sich nach sieben Passagen nur noch die Tumorzellen kultivieren lassen. Dieses Ergebnis lässt zwei Schlussfolgerungen zu: Erstens, dass das kultivierte Tumorstück ein Gemisch aus zwei verschiedenen Zellpopulationen ist und zweitens, dass unter bestimmten Kultivierungsbedingungen ein Zelltyp durch den selektiven Druck des MSCG-Mediums bevorzugt wird. Diese Erkenntnis untermauert die anfänglichen Aussagen, die nach der Mutationsanalyse (MLPA und Sequenzierung) getroffen wurden.

Die zytogenetische Untersuchung der kultivierten Zellen, die dem Tumors und der Metastase von Wilms10 entstammen hat in beiden Fällen keine nachweisliche zytogenetische

Aberration aufgezeigt. Dass die untersuchte Wilms10-T-Zelllinie ebenfalls keine zytogenetisch sichtbaren Aberrationen trägt bedeutet nicht, dass keine vorhanden sind, sondern dass diese eventuell unter der Nachweisgrenze der herkömmlichen Chromosomenanalyse liegen (5 bis 10 MB). Dies belegt, dass sich die detektierte homozygote Deletion des *WT1*-Gens und die heterozygote Deletion des *HIPK3*-Gens sich zusammen über einen Bereich erstrecken, der unter dieser Nachweisgrenze liegt.

5.3.3 Array basierende CGH/SNP- und Custom-Array Analyse

Solide Tumore setzen sich aus verschiedenen Zellpopulationen von Tumor- sowie normalen Zellen zusammen und zeigen somit eine sehr große Heterogenität auf, die innerhalb eines Tumors vorliegen kann (Hanahan und Weinberg, 2011). Der hier beschriebene Fall der Wilms10-Patientin weist diese Heterogenität auf. Die beiden unterschiedlich detektierten Mutationen im Exon 3 des *CTNNB1*-Gens im Tumor und der Metastase bestätigen die heterogene Zusammensetzung des Tumors (4.6.1). Unabhängig von der Zusammensetzung eines Tumors zeigen Tumore sowie Metastasen eine genetische Instabilität auf, die sich in Form von Deletionen, Amplifikationen oder LOHs innerhalb einer tumorigenen Zellpopulation äußert (Loeb, 2000). Um diese und die bereits mittels MLPA detektierte Deletion des *WT1*- und des *HIPK3*-Gens im Tumor und der Metastase genauer zu untersuchen, wird eine Array CGH/SNP-Analyse durchgeführt. Mit eingeschlossen in diese Untersuchung sind die kultivierten Zellen des Tumors und der Metastase von Wilms10. Diese Analyse soll zum einen weitere mögliche genetische Veränderungen aufdecken und zum anderen aufzeigen, ob der Tumor und die Metastase weitere genetische Unterschiede enthalten.

Mit Hilfe der Array CGH/SNP-Analyse kann gezeigt werden, dass die homozygote und heterozygote Deletionen auf Chromosom 11 sowohl in der Tumor- als auch in der Metastasen-DNA von Wilms10 vorliegt. In beiden Proben ist die Größe der homozygoten bzw. heterozygoten Deletion identisch. Die geringe *Logratio* für diese Deletion in der Wilms10-M Probe ist wahrscheinlich auf die Zusammensetzung der Metastase zurückzuführen. Der Anteil an Zellen in der Metastase, die die homozygote *WT1*-Deletion tragen muss geringer sein, als in der untersuchten Tumor-DNA von Wilms10. Die Analyse der etablierten Zellkultur vom Wilms10-Tumor zeigt ebenfalls die bereits detektierte Deletion auf Chromosom 11 und bestätigt eine erfolgreiche Etablierung der Wilms10-Tumor-Zellkultur. Es wird dadurch verdeutlicht, dass im Laufe der Kultivierung im MSCG-Medium dieses nur selektiv die Kultivierung von Tumor-Zellen zulässt und eine reine Population an Tumorzellen entsteht. Hingegen zeigen die kultivierten Zellen, die der Metastase von Wilms10 entstammen, keine Deletion auf Chromosom 11p13. Weder die homo- noch die heterozygote Deletion sind auf

Chromosom 11 vorzufinden. Die Analyse des restlichen Genoms zeigt ein wildtypisches Muster und es sind keine Deletionen und Amplifikationen nachzuweisen, die innerhalb der Nachweisgrenze des aCHGs liegen. Auch der Verlust der Heterozygotie (LOH) in Form eines UPDs, die im Tumor, der Metastase und der etablierten Zellkultur vom Tumor ermittelt werden, ist ebenfalls nicht in der Wilms10-M-Zellkultur nachzuweisen. Das Fehlen von Aberrationen in der etablierten Wilms10-M-Zelllinie verstärkt die Vermutung, dass es sich bei den kultivierten Zellen um eine reine Kultur von wildtypischen Zellen handelt, die aus der Metastase herausgewachsen sind. Dieses Resultat korreliert mit dem Sequenzierergebnis von Exon 3 des *CTNNB1*-Gens der selbigen Zellkultur (4.6.1). Dadurch wird die Annahme, dass die in der Kultur befindlichen Zellen wt-Zellen entstammen, die zuvor aus der Metastase herausgewachsen sind, bestätigt.

Die mittels Custom-Array untersuchten DNA-Proben der Wilms10-T-Zellkultur und der Wilms10-M dienen der genauen Positionsbestimmung der heterozygoten Deletion auf dem p-Arm von Chromosom 11. Die dabei ermittelte Position ähnelt einem bereits beschriebenen Fall eines männlichen Patienten mit Azoospermie und Kryptorchismus (Seabra et al., 2014). Der deletierte Bereich (Chr.11: 32.344.377-33.385.460) ist nahezu identisch mit dem von Wilms10 (Chr. 11: 32.325.826- 33.376.575). Als eine mögliche Ursache für die chromosomale Veränderung in 11p13 Abschnitt wird eine homologe Rekombination angegeben, die durch eine Alu-Sequenz hervorgerufen wird, die den deletierten Bereich flankieren. Dieser Mechanismus kann auch im Fall von Wilms10 als möglicher Grund für die 1 Mb große heterozygote Deletion angenommen werden. Dieses Ereignis muss als der *second-hit* angesehen werden, da im Falle von Wilms10 zusätzlich eine 226 kb große homozygote Deletion innerhalb der heterozygoten Deletion vorliegt, die bereits vorliegen muss, damit eine solche Kombination möglich ist. Die heterozygote Deletion stellt somit den *first-hit* dar, der tumor- bzw. metastasenspezifisch ist.

5.3.4 Expressionsanalyse von Wilms10

Der primäre Wilms-Tumor und die im späteren Verlauf entstandene Metastase von Wilms10-Patientin werden auf ihr Genexpressionsprofil untersucht und miteinander verglichen. Sowohl die Metastase, als auch der Tumor von Wilms10 tragen identische genetische Aberrationen. Diese beinhalten den Verlust des *WT1*-Gens und eine Mutation im *CTNNB1*-Gen (4.6.1/4.6.3). Beide Veränderungen werden im Zusammenhang mit der Entstehung von stromareichen Wilms-Tumoren beschrieben (Royer-Pokora und Schumacher, 2001). Auch im Fall von Wilms10 wird deutlich, dass es durch den Verlust des *WT1*-Gens während der Nierenentwicklung zu einem fehlerhaften Mesenchym-zu-Epithel Übergang kommt.

Dadurch arretieren die betroffenen Zellen in einem unreifen mesenchymalen Zustand. Der dauerhaft aktive Wnt-Signalweg, der durch seine Mutation im *CTNNB1*-Gen hervorgerufen wird, begünstigt zusätzlich eine unkontrollierte Teilung der Zellen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Wilms-Tumore, deren Entstehung auf eine *WT1*- und *CTNNB1*-Mutation zurückzuführen sind, mesenchymale Marker exprimieren (Royer-Pokora et al., 2010).

Die Expressionsdaten von Wilms10 der Metastase und des Tumors bestätigen diese Annahme, so wird Vimentin, ein mesenchymaler Marker, sehr stark exprimiert (Daten nicht gezeigt). Die Möglichkeit, ein Genexpressionsprofil zwischen einem unbehandelten Wilms-Tumor sowie einer behandelten Lungenmetastase bei ein und derselben Patientin (Wilms10) zu vergleichen, stellt einen seltenen Fall dar. Tumor und Lungenmetastase sind in einem zeitlichen Abstand von sechs Monaten entstanden. Die Analyse der Genexpressionsprofile vom Wilms-Tumor und der Lungenmetastase soll den Mechanismus identifizieren, der sich hinter einer erfolgreichen Chemotherapie verbirgt. Im Fall von Wilms10, wird eine sechsmonatige postoperative Behandlung entsprechend der histologischen Einteilung des Wilms-Tumors vorgenommen (Tongaokar et al., 2007). Hierbei werden die Medikamente Actinomycin D, Vincristin und Doxorubicin eingesetzt. Des Weiteren erhält Wilms10 in diesem Zeitraum eine Strahlentherapie.

Die Analyse der beiden Genexpressionsprofile zeigt, dass in der Metastase eine Gruppe von myogenen Transkriptionsfaktoren aktiviert bzw. diese im Vergleich zum Tumor von Wilms10 viel stärker exprimiert werden. Viele dieser Faktoren sind für die Differenzierung von Skelettmuskelzellen zuständig. Zwei dieser Faktoren, MRF4 und MYOG, induzieren die terminale Skelettmuskeldifferenzierung (Singh und Dilworth, 2013). Dies erklärt auch den Verlust des Wachstumspotentials der kultivierten Wilms-Tumor-Zellen, die der Metastase entstammen. Die durch die Behandlung hervorgerufene Differenzierung der entarteten Zellen zu Skelettmuskelzellen konnte diese nicht weiter proliferieren. Dieses Ergebnis korreliert mit Beobachtungen, die eine histologische Veränderung von Wilms-Tumoren nach einer präoperativen Chemotherapie beschreiben (Guarda et al., 1984). Des Weiteren sind vier weitere *WT1*-assoziierte Wilms-Tumor Fälle bekannt, die unreife (Vorläuferzellen) Skelettmuskelzellen aufgewiesen haben, die nach einer Chemotherapie zu reifen Skelettmuskelzellen differenziert sind (Shibata et al., 2003). Diese histologischen bzw. morphologischen Befunde untermauern die Genexpressionsergebnisse von Wilms10-M.

Die eigene Analyse weiterer vier unbehandelter bzw. vier Chemotherapierten *WT1*-assoziierten Wilms-Tumore hat die Genexpressionsergebnisse von Wilms-10 bestätigt. Alle chemotherapierten Wilms-Tumore zeigen gegenüber den nicht behandelten eine Induktion

bzw. eine stark erhöhte Expression von verschiedenen myogenen Faktoren auf. Diese kodieren für regulatorische Einheiten, die die Differenzierung von Skelettmuskelzellen induzieren oder wichtige strukturelle Komponenten dieser Zellen darstellen. Dieses Resultat und bereits veröffentlichte Studien implizieren, dass eine Chemotherapie mit Vincristin, Actinomycin D und Doxorubicin die myogene Differenzierung von unreifen Wilms-Tumor Komponenten initiiert.

Der hier beschriebene Fall von Wilms10 zeigt, dass die Metastase erfolgreich therapiert wurde. Nichtsdestotrotz weisen Wilms-Tumore, die kürzer und weniger aggressiv behandelt wurden, ein ähnliches Expressionsmuster auf. Somit lässt sich postulieren, dass auch beim Aufkommen einer Metastase eine kürzere Behandlungsdauer mit Actinomycin D und Vincristin nicht nur schonender für den Patienten ist, sondern auch die gleiche Wirkung erzielen würde. Die Induktion der Differenzierung von Tumorzellen durch eine gezielte Anwendung von Krebsmedikamenten (*anticancer drugs*) konnte bereits *in vitro* an einer Brustkrebszelllinie gezeigt werden (Prabhakaran et al., 2013). So gehört die Retinsäure zum Standardmedikament bei der Behandlung der Promyelozytenleukämie. Durch ihren Einsatz kommt es zur Differenzierung der entarteten Zellen, was in den meisten Fällen eine Langzeitremission zur Folge hat (Grimwade et al., 2010).

Der Mechanismus, der proliferierende Zellen dazu bringt, die Differenzierung einzuleiten, liegt womöglich an der Herunterregulation der rRNA-Transkription. Der Einsatz von chemotherapeutischen Medikamenten führt zur Hemmung der ribosomalen Biosynthese (Burger et al., 2010). Es konnte gezeigt werden, dass Doxorubicin und Actinomycin D die Transkription von rRNA effektiv inhibieren. In einer Arbeit von Wagner und Riozman wird auch die inhibierende Wirkung von Vincristin auf die rRNA-Synthese beschrieben (Wagner und Roitman, 1968). Durch dieses Verfahren konnten *In vitro* in mehreren Zellkulturmodellen die Differenzierung der Zellen erfolgreich induziert werden (Hayashi et al., 2014). Ebenso konnte ermittelt werden, dass während verschiedener Differenzierungsprozesse wie der Myogenese, der Adipogenese und der Osteogenese die Expression der rRNA herunterreguliert ist. Somit handelt es sich um einen wichtigen Faktor, der es den Zellen erlaubt, vom proliferierenden Zustand in den Zellzyklusarrest zu wechseln, der mit einer Differenzierung der Zellen einhergeht.

Aufgrund der vergleichenden Expressionsanalyse zwischen behandelten und unbehandelten Wilms-Tumore und bereits publizierter Erkenntnisse über die Wirkungsweise von Chemotherapie lässt sich vermuten, dass diese die rRNA-Transkription in den Tumoren hemmen und durch diese Hemmung die myogene Differenzierung in den Zellen ausgelöst wird. Daran gekoppelt verlassen die differenzierten Zellen den Zellzyklus bzw. arretieren im

sogenannten Zellzyklusarrest. Die Genexpressionsprofile der hier untersuchten behandelten Wilms-Tumore zeigen eine hochsignifikante Herunterregulation vom Zellzyklus relevanter Gene an (Abb. 4.45 und 4.46). Einer der Faktoren, der nicht nur die myogene Differenzierung initiiert, sondern auch dafür sorgt, dass die Zellen in den Zellzyklusarrest eintreten, ist MYOG (Singh und Dilworth, 2013). MYOG gehört zu den Faktoren, die in allen behandelten Tumoren stärker exprimiert wird als in den unbehandelten Wilms-Tumoren. In früheren Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass die *WT1*-assoziierten Wilms-Tumor-Zelllinien charakteristische Merkmale von mesenchymalen Stammzellen aufweisen. Zusätzlich exprimieren diese Zelllinien spezifische Marker vom paraxialem Mesoderm.

Darüber hinaus ist auch eine Induktion der Skelettmuskeldifferenzierung von Wilms-Tumor-Zelllinien möglich (Royer-Pokora et al., 2010). Davon ausgehend ist anzunehmen, dass Wilms-Tumore unreife Vorläuferzellen tragen, die ein myogenes Potential haben. Basierend auf diesen Erkenntnissen wäre ein neuer chemotherapeutischer Ansatz mit Differenzierungsagenzien zur herkömmlichen Behandlung von Wilms-Tumoren mit einer *WT1*-Mutation in Erwägung zu ziehen. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass nicht alle *WT1*-assoziierten Wilms-Tumorzellen nach einer Behandlung terminal ausdifferenziert sind, da ihre Kultivierung noch möglich war. Denn es ist gelungen, Tumorzellen zu kultivieren, die vier und sechs Wochen zuvor behandelt wurden (Royer-Pokora et al., 2010). Hingegen ist die Etablierung einer Zelllinie aus Wilms-Tumoren, die eine Langzeitchemotherapie erhielten, nicht möglich gewesen. Hierbei war auffällig, dass anstatt von Tumorzellen normale Nierenepithelzellen aus den Wilms-Tumoren kultiviert werden konnten. Dies lässt darauf schließen, dass die Behandlung keine negativen Auswirkungen auf diese Zellen hat (Nicht publizierte Beobachtungen Royer-Pokora und Busch). Ähnlich verhält es sich mit dem hier beschriebenen Fall. Bei den kultivierten Zellen aus der Metastase hat es sich um normale Fibroblasten gehandelt, was durch die Abwesenheit der *WT1*- und *CTNNB1*-Mutation verifiziert werden.

Durch die Etablierung von *WT1*-mutanten Wilms-Tumor-Zelllinien ergibt sich die Möglichkeit, die Auswirkungen einer Chemotherapie in einem Zellkultursystem näher zu untersuchen. Dadurch lässt sich feststellen, ob die verwendeten Chemotherapeutika einzeln oder in Kombination die Wilms-Tumor-Zellen in der Kultur zur Muskeldifferenzierung bringen. Dass die Induktion der Muskeldifferenzierung von verschiedenen *WT1*-mutanten WT-Zelllinien durch dessen Kultivierung im serumreduzierten Medium möglich ist, wurde bereits gezeigt (Royer-Pokora et al., 2010) und auch in dieser Arbeit an weiteren Tumorzellen belegt. Würde die in der Klinik verwendete Dosis der Chemotherapeutika denselben Effekt *in vitro* auf die WT-Zelllinien haben, könnte dies zu einem neuen speziell angepassten Behandlungsprotokoll führen. Eine Langzeitchemotherapie bei WT-Patienten mit *WT1*- und

CTNNB1 Mutationen würde wegfallen, was zu einer schonenderen Behandlung für den Patienten führt.

6. Zusammenfassung

Ein wichtiger Bestandteil dieser Arbeit bestand darin, in die *WT1*-defiziente Wilms1-Tumorzelllinie *WT1* transient einzuschleusen, um anschließend den regulatorischen Einfluss von *WT1* mittels Genexpressionsanalysen zu untersuchen. Dabei konnte gezeigt werden, dass *WT1* in der Wilms1-Tumorzelllinie einen metabolischen *switch* hervorruft. Die Wilms1-Zellen vollziehen einen Wechsel von der Glykolyse zur oxidativen Phosphorylierung. Diese metabolische Umstellung ist ein Indiz für eine initiale Induktion der Differenzierung der Wilms1-Zellen. Die gleichzeitige Herunterregulation der Gene, die für den Zellzyklus verantwortlich sind, bestätigt die Vermutung, dass *WT1* in den Zellen die Differenzierung einleitet. Da dieser Effekt bedingt durch transiente Transfektion zeitlich begrenzt war, wurde die Wilms1-Zelllinie daraufhin erfolgreich mit dem großen SV40 T-Antigen und der humanen Telomerase (*hETRT*) immortalisiert.

Die anschließende Mutationsanalyse des *WT1*- und *CTNNB1*-Gens sowie die biologische Charakterisierung anhand von Differenzierungsexperimenten der immortalisierten Wilms1-CI.31-Zelllinie haben deren Abstammung von der primären Wilms1-Zelllinie verifiziert. Die erneute zunächst transiente Transfektion von *WT1* in die immortalisierten Wilms1-CI.31-Zelllinie hat nicht denselben Effekt wie die Regulation der oxidativen Phosphorylierung aufgezeigt. Die nachfolgende stabile Transduktion eines induzierbaren sowie eines konstitutiv exprimierenden *WT1*-Konstrukts hat auch nicht dazu geführt, dass in den Wilms1-CI.31-Zellen die Gene für die oxidative Phosphorylierung nach der einer *WT1*-Expression hochreguliert werden. Ein möglicher Grund für ein anderes regulatorisches Profil nach *WT1*-Expression in den immortalisierten Wilms1-CI.31-Zellen liegt an der Immortalisierung der Zellen selbst. Die Genexpressionsanalyse der beiden immortalisierten Klone 30 und 31 der Wilms1-Zelllinie hat gezeigt, dass durch die Immortalisierung Gene hochreguliert werden, die die Proliferation positiv steuern. Ein Mechanismus, der entgegengerichtet zur Differenzierung steht. Somit konnte die Regulation der oxidativen Phosphorylierung durch eine *WT1*-Expression in den immortalisierten Wilms1-CI.31-Zellen nicht bestätigt werden.

Durch den *Pax3*-Knockdown in der Wilms1-Zelllinie konnte gezeigt werden, dass *PAX3* einen entscheidenden Einfluss auf die Entstehung eines Wilms-Tumors haben muss. Durch dessen Herunterregulation wird unter anderem die Teilung/Proliferation in der primären Wilms1-Zelllinie negativ beeinflusst bzw. kommt zum Erliegen, was dazu führt, dass die Zellen arretieren. Die Entstehung eines *WT1*-assoziierten Wilms-Tumors geht je nach Wilms-Tumorsubtyp mit einer *PAX3*-Expression einher.

Die detaillierte Analyse von Wilms10-T, -M und dessen kultivierte Zellen hat zum einen verdeutlicht, wie heterogen die Zusammensetzung eines Wilms-Tumors sein kann und zugleich aufgezeigt, dass trotz der Entstehung einer Metastase keine Langzeittherapie für eine erfolgreiche Behandlung nötig ist. Die Heterogenität könnte durch eine Mutationsanalyse des *CTNNB1*-Gens ermittelt werden, die aufgezeigt hat, dass in der Metastase und im Tumor von Wilms10 unterschiedliche Mutationen in diesem Gen vorlagen.

Die Genexpressionsanalyse von Wilms10-M und Wilms10-T untereinander hat bereits gezeigt, dass sie ein unterschiedliches Expressionsprofil besitzen, welches vermutlich aus der Behandlung von Wilms10-M resultiert. Dabei zeigt Wilms10-M eine erhöhte Expression an Genen die an der Skelettmuskeldifferenzierung beteiligt sind. Ein Vergleich von Genexpressionsprofilen von verschiedenen *WT1*-assoziierten Wilms-Tumoren die unterschiedlich lang behandelt wurden, die mit einer Gruppe von *WT1*-assoziierten Wilms-Tumoren, die nicht behandelt wurden, hat die bereits erhobenen Daten von Wilms10-M und Wilms10-T bestätigt. Dabei stellte sich heraus, dass bereits nach einer vierwöchigen Behandlung mit Actinomycin D und Vincristin die gleichen Gene reguliert werden wie in der Metastase von Wilms10, die über sechs Monate mit Actinomycin D, Vincristin und Doxorubicin mit zusätzlicher Strahlentherapie behandelt wurde. In allen Fällen kommt es durch die Behandlung zu einer Induktion der Skelettmuskeldifferenzierung und zur gleichzeitigen Hemmung von Genen, die den Zellzyklus regulieren.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine Langzeittherapie bei *WT1*-assoziierten Wilms-Tumoren vermutlich nicht erforderlich ist.

7. Abstract

The investigation of the regulatory effect of WT1 was an important part of this work. This was carried out through transient transfection of WT1 in the *WT1*-deficient tumor cell line Wilms1 following by the gene expression analysis. It could be shown that WT1 in the Wilms1 tumor cell line induces a metabolic switch. The Wilms1 cells undergo a change from glycolysis to oxidative phosphorylation. This metabolic conversion is an indication of an initial induction of differentiation of Wilms1 cells. The simultaneous downregulation of genes that are responsible for the cell cycle confirms that assumption. This effect is limited by the transient transfection, therefore the Wilms1 cell line was successfully immortalized by SV40 large T antigen and the human telomerase (*hETRT*).

Mutation analysis of *WT1*- and *CTNNB1*-gene and the biological characterization based on differentiation experiments of the immortalized Wilms1-Cl.31 cell line have verified their descent from the primary Wilms1 cell line. The transient transfection of *WT1* in the immortalized Wilms1-Cl.31 cell line has not the same impact on oxidative phosphorylation. The following stable transduction of an inducible and constitutively expressing *WT1*-construct in Wilms1-Cl.31 cells has not led to the upregulation of genes which regulate the oxidative phosphorylation. A possible reason for a different regulatory profile after WT1 expression in the immortalized Wilms1-Cl.31 cells is due to the immortalization of the cells themselves. Gene expression analysis of the two immortalized clones 30 and 31 of Wilms1 cell line has shown that by immortalization genes are upregulated, which positive by control the proliferation. A mechanism which is directed by opposite to differentiation. Consequently, the regulation of oxidative phosphorylation by WT1 expression in the immortalized Wilms1-Cl.31 cells could not be confirmed.

The *PAX3*-knockdown in the Wilms1 cell line has demonstrated, that *PAX3* must have a decisive influence on the formation of a Wilms tumor. Its downregulation in the primary Wilms1 cell line results in a cell cycle arrest. The emergence of a *WT1*-associated Wilms tumor with a myogenic subtype is probably depending on *PAX3*- expression.

The detailed analysis of Wilms 10-T, -M and their cultured cells has shown how heterogeneous the composition of a Wilms tumor is. Analysis of the gene expression has also shown that in spite of the formation of a metastasis no long-term therapy is necessary for a successful treatment. The heterogeneity could be determined by the mutation analysis of the *CTNNB1* gene, because of the presence of different *CTNNB1* mutations in the tumor and metastasis of Wilms10. The gene expression analysis of Wilms10-M and Wilms10-T has shown an upregulated expression of skeletal muscle genes in the treated Wilms-10-M.

Furthermore a group of *WT1*-associated Wilms tumors that was not pretreated were analyzed and compared with a group of treated Wilms tumors. This analysis revealed that after a four-week treatment with actinomycin D and vincristine, the same genes are regulated as in the metastasis of Wilms10, which was treated for six months with actinomycin D, vincristine, and doxorubicin with additional radiotherapy. In all cases, the treatment inhibits genes that are responsible for the cell cycle with simultaneous induction of genes for skeletal muscle differentiation.

In summary it can be said that for the treatment of *WT1*-associated Wilms tumors a long-term treatment might not be required.

8. Literaturverzeichnis

Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes - Krebs in Deutschland 2009/2010 (2013). Unter Mitarbeit von Peter Kaatsch, Claudia Spix, Stefan Hentschel, Alexander Katalinic, Sabine Luttmann, Christa Stegmaier et al. 9. Aufl. Berlin: Robert Koch-Institut (Gesundheitsberichterstattung für Deutschland).

Aberle, H.; Bauer, A.; Stappert, J.; Kispert, A.; Kemler, R. (1997): beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. In: *The EMBO journal* 16 (13), S. 3797–3804. DOI: 10.1093/emboj/16.13.3797.

Adams, Jason S.; Sudweeks, Sterling N.; Stark, Michael R. (2014): Pax3 isoforms in sensory neurogenesis: expression and function in the ophthalmic trigeminal placode. In: *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists* 243 (10), S. 1249–1261. DOI: 10.1002/dvdy.24108.

Ahuja, Deepika; Sáenz-Robles, M. Teresa; Pipas, James M. (2005): SV40 large T antigen targets multiple cellular pathways to elicit cellular transformation. In: *Oncogene* 24 (52), S. 7729–7745. DOI: 10.1038/sj.onc.1209046.

Algar, Elizabeth M.; St Heaps, Luke; Darmanian, Artur; Dagar, Vinod; Prawitt, Dirk; Peters, Greg B.; Collins, Felicity (2007): Paternally inherited submicroscopic duplication at 11p15.5 implicates insulin-like growth factor II in overgrowth and Wilms' tumorigenesis. In: *Cancer Res* 67 (5), S. 2360–2365. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-3383.

Al-Hussain, Turki; Ali, Afshan; Akhtar, Mohammed (2014): Wilms tumor: an update. In: *Adv Anat Pathol* 21 (3), S. 166–173. DOI: 10.1097/PAP.000000000000017.

Anderson, M. W.; Maronpot, R. R.; Reynolds, S. H. (1988): Role of oncogenes in chemical carcinogenesis: extrapolation from rodents to humans. In: *IARC scientific publications* (89), S. 477–485.

Armstrong, J. F.; Pritchard-Jones, K.; Bickmore, W. A.; Hastie, N. D.; Bard, J. B. (1993): The expression of the Wilms' tumour gene, WT1, in the developing mammalian embryo. In: *Mechanisms of development* 40 (1-2), S. 85–97.

Ashley, D. J. (1969): The two "hit" and multiple "hit" theories of carcinogenesis. In: *Br. J. Cancer* 23 (2), S. 313–328.

Baird, P. N.; Simmons, P. J. (1997): Expression of the Wilms' tumor gene (WT1) in normal hemopoiesis. In: *Exp. Hematol.* 25 (4), S. 312–320.

Baple, Emma L.; Chambers, Helen; Cross, Harold E.; Fawcett, Heather; Nakazawa, Yuka; Chioza, Barry A. et al. (2014): Hypomorphic PCNA mutation underlies a human DNA repair disorder. In: *The Journal of clinical investigation* 124 (7), S. 3137–3146. DOI: 10.1172/JCI74593.

Barbanti-Brodano, Giuseppe; Sabbioni, Silvia; Martini, Fernanda; Negrini, Massimo; Corallini, Alfredo; Tognon, Mauro (2006): BK virus, JC virus and Simian Virus 40 infection in humans, and association with human tumors. In: *Advances in experimental medicine and biology* 577, S. 319–341. DOI: 10.1007/0-387-32957-9_23.

Barber, T. D.; Barber, M. C.; Cloutier, T. E.; Friedman, T. B. (1999): PAX3 gene structure, alternative splicing and evolution. In: *Gene* 237 (2), S. 311–319.

Bardeesy, N.; Falkoff, D.; Petruzzi, M. J.; Nowak, N.; Zabel, B.; Adam, M. et al. (1994): Anaplastic Wilms' tumour, a subtype displaying poor prognosis, harbours p53 gene mutations. In: *Nat. Genet.* 7 (1), S. 91–97. DOI: 10.1038/ng0594-91.

Baudry, D.; Hamelin, M.; Cabanis, M. O.; Fournet, J. C.; Tournade, M. F.; Sarnacki, S. et al. (2000): WT1 splicing alterations in Wilms' tumors. In: *Clin. Cancer Res.* 6 (10), S. 3957–3965.

- Beckwith, J. B. (1998): Nephrogenic rests and the pathogenesis of Wilms tumor: developmental and clinical considerations. In: *Am. J. Med. Genet.* 79 (4), S. 268–273.
- Beckwith, J. B.; Kiviat, N. B.; Bonadio, J. F. (1990): Nephrogenic rests, nephroblastomatosis, and the pathogenesis of Wilms' tumor. In: *Pediatric pathology / affiliated with the International Paediatric Pathology Association* 10 (1-2), S. 1–36.
- Bermudez, Vladimir P.; Maniwa, Yoshimasa; Tappin, Inger; Ozato, Keiko; Yokomori, Kyoko; Hurwitz, Jerard (2003): The alternative Ctf18-Dcc1-Ctf8-replication factor C complex required for sister chromatid cohesion loads proliferating cell nuclear antigen onto DNA. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (18), S. 10237–10242. DOI: 10.1073/pnas.1434308100.
- Beckwith, J. B.; Palmer, N. F. (1978): Histopathology and prognosis of Wilms tumors: results from the First National Wilms' Tumor Study. In: *Cancer* 41 (5), S. 1937–1948.
- Billen, L. P.; Shamas-Din, A.; Andrews, D. W. (2008): Bid: a Bax-like BH3 protein. In: *Oncogene* 27 Suppl 1, S. S93-104. DOI: 10.1038/onc.2009.47.
- Birchmeier, C.; Meyer, D.; Riethmacher, D. (1995): Factors controlling growth, motility, and morphogenesis of normal and malignant epithelial cells. In: *International review of cytology* 160, S. 221–266.
- Bove, K. E.; McAdams, A. J. (1976): The nephroblastomatosis complex and its relationship to Wilms' tumor: a clinicopathologic treatise. In: *Perspectives in pediatric pathology* 3, S. 185–223.
- Breslow, N.; Olshan, A.; Beckwith, J. B.; Green, D. M. (1993): Epidemiology of Wilms tumor. In: *Med. Pediatr. Oncol.* 21 (3), S. 172–181.
- Breslow, N. E.; Olson, J.; Moksness, J.; Beckwith, J. B.; Grundy, P. (1996): Familial Wilms' tumor: a descriptive study. In: *Med. Pediatr. Oncol.* 27 (5), S. 398–403. DOI: 10.1002/(SICI)1096-911X(199611)27:5<398::AID-MPO2>3.0.CO;2-H.
- Breslow, Norman E.; Beckwith, J. Bruce; Perlman, Elizabeth J.; Reeve, Anthony E. (2006): Age distributions, birth weights, nephrogenic rests, and heterogeneity in the pathogenesis of Wilms tumor. In: *Pediatr Blood Cancer* 47 (3), S. 260–267. DOI: 10.1002/pbc.20891.
- Breslow, Norman E.; Norris, Robin; Norkool, Patricia A.; Kang, Tammy; Beckwith, J. Bruce; Perlman, Elizabeth J. et al. (2003): Characteristics and outcomes of children with the Wilms tumor-Aniridia syndrome: a report from the National Wilms Tumor Study Group. In: *J. Clin. Oncol.* 21 (24), S. 4579–4585. DOI: 10.1200/JCO.2003.06.096.
- Bruening, W.; Moffett, P.; Chia, S.; Heinrich, G.; Pelletier, J. (1996): Identification of nuclear localization signals within the zinc fingers of the WT1 tumor suppressor gene product. In: *FEBS letters* 393 (1), S. 41–47.
- Burger, Kaspar; Mühl, Bastian; Harasim, Thomas; Rohrmoser, Michaela; Malamoussi, Anastassia; Orban, Mathias et al. (2010): Chemotherapeutic drugs inhibit ribosome biogenesis at various levels. In: *The Journal of biological chemistry* 285 (16), S. 12416–12425. DOI: 10.1074/jbc.M109.074211.
- Call, K. M.; Glaser, T.; Ito, C. Y.; Buckler, A. J.; Pelletier, J.; Haber, D. A. et al. (1990): Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus. In: *Cell* 60 (3), S. 509–520.
- Campbell, Peter J.; Yachida, Shinichi; Mudie, Laura J.; Stephens, Philip J.; Pleasance, Erin D.; Stebbings, Lucy A. et al. (2010): The patterns and dynamics of genomic instability in metastatic pancreatic cancer. In: *Nature* 467 (7319), S. 1109–1113. DOI: 10.1038/nature09460.

- Centlivre, M.; Zhou, X.; Pouw, S. M.; Weijer, K.; Kleibeuker, W.; Das, A. T. et al. (2010): Autoregulatory lentiviral vectors allow multiple cycles of doxycycline-inducible gene expression in human hematopoietic cells in vivo. In: *Gene Ther* 17 (1), S. 14–25. DOI: 10.1038/gt.2009.109.
- Chang, Hao; Gao, Fei; Guillou, Florian; Taketo, Makoto M.; Huff, Vicki; Behringer, Richard R. (2008): Wt1 negatively regulates beta-catenin signaling during testis development. In: *Development (Cambridge, England)* 135 (10), S. 1875–1885. DOI: 10.1242/dev.018572.
- Cho, Young Min; Kwon, Sujin; Pak, Youngmi Kim; Seol, Hye Won; Choi, Young Min; Park, Do Joon et al. (2006): Dynamic changes in mitochondrial biogenesis and antioxidant enzymes during the spontaneous differentiation of human embryonic stem cells. In: *Biochemical and biophysical research communications* 348 (4), S. 1472–1478. DOI: 10.1016/j.bbrc.2006.08.020.
- Collins, Charlotte A.; Gnocchi, Viola F.; White, Robert B.; Boldrin, Luisa; Perez-Ruiz, Ana; Relaix, Frederic et al. (2009): Integrated functions of Pax3 and Pax7 in the regulation of proliferation, cell size and myogenic differentiation. In: *PLoS one* 4 (2), S. e4475. DOI: 10.1371/journal.pone.0004475.
- Comings, D. E. (1973): A general theory of carcinogenesis. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 70 (12), S. 3324–3328.
- Cong, Y.-S.; Wright, W. E.; Shay, J. W. (2002): Human Telomerase and Its Regulation. In: *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66 (3), S. 407–425. DOI: 10.1128/MMBR.66.3.407-425.2002.
- Cooper, Geoffrey M. (©2000): The cell. A molecular approach. 2. Aufl. Washington, D.C, Sunderland, Mass: ASM Press; Sinauer Associates.
- Cotsiki, Marina; Lock, Rowena L.; Cheng, Yuan; Williams, Grace L.; Zhao, Jean; Perera, David et al. (2004): Simian virus 40 large T antigen targets the spindle assembly checkpoint protein Bub1. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (4), S. 947–952. DOI: 10.1073/pnas.0308006100.
- Dalosso, Anthony R.; Hancock, Anne L.; Brown, Keith W.; Williams, Ann C.; Jackson, Sally; Malik, Karim (2004): Genomic imprinting at the WT1 gene involves a novel coding transcript (AWT1) that shows deregulation in Wilms' tumours. In: *Hum. Mol. Genet.* 13 (4), S. 405–415. DOI: 10.1093/hmg/ddh038.
- Davies, Jamie A.; Fisher, Carolyn E. (2002): Genes and proteins in renal development. In: *Exp. Nephrol.* 10 (2), S. 102–113.
- Davies, Jamie A. (2002): Morphogenesis of the metanephric kidney. In: *TheScientificWorldJournal* 2, S. 1937–1950. DOI: 10.1100/tsw.2002.854.
- Davies, R. C.; Calvio, C.; Bratt, E.; Larsson, S. H.; Lamond, A. I.; Hastie, N. D. (1998): WT1 interacts with the splicing factor U2AF65 in an isoform-dependent manner and can be incorporated into spliceosomes. In: *Genes & development* 12 (20), S. 3217–3225.
- DeBaun, M. R.; Tucker, M. A. (1998): Risk of cancer during the first four years of life in children from The Beckwith-Wiedemann Syndrome Registry. In: *J. Pediatr.* 132 (3 Pt 1), S. 398–400.
- Dechsukhum, C.; Ware, J. L.; Ferreira-Gonzalez, A.; Wilkinson, D. S.; Garrett, C. T. (2000): Detection of a novel truncated WT1 transcript in human neoplasia. In: *Mol. Diagn.* 5 (2), S. 117–128. DOI: 10.1054/xd.2000.7181.
- Diller, L.; Ghahremani, M.; Morgan, J.; Grundy, P.; Reeves, C.; Breslow, N. et al. (1998): Constitutional WT1 mutations in Wilms' tumor patients. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 16 (11), S. 3634–3640.

- Discenza, Maria Teresa; Pelletier, Jerry (2004): Insights into the physiological role of WT1 from studies of genetically modified mice. In: *Physiological genomics* 16 (3), S. 287–300. DOI: 10.1152/physiolgenomics.00164.2003.
- Dome, Jeffrey S.; Cotton, Cecilia A.; Perlman, Elizabeth J.; Breslow, Norman E.; Kalapurakal, John A.; Ritchey, Michael L. et al. (2006): Treatment of anaplastic histology Wilms' tumor: results from the fifth National Wilms' Tumor Study. In: *J. Clin. Oncol.* 24 (15), S. 2352–2358. DOI: 10.1200/JCO.2005.04.7852.
- Donovan, M. J.; Natoli, T. A.; Sainio, K.; Amstutz, A.; Jaenisch, R.; Sariola, H.; Kreidberg, J. A. (1999): Initial differentiation of the metanephric mesenchyme is independent of WT1 and the ureteric bud. In: *Developmental genetics* 24 (3-4), S. 252–262. DOI: 10.1002/(SICI)1520-6408(1999)24:3/4<252::AID-DVG8>3.0.CO;2-K.
- Dyer, M. R.; Walker, J. E. (1993): Sequences of members of the human gene family for the c subunit of mitochondrial ATP synthase. In: *The Biochemical journal* 293 (Pt 1), S. 51–64.
- Earnshaw, W. C. (1999): Apoptosis. A cellular poison cupboard. In: *Nature* 397 (6718), S. 387, 389. DOI: 10.1038/17015.
- Eisenmann, David M. (2005): Wnt signaling. In: *WormBook : the online review of C. elegans biology*, S. 1–17. DOI: 10.1895/wormbook.1.7.1.
- Elliott, T. S.; Swartz, D. A.; Paisley, E. A.; Mangian, H. J.; Visek, W. J.; Kaput, J. (1993): F1Fo-ATPase subunit e gene isolated in a screen for diet regulated genes. In: *Biochemical and biophysical research communications* 190 (1), S. 167–174. DOI: 10.1006/bbrc.1993.1026.
- Everett, Logan; Hansen, Matthew; Hannenhalli, Sridhar (2010): Regulating the regulators: modulators of transcription factor activity. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 674, S. 297–312. DOI: 10.1007/978-1-60761-854-6_19.
- Fang, G.; Yu, H.; Kirschner, M. W. (1998): Direct binding of CDC20 protein family members activates the anaphase-promoting complex in mitosis and G1. In: *Molecular cell* 2 (2), S. 163–171.
- Feinberg, A. P.; Vogelstein, B.; Droller, M. J.; Baylin, S. B.; Nelkin, B. D. (1983): Mutation affecting the 12th amino acid of the c-Ha-ras oncogene product occurs infrequently in human cancer. In: *Science (New York, N.Y.)* 220 (4602), S. 1175–1177.
- Fischbach, Bernard V.; Trout, Kelly L.; Lewis, Julia; Luis, Catherine A.; Sika, Mohammed (2005): WAGR syndrome: a clinical review of 54 cases. In: *Pediatrics* 116 (4), S. 984–988. DOI: 10.1542/peds.2004-0467.
- Fu, Maofu; Wang, Chenguang; Li, Zhiping; Sakamaki, Toshiyuki; Pestell, Richard G. (2004): Minireview: Cyclin D1: normal and abnormal functions. In: *Endocrinology* 145 (12), S. 5439–5447. DOI: 10.1210/en.2004-0959.
- Fukuzawa, Ryuji; Holman, Sarah K.; Chow, C. W.; Savarirayan, Ravi; Reeve, Anthony E.; Robertson, Stephen P. (2010): WTX mutations can occur both early and late in the pathogenesis of Wilms tumour. In: *J. Med. Genet.* 47 (11), S. 791–794. DOI: 10.1136/jmg.2010.080663.
- Fukuzawa, Ryuji; Heathcott, Rosemary W.; More, Helen E.; Reeve, Anthony E. (2007): Sequential WT1 and CTNNB1 mutations and alterations of beta-catenin localisation in intralobar nephrogenic rests and associated Wilms tumours: two case studies. In: *Journal of clinical pathology* 60 (9), S. 1013–1016. DOI: 10.1136/jcp.2006.043083.
- Galderisi, Umberto; Jori, Francesco Paolo; Giordano, Antonio (2003): Cell cycle regulation and neural differentiation. In: *Oncogene* 22 (33), S. 5208–5219. DOI: 10.1038/sj.onc.1206558.

- Garvin, A. J.; Sullivan, J. L.; Bennett, D. D.; Stanley, W. S.; Inabnett, T.; Sens, D. A. (1987): The in vitro growth, heterotransplantation, and immunohistochemical characterization of the blastemal component of Wilms' tumor. In: *Am. J. Pathol* 129 (2), S. 353–363.
- Gatfield, David; Unterholzner, Leonie; Ciccarelli, Francesca D.; Bork, Peer; Izaurralde, Elisa (2003): Nonsense-mediated mRNA decay in *Drosophila*: at the intersection of the yeast and mammalian pathways. In: *EMBO J* 22 (15), S. 3960–3970. DOI: 10.1093/emboj/cdg371.
- Geethamani, V.; Kusuma, V.; Gowda, K. M. Srinivasa; Saini, Monika Lamba (2006): Adult Wilms' tumour: a case report with review of literature. In: *Diagn Pathol* 1, S. 46. DOI: 10.1186/1746-1596-1-46.
- Geller, James I. (2008): Genetic stratification of Wilms tumor: is WT1 gene analysis ready for prime time? In: *Cancer* 113 (5), S. 893–896. DOI: 10.1002/cncr.23673.
- Gessler, M.; Poustka, A.; Cavenee, W.; Neve, R. L.; Orkin, S. H.; Bruns, G. A. (1990): Homozygous deletion in Wilms tumours of a zinc-finger gene identified by chromosome jumping. In: *Nature* 343 (6260), S. 774–778. DOI: 10.1038/343774a0.
- Gilbert, Scott F.; Singer, Susan R.; Tyler, Mary S. (2006): *Developmental biology*. 8. ed., 2. print. Sunderland, Mass.: Sinauer.
- Gise, Alexander von; Zhou, Bin; Honor, Leah B.; Ma, Qing; Petryk, Anna; Pu, William T. (2011): WT1 regulates epicardial epithelial to mesenchymal transition through β -catenin and retinoic acid signaling pathways. In: *Developmental biology* 356 (2), S. 421–431. DOI: 10.1016/j.ydbio.2011.05.668.
- Gommersall, Lyndon M.; Arya, Manit; Mushtaq, Imran; Duffy, Patrick (2005): Current challenges in Wilms' tumor management. In: *Nat Clin Pract Oncol* 2 (6), S. 298-304; quiz 1 p following 324. DOI: 10.1038/ncponc0196.
- Goulding, M.; Lumsden, A.; Paquette, A. J. (1994): Regulation of Pax-3 expression in the dermomyotome and its role in muscle development. In: *Development* 120 (4), S. 957–971.
- Graf, N.; Reinhard, H. (2003): Wilms-Tumoren. Diagnostik und Therapie. In: *Urologe A* 42 (3), S. W391-407; quiz W408-9.
- Graf, N.; Tournade, M. F.; Kraker, J. de (2000): The role of preoperative chemotherapy in the management of Wilms' tumor. The SIOP studies. International Society of Pediatric Oncology. In: *Urol. Clin. North Am.* 27 (3), S. 443–454.
- Graham, F. L.; Smiley, J.; Russell, W. C.; Nairn, R. (1977): Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. In: *J. Gen. Virol* 36 (1), S. 59–74.
- Green, D. M. (1985): The diagnosis and management of Wilms' tumor. In: *Pediatr. Clin. North Am.* 32 (3), S. 735–754.
- Green, D. M.; Coppes, M. J. (1995): Future directions in clinical research in Wilms tumor. In: *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 9 (6), S. 1329–1339.
- Grimwade, David; Mistry, Anita R.; Solomon, Ellen; Guidez, Fabien (2010): Acute promyelocytic leukemia: a paradigm for differentiation therapy. In: *Cancer treatment and research* 145, S. 219–235. DOI: 10.1007/978-0-387-69259-3_13.
- Grubb, G. R.; Yun, K.; Williams, B. R.; Eccles, M. R.; Reeve, A. E. (1994): Expression of WT1 protein in fetal kidneys and Wilms tumors. In: *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 71 (4), S. 472–479.
- Guarda, L. A.; Ayala, A. G.; Jaffe, N.; Sutow, W. W.; Bracken, R. B. (1984): Chemotherapy-induced histologic changes in Wilms' tumors. In: *Pediatric pathology / affiliated with the International Paediatric Pathology Association* 2 (2), S. 197–206.

- Guillaume, Richard; Bressan, Michel; Herzlinger, Doris (2009): Paraxial mesoderm contributes stromal cells to the developing kidney. In: *Developmental biology* 329 (2), S. 169–175. DOI: 10.1016/j.ydbio.2009.02.034.
- Gutjahr, P.; Schwenger, M.; Spaar, H. J.; Michaelis, J.; Niethammer, D.; Jürgens, H. et al. (1990): Bedeutung der präoperativen Chemotherapie und der Radiotherapie bei 373 Kindern mit Wilms-Tumor. In: *Dtsch. Med. Wochenschr.* 115 (7), S. 248–253. DOI: 10.1055/s-2008-1065000.
- Gyls-Morin, V.; Hoffer, F. A.; Kozakewich, H.; Shamberger, R. C. (1993): Wilms tumor and nephroblastomatosis: imaging characteristics at gadolinium-enhanced MR imaging. In: *Radiology* 188 (2), S. 517–521. DOI: 10.1148/radiology.188.2.8392214.
- Haber, D. A.; Sohn, R. L.; Buckler, A. J.; Pelletier, J.; Call, K. M.; Housman, D. E. (1991): Alternative splicing and genomic structure of the Wilms tumor gene WT1. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 88 (21), S. 9618–9622.
- Hamilton, Thomas E.; Ritchey, Michael L.; Haase, Gerald M.; Argani, Pedram; Peterson, Susan M.; Anderson, James R. et al. (2011): The management of synchronous bilateral Wilms tumor: a report from the National Wilms Tumor Study Group. In: *Ann. Surg.* 253 (5), S. 1004–1010. DOI: 10.1097/SLA.0b013e31821266a0.
- Hammes, A.; Guo, J. K.; Lutsch, G.; Leheste, J. R.; Landrock, D.; Ziegler, U. et al. (2001): Two splice variants of the Wilms' tumor 1 gene have distinct functions during sex determination and nephron formation. In: *Cell* 106 (3), S. 319–329.
- Hanahan, Douglas; Weinberg, Robert A. (2011): Hallmarks of cancer: the next generation. In: *Cell* 144 (5), S. 646–674. DOI: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- Harrison, Caroline; Ketchen, Ann-Marie; Redhead, Nicola J.; O'Sullivan, Maureen J.; Melton, David W. (2002): Replication failure, genome instability, and increased cancer susceptibility in mice with a point mutation in the DNA ligase I gene. In: *Cancer research* 62 (14), S. 4065–4074.
- Hayashi, Yuki; Kuroda, Takao; Kishimoto, Hiroyuki; Wang, Changshan; Iwama, Atsushi; Kimura, Keiji (2014): Downregulation of rRNA transcription triggers cell differentiation. In: *PloS one* 9 (5), S. e98586. DOI: 10.1371/journal.pone.0098586.
- Hayflick, L. (1976): The cell biology of human aging. In: *The New England journal of medicine* 295 (23), S. 1302–1308. DOI: 10.1056/NEJM197612022952308.
- Hazen-Martin, D. J.; Garvin, A. J.; Gansler, T.; Tarnowski, B. I.; Sens, D. A. (1993): Morphology and growth characteristics of epithelial cells from classic Wilms' tumors. In: *Am. J. Pathol* 142 (3), S. 893–905.
- Hewitt, S. M.; Hamada, S.; McDonnell, T. J.; Rauscher, F. J.; Saunders, G. F. (1995): Regulation of the proto-oncogenes bcl-2 and c-myc by the Wilms' tumor suppressor gene WT1. In: *Cancer research* 55 (22), S. 5386–5389.
- Hinck, L.; Nelson, W. J.; Papkoff, J. (1994): Wnt-1 modulates cell-cell adhesion in mammalian cells by stabilizing beta-catenin binding to the cell adhesion protein cadherin. In: *The Journal of cell biology* 124 (5), S. 729–741.
- Hirai, Hiroyuki; Verma, Mayank; Watanabe, Shuichi; Tastad, Christopher; Asakura, Yoko; Asakura, Atsushi (2010): MyoD regulates apoptosis of myoblasts through microRNA-mediated down-regulation of Pax3. In: *The Journal of cell biology* 191 (2), S. 347–365. DOI: 10.1083/jcb.201006025.
- Hockenbery, D.; Nuñez, G.; Millman, C.; Schreiber, R. D.; Korsmeyer, S. J. (1990): Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. In: *Nature* 348 (6299), S. 334–336. DOI: 10.1038/348334a0

- Hofmann, W.; Royer, H. D.; Drechsler, M.; Schneider, S.; Royer-Pokora, B. (1993): Characterization of the transcriptional regulatory region of the human WT1 gene. In: *Oncogene* 8 (11), S. 3123–3132.
- Hosfield, D. J.; Mol, C. D.; Shen, B.; Tainer, J. A. (1998): Structure of the DNA repair and replication endonuclease and exonuclease FEN-1: coupling DNA and PCNA binding to FEN-1 activity. In: *Cell* 95 (1), S. 135–146.
- Howlander N, Noone AM Krapcho M. Garshell J. Miller D. Altekruse SF Kosary CL Yu M. Ruhl J. Tatalovich ZMariatto A. Lewis DR Chen HS Feuer EJ Cronin KA (eds) (2013): SEER Cancer Statistics Review, 1975-2011. Hg. v. National Cancer Institute. National Cancer Institute. Online verfügbar unter http://seer.cancer.gov/csr/1975_2011/, zuletzt aktualisiert am Updated 17.12.2014.
- Hueber, Pierre-Alain; Fukuzawa, Ryuji; Elkares, Reyhan; Chu, Leelee; Blumentkrantz, Miriam; He, Shu-Jie et al. (2009): PAX3 is expressed in the stromal compartment of the developing kidney and in Wilms tumors with myogenic phenotype. In: *Pediatric and developmental pathology : the official journal of the Society for Pediatric Pathology and the Paediatric Pathology Society* 12 (5), S. 347–354. DOI: 10.2350/08-05-0466.1.
- Huff, V. (1998): Wilms tumor genetics. In: *Am. J. Med. Genet.* 79 (4), S. 260–267.
- Hurlstone, Adam; Clevers, Hans (2002): T-cell factors: turn-ons and turn-offs. In: *The EMBO journal* 21 (10), S. 2303–2311. DOI: 10.1093/emboj/21.10.2303.
- Iben, S.; Royer-Pokora, B. (1999): Analysis of native WT1 protein from frozen human kidney and Wilms' tumors. In: *Oncogene* 18 (15), S. 2533–2536. DOI: 10.1038/sj.onc.1202618.
- Inaba, T.; Matsushime, H.; Valentine, M.; Roussel, M. F.; Sherr, C. J.; Look, A. T. (1992): Genomic organization, chromosomal localization, and independent expression of human cyclin D genes. In: *Genomics* 13 (3), S. 565–574.
- Ishikiriyama, S. (1993): Gene for Waardenburg syndrome type I is located at 2q35, not at 2q37.3. In: *American journal of medical genetics* 46 (5), S. 608. DOI: 10.1002/ajmg.1320460534.
- Izumi, Masako; Yatagai, Fumio; Hanaoka, Fumio (2004): Localization of human Mcm10 is spatially and temporally regulated during the S phase. In: *The Journal of biological chemistry* 279 (31), S. 32569–32577. DOI: 10.1074/jbc.M314017200.
- Jadali, Farzaneh; Sayadpour, Delaram; Rakhshan, Mohammad; Karimi, Abdollah; Rouzrokh, Mohsen; Shamsian, Bibi Shahin; Shamshiri, Ahmad Reza (2011): Immunohistochemical detection of p53 protein expression as a prognostic factor in Wilms tumor. In: *Iran J Kidney Dis* 5 (3), S. 149–153.
- Javed, A. A.; Ogata, K.; Sanadi, D. R. (1991): Human mitochondrial ATP synthase: cloning cDNA for the nuclear-encoded precursor of coupling factor 6. In: *Gene* 97 (2), S. 307–310.
- Jeanpierre, C.; Denamur, E.; Henry, I.; Cabanis, M. O.; Luce, S.; Cécille, A. et al. (1998): Identification of constitutional WT1 mutations, in patients with isolated diffuse mesangial sclerosis, and analysis of genotype/phenotype correlations by use of a computerized mutation database. In: *Am. J. Hum. Genet.* 62 (4), S. 824–833. DOI: 10.1086/301806.
- Jenkins, Zandra A.; van Kogelenberg, Margriet; Morgan, Tim; Jeffs, Aaron; Fukuzawa, Ryuji; Pearl, Esther et al. (2009): Germline mutations in WTX cause a sclerosing skeletal dysplasia but do not predispose to tumorigenesis. In: *Nat. Genet.* 41 (1), S. 95–100. DOI: 10.1038/ng.270.

- Jereb, B.; Burgers, J. M.; Tournade, M. F.; Lemerle, J.; Bey, P.; DeLemarre, J. et al. (1994): Radiotherapy in the SIOP (International Society of Pediatric Oncology) nephroblastoma studies: a review. In: *Med. Pediatr. Oncol.* 22 (4), S. 221–227.
- Jordan, E. M.; Breen, G. A. (1992): Molecular cloning of an import precursor of the delta-subunit of the human mitochondrial ATP synthase complex. In: *Biochimica et biophysica acta* 1130 (1), S. 123–126.
- Kagan, Valerian E.; Quinn, Peter J. (2001): Coenzyme Q. Molecular mechanisms in health and disease. Boca Raton: CRC Press.
- Karlsson, Jenny; Holmquist Mengelbier, Linda; Elfving, Peter; Gisselsson Nord, David (2011): High-resolution genomic profiling of an adult Wilms' tumor: evidence for a pathogenesis distinct from corresponding pediatric tumors. In: *Virchows Arch.* 459 (5), S. 547–553. DOI: 10.1007/s00428-011-1148-0.
- Kikuchi, Akira; Yamamoto, Hideki; Kishida, Shosei (2007): Multiplicity of the interactions of Wnt proteins and their receptors. In: *Cellular signalling* 19 (4), S. 659–671. DOI: 10.1016/j.cellsig.2006.11.001.
- Kikuchi, Akira; Kishida, Shosei; Yamamoto, Hideki (2006): Regulation of Wnt signaling by protein-protein interaction and post-translational modifications. In: *Experimental & molecular medicine* 38 (1), S. 1–10. DOI: 10.1038/emm.2006.1.
- Kikuchi, A. (2000): Regulation of beta-catenin signaling in the Wnt pathway. In: *Biochemical and biophysical research communications* 268 (2), S. 243–248. DOI: 10.1006/bbrc.1999.1860.
- Kim, Ho-Shik; Kim, Myoung Shin; Hancock, Anne L.; Harper, James C P; Park, Jik Young; Poy, George et al. (2007): Identification of novel Wilms' tumor suppressor gene target genes implicated in kidney development. In: *The Journal of biological chemistry* 282 (22), S. 16278–16287. DOI: 10.1074/jbc.M700215200.
- Kim, J.; Prawitt, D.; Bardeesy, N.; Torban, E.; Vicaner, C.; Goodyer, P. et al. (1999): The Wilms' tumor suppressor gene (wt1) product regulates Dax-1 gene expression during gonadal differentiation. In: *Mol. Cell. Biol.* 19 (3), S. 2289–2299.
- Kim, J. W.; Lee, Y.; Kang, H. B.; Chose, Y. K.; Chung, T. W.; Chang, S. Y. et al. (1997): Cloning of the human cDNA sequence encoding the NADH:ubiquinone oxidoreductase MLRQ subunit. In: *Biochemistry and molecular biology international* 43 (3), S. 669–675.
- Klamt, B.; Koziell, A.; Poulat, F.; Wieacker, P.; Scambler, P.; Berta, P.; Gessler, M. (1998): Frasier syndrome is caused by defective alternative splicing of WT1 leading to an altered ratio of WT1 +/-KTS splice isoforms. In: *Hum. Mol. Genet.* 7 (4), S. 709–714.
- Knudson, A. G. (1971): Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 68 (4), S. 820–823.
- Knudson, A. G.; Strong, L. C. (1972): Mutation and cancer: a model for Wilms' tumor of the kidney. In: *J. Natl. Cancer Inst.* 48 (2), S. 313–324.
- Koesters, R.; Ridder, R.; Kopp-Schneider, A.; Betts, D.; Adams, V.; Niggli, F. et al. (1999): Mutational activation of the beta-catenin proto-oncogene is a common event in the development of Wilms' tumors. In: *Cancer Res* 59 (16), S. 3880–3882.
- Kraus, C.; Liehr, T.; Hülsken, J.; Behrens, J.; Birchmeier, W.; Grzeschik, K. H.; Ballhausen, W. G. (1994): Localization of the human beta-catenin gene (CTNNB1) to 3p21: a region implicated in tumor development. In: *Genomics* 23 (1), S. 272–274. DOI: 10.1006/geno.1994.1493.
- Kreidberg, J. A.; Sariola, H.; Loring, J. M.; Maeda, M.; Pelletier, J.; Housman, D.; Jaenisch, R. (1993): WT-1 is required for early kidney development. In: *Cell* 74 (4), S. 679–691.

- Kubic, J. D.; Little, E. C.; Lui, J. W.; Iizuka, T.; Lang, D. (2015): PAX3 and ETS1 synergistically activate MET expression in melanoma cells. In: *Oncogene* 34 (38), S. 4964–4974. DOI: 10.1038/onc.2014.420.
- Lane, Andrew N.; Fan, Teresa W-M (2015): Regulation of mammalian nucleotide metabolism and biosynthesis. In: *Nucleic acids research* 43 (4), S. 2466–2485. DOI: 10.1093/nar/gkv047.
- Liang, Xiao-Qui; Cao, En-Hua; Zhang, Yan; Qin, Jing-Fen (2003): P53-induced gene 11 (PIG11) involved in arsenic trioxide-induced apoptosis in human gastric cancer MGC-803 cells. In: *Oncology reports* 10 (5), S. 1265–1269.
- Lin, Y. L.; Shivji, M. K.; Chen, C.; Kolodner, R.; Wood, R. D.; Dutta, A. (1998): The evolutionarily conserved zinc finger motif in the largest subunit of human replication protein A is required for DNA replication and mismatch repair but not for nucleotide excision repair. In: *The Journal of biological chemistry* 273 (3), S. 1453–1461.
- Livak, K. J.; Schmittgen, T. D. (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. In: *Methods* 25 (4), S. 402–408. DOI: 10.1006/meth.2001.1262.
- Lodish, Harvey F. (©2000): Molecular cell biology. 4. Aufl. New York: W.H. Freeman.
- Loeb, K. R. (2000): Significance of multiple mutations in cancer. In: *Carcinogenesis* 21 (3), S. 379–385. DOI: 10.1093/carcin/21.3.379.
- Loeffen, J. L.; Triepels, R. H.; van den Heuvel, L P; Schuelke, M.; Buskens, C. A.; Smeets, R. J. et al. (1998): cDNA of eight nuclear encoded subunits of NADH:ubiquinone oxidoreductase: human complex I cDNA characterization completed. In: *Biochemical and biophysical research communications* 253 (2), S. 415–422. DOI: 10.1006/bbrc.1998.9786.
- Logan, Catriona Y.; Nusse, Roel (2004): The Wnt signaling pathway in development and disease. In: *Annual review of cell and developmental biology* 20, S. 781–810. DOI: 10.1146/annurev.cellbio.20.010403.113126.
- Loneragan, G. J.; Martínez-León, M. I.; Agrons, G. A.; Montemarano, H.; Suarez, E. S. (1998): Nephrogenic rests, nephroblastomatosis, and associated lesions of the kidney. In: *Radiographics : a review publication of the Radiological Society of North America, Inc* 18 (4), S. 947–968. DOI: 10.1148/radiographics.18.4.9672980.
- Ludwig, R.; Weirich, A.; Pötter, R.; Harms, D.; Bürger, D.; Michaelis, J. et al. (1992): Präoperative Chemotherapie des Nephroblastoms. Vorläufige Ergebnisse der Therapiestudie SLOP-9/GPO. In: *Klin Padiatr* 204 (4), S. 204–213. DOI: 10.1055/s-2007-1025350.
- Maiti, S.; Alam, R.; Amos, C. I.; Huff, V. (2000): Frequent association of beta-catenin and WT1 mutations in Wilms tumors. In: *Cancer Res* 60 (22), S. 6288–6292.
- Majumdar, Arindam; Vainio, Seppo; Kispert, Andreas; McMahon, Jill; McMahon, Andrew P. (2003): Wnt11 and Ret/Gdnf pathways cooperate in regulating ureteric branching during metanephric kidney development. In: *Development (Cambridge, England)* 130 (14), S. 3175–3185.
- Matsumura, Toshihisa; Takesue, Michihiko; Westerman, Karen A.; Okitsu, Teru; Sakaguchi, Masakiyo; Fukazawa, Takuya et al. (2004): Establishment of an immortalized human-liver endothelial cell line with SV40T and hTERT. In: *Transplantation* 77 (9), S. 1357–1365.
- May, Tobias; Wirth, Dagmar; Hauser, Hansjörg; Mueller, Peter P. (2005): Transcriptionally regulated immortalization overcomes side effects of temperature-sensitive SV40 large T antigen. In: *Biochemical and biophysical research communications* 327 (3), S. 734–741. DOI: 10.1016/j.bbrc.2004.12.065.

- McCoy, C.; McGee, S. B.; Cornwell, M. M. (1999): The Wilms' tumor suppressor, WT1, inhibits 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate activation of the multidrug resistance-1 promoter. In: *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research* 10 (6), S. 377–386.
- Merkle, Carolin J.; Karnitz, Larry M.; Henry-Sánchez, John T.; Chen, Junjie (2003): Cloning and characterization of hCTF18, hCTF8, and hDCC1. Human homologs of a *Saccharomyces cerevisiae* complex involved in sister chromatid cohesion establishment. In: *The Journal of biological chemistry* 278 (32), S. 30051–30056. DOI: 10.1074/jbc.M211591200.
- Metzger, Monika L.; Dome, Jeffrey S. (2005): Current therapy for Wilms' tumor. In: *Oncologist* 10 (10), S. 815–826. DOI: 10.1634/theoncologist.10-10-815.
- Meyerson, M. (2000): Role of telomerase in normal and cancer cells. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 18 (13), S. 2626–2634.
- Michos, Odysse (2009): Kidney development: from ureteric bud formation to branching morphogenesis. In: *Current opinion in genetics & development* 19 (5), S. 484–490. DOI: 10.1016/j.gde.2009.09.003.
- Mierau, G. W.; Beckwith, J. B.; Weeks, D. A. (1987): Ultrastructure and histogenesis of the renal tumors of childhood: an overview. In: *Ultrastruct Pathol* 11 (2-3), S. 313–333.
- Moore, A. W.; Schedl, A.; McInnes, L.; Doyle, M.; Hecksher-Sorensen, J.; Hastie, N. D. (1998): YAC transgenic analysis reveals Wilms' tumour 1 gene activity in the proliferating coelomic epithelium, developing diaphragm and limb. In: *Mechanisms of development* 79 (1-2), S. 169–184.
- Morrison, Avril A.; Viney, Rebecca L.; Lodomery, Michael R. (2008): The post-transcriptional roles of WT1, a multifunctional zinc-finger protein. In: *Biochimica et biophysica acta* 1785 (1), S. 55–62. DOI: 10.1016/j.bbcan.2007.10.002.
- Mrowka, C.; Schedl, A. (2000): Wilms' tumor suppressor gene WT1: from structure to renal pathophysiologic features. In: *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 11 Suppl 16, S. S106-15.
- Mundlos, S.; Pelletier, J.; Darveau, A.; Bachmann, M.; Winterpacht, A.; Zabel, B. (1993): Nuclear localization of the protein encoded by the Wilms' tumor gene WT1 in embryonic and adult tissues. In: *Development (Cambridge, England)* 119 (4), S. 1329–1341.
- Naldini, L.; Blömer, U.; Gallay, P.; Ory, D.; Mulligan, R.; Gage, F. H. et al. (1996): In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. In: *Science (New York, N.Y.)* 272 (5259), S. 263–267.
- Nakagama, H.; Heinrich, G.; Pelletier, J.; Housman, D. E. (1995): Sequence and structural requirements for high-affinity DNA binding by the WT1 gene product. In: *Mol. Cell. Biol.* 15 (3), S. 1489–1498.
- Naldini, L.; Blömer, U.; Gage, F. H.; Trono, D.; Verma, I. M. (1996): Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 93 (21), S. 11382–11388.
- Naldini, L.; Blömer, U.; Gallay, P.; Ory, D.; Mulligan, R.; Gage, F. H. et al. (1996): In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. In: *Science* 272 (5259), S. 263–267.
- Natoli, Thomas A.; McDonald, Alice; Alberta, Julia A.; Taglienti, Mary E.; Housman, David E.; Kreidberg, Jordan A. (2002): A mammal-specific exon of WT1 is not required for development or fertility. In: *Molecular and cellular biology* 22 (12), S. 4433–4438.

- Nollet, F.; Berx, G.; Molemans, F.; van Roy, F. (1996): Genomic organization of the human beta-catenin gene (CTNNB1). In: *Genomics* 32 (3), S. 413–424. DOI: 10.1006/geno.1996.0136.
- Novo, Marilia Campos Tavares; Osugui, Lika; dos Reis, Vanessa Oliveira; Longo-Maugéri, Ieda Maria; Mariano, Mario; Popi, Ana Flavia (2015): Blockage of Wnt/ β -catenin signaling by quercetin reduces survival and proliferation of B-1 cells in vitro. In: *Immunobiology* 220 (1), S. 60–67. DOI: 10.1016/j.imbio.2014.09.001.
- Okamoto, Takeshi; Aoyama, Tomoki; Nakayama, Tomitaka; Nakamata, Takeharu; Hosaka, Taisuke; Nishijo, Koichi et al. (2002): Clonal heterogeneity in differentiation potential of immortalized human mesenchymal stem cells. In: *Biochemical and biophysical research communications* 295 (2), S. 354–361.
- Okladnova, O.; Syagailo, Y. V.; Tranitz, M.; Riederer, P.; Stöber, G.; Mössner, R.; Lesch, K. P. (1999): Functional characterization of the human PAX3 gene regulatory region. In: *Genomics* 57 (1), S. 110–119. DOI: 10.1006/geno.1998.5711.
- Pacek, Marcin; Tutter, Antonin V.; Kubota, Yumiko; Takisawa, Haruhiko; Walter, Johannes C. (2006): Localization of MCM2-7, Cdc45, and GINS to the site of DNA unwinding during eukaryotic DNA replication. In: *Molecular cell* 21 (4), S. 581–587. DOI: 10.1016/j.molcel.2006.01.030.
- Park, W. S.; Oh, R. R.; Park, J. Y.; Lee, S. H.; Shin, M. S.; Kim, Y. S. et al. (1999): Frequent somatic mutations of the beta-catenin gene in intestinal-type gastric cancer. In: *Cancer research* 59 (17), S. 4257–4260.
- Parker, Craig J.; Shawcross, Susan G.; Li, Honggui; Wang, Qui-Yu; Herrington, C. Simon; Kumar, Shant et al. (2004): Expression of PAX 3 alternatively spliced transcripts and identification of two new isoforms in human tumors of neural crest origin. In: *International journal of cancer. Journal international du cancer* 108 (2), S. 314–320. DOI: 10.1002/ijc.11527.
- Pelletier, J.; Schalling, M.; Buckler, A. J.; Rogers, A.; Haber, D. A.; Housman, D. (1991): Expression of the Wilms' tumor gene WT1 in the murine urogenital system. In: *Genes Dev.* 5 (8), S. 1345–1356.
- Petrocca, Fabio; Visone, Rosa; Onelli, Mariadele Rapazzotti; Shah, Manisha H.; Nicoloso, Milena S.; Martino, Ivana de et al. (2008): E2F1-regulated microRNAs impair TGF β -dependent cell-cycle arrest and apoptosis in gastric cancer. In: *Cancer cell* 13 (3), S. 272–286. DOI: 10.1016/j.ccr.2008.02.013.
- Pfaffl, M. W. (2001): A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. In: *Nucleic Acids Res.* 29 (9), S. e45.
- Piette, J. (1997): The transition from proliferation to differentiation in nerve cells: what can we learn from muscle? In: *Exp. Cell Res.* 234 (2), S. 193–204. DOI: 10.1006/excr.1997.3588.
- Porteus, M. H.; Narkool, P.; Neuberg, D.; Guthrie, K.; Breslow, N.; Green, D. M.; Diller, L. (2000): Characteristics and outcome of children with Beckwith-Wiedemann syndrome and Wilms' tumor: a report from the National Wilms Tumor Study Group. In: *J. Clin. Oncol.* 18 (10), S. 2026–2031.
- Prabhakaran, Praseetha; Hassiotou, Foteini; Blancafort, Pilar; Filgueira, Luis (2013): Cisplatin induces differentiation of breast cancer cells. In: *Frontiers in oncology* 3, S. 134. DOI: 10.3389/fonc.2013.00134.
- Pritchard-Jones, K.; Fleming, S.; Davidson, D.; Bickmore, W.; Porteous, D.; Gosden, C. et al. (1990): The candidate Wilms' tumour gene is involved in genitourinary development. In: *Nature* 346 (6280), S. 194–197. DOI: 10.1038/346194a0.

- Rackley, R. R.; Flenniken, A. M.; Kuriyan, N. P.; Kessler, P. M.; Stoler, M. H.; Williams, B. R. (1993): Expression of the Wilms' tumor suppressor gene WT1 during mouse embryogenesis. In: *Cell growth & differentiation: the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research* 4 (12), S. 1023–1031.
- Ramani, P.; Cowell, J. K. (1996): The expression pattern of Wilms' tumour gene (WT1) product in normal tissues and paediatric renal tumours. In: *J. Pathol.* 179 (2), S. 162–168. DOI: 10.1002/(SICI)1096-9896(199606)179:2<162::AID-PATH545>3.0.CO;2-0.
- Rasheed, S.; Nelson-Rees, W. A.; Toth, E. M.; Arnstein, P.; Gardner, M. B. (1974): Characterization of a newly derived human sarcoma cell line (HT-1080). In: *Cancer* 33 (4), S. 1027–1033.
- Rauscher, F. J. (1993): The WT1 Wilms tumor gene product: a developmentally regulated transcription factor in the kidney that functions as a tumor suppressor. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 7 (10), S. 896–903.
- Reddy, J. C.; Licht, J. D. (1996): The WT1 Wilms' tumor suppressor gene: how much do we really know? In: *Biochimica et biophysica acta* 1287 (1), S. 1–28.
- Renshaw, J.; King-Underwood, L.; Pritchard-Jones, K. (1997): Differential splicing of exon 5 of the Wilms tumour (WT1) gene. In: *Genes, chromosomes & cancer* 19 (4), S. 256–266.
- Richard, D. J.; Schumacher, V.; Royer-Pokora, B.; Roberts, S. G. (2001): Par4 is a coactivator for a splice isoform-specific transcriptional activation domain in WT1. In: *Genes & development* 15 (3), S. 328–339. DOI: 10.1101/gad.185901.
- Rio Frio, Thomas; Lavoie, Josée; Hamel, Nancy; Geyer, Felipe C.; Kushner, Yaël B.; Novak, David J. et al. (2010): Homozygous BUB1B mutation and susceptibility to gastrointestinal neoplasia. In: *The New England journal of medicine* 363 (27), S. 2628–2637. DOI: 10.1056/NEJMoa1006565.
- Ritchey, Michael L. (2005): Renal sparing surgery for Wilms tumor. In: *J. Urol.* 174 (4 Pt 1), S. 1172–1173.
- Rivera, Miguel N.; Kim, Woo Jae; Wells, Julie; Driscoll, David R.; Brannigan, Brian W.; Han, Moonjoo et al. (2007): An X chromosome gene, WTX, is commonly inactivated in Wilms tumor. In: *Science* 315 (5812), S. 642–645. DOI: 10.1126/science.1137509.
- Royer-Pokora, B. (2013 Jan): Genetics of pediatric renal tumors. In: *Pediatric Nephrology* 28 (1), S. 13–23.
- Royer-Pokora, Brigitte; Busch, Maike; Beier, Manfred; Duhme, Constanze; Torres, Carmen de; Mora, Jaime et al. (2010): Wilms tumor cells with WT1 mutations have characteristic features of mesenchymal stem cells and express molecular markers of paraxial mesoderm. In: *Hum. Mol. Genet.* 19 (9), S. 1651–1668. DOI: 10.1093/hmg/ddq042.
- Royer-Pokora, Brigitte; Weirich, Angela; Schumacher, Valerie; Uschkereit, Constanze; Beier, Manfred; Leuschner, Ivo et al. (2008): Clinical relevance of mutations in the Wilms tumor suppressor 1 gene WT1 and the cadherin-associated protein beta1 gene CTNNB1 for patients with Wilms tumors: results of long-term surveillance of 71 patients from International Society of Pediatric Oncology Study 9/Society for Pediatric Oncology. In: *Cancer* 113 (5), S. 1080–1089. DOI: 10.1002/cncr.23672.
- Royer-Pokora, Schumacher Valerie (2001, 471-495): Molekularmedizinische Grundlagen von hereditären Tumorerkrankungen. Hereditäre Tumorerkrankungen. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg (Molekulare Medizin).
- Ruteshouser, E. Cristy; Robinson, Stephen M.; Huff, Vicki (2008): Wilms tumor genetics: mutations in WT1, WTX, and CTNNB1 account for only about one-third of tumors. In: *Genes Chromosomes Cancer* 47 (6), S. 461–470. DOI: 10.1002/gcc.20553.

- Saha, Taniya; Kar, Rajiv K.; Sa, Gaurisankar (2014): Structural and sequential context of p53: A review of experimental and theoretical evidence. In: *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. DOI: 10.1016/j.pbiomolbio.2014.12.002.
- Saha, P.; Thome, K. C.; Yamaguchi, R.; Hou, Z.; Weremowicz, S.; Dutta, A. (1998): The human homolog of *Saccharomyces cerevisiae* CDC45. In: *The Journal of biological chemistry* 273 (29), S. 18205–18209.
- Sampson, Valerie B.; David, Justin M.; Puig, Isabel; Patil, Pratima U.; Herreros, Antonio García de; Thomas, George V.; Rajasekaran, Ayyappan K. (2014): Wilms' tumor protein induces an epithelial-mesenchymal hybrid differentiation state in clear cell renal cell carcinoma. In: *PLoS one* 9 (7), S. e102041. DOI: 10.1371/journal.pone.0102041.
- Samuvel, Devadoss J.; Jin, Junfei; Sundararaj, Kamala P.; Li, Yanchun; Zhang, Xiaoming; Lopes-Virella, Maria F.; Huang, Yan (2011): TLR4 activation and IL-6-mediated cross talk between adipocytes and mononuclear cells synergistically stimulate MMP-1 expression. In: *Endocrinology* 152 (12), S. 4662–4671. DOI: 10.1210/en.2011-1026.
- Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A. R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74 (12), S. 5463–5467.
- Satoh, Y.; Nakadate, H.; Nakagawachi, T.; Higashimoto, K.; Joh, K.; Masaki, Z. et al. (2006): Genetic and epigenetic alterations on the short arm of chromosome 11 are involved in a majority of sporadic Wilms' tumours. In: *Br. J. Cancer* 95 (4), S. 541–547. DOI: 10.1038/sj.bjc.6603302.
- Saxén, Lauri (1987): Organogenesis of the kidney. 1. publ. Cambridge u.a.: Cambridge Univ. Press (Developmental and cell biology series, 19).
- Scharnhorst, V.; Dekker, P.; van der Eb, A. J.; Jochemsen, A. G. (1999): Internal translation initiation generates novel WT1 protein isoforms with distinct biological properties. In: *J. Biol. Chem.* 274 (33), S. 23456–23462.
- Scharnhorst, V.; van der Eb, A. J.; Jochemsen, A. G. (2001): WT1 proteins: functions in growth and differentiation. In: *Gene* 273 (2), S. 141–161.
- Scholz, Holger; Kirschner, Karin M. (2005): A role for the Wilms' tumor protein WT1 in organ development. In: *Physiology (Bethesda)* 20, S. 54–59. DOI: 10.1152/physiol.00048.2004.
- Schumacher, V.; Schneider, S.; Figge, A.; Wildhardt, G.; Harms, D.; Schmidt, D. et al. (1997): Correlation of germ-line mutations and two-hit inactivation of the WT1 gene with Wilms tumors of stromal-predominant histology. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 94 (8), S. 3972–3977.
- Seabra, Catarina M.; Quental, Sofia; Neto, Ana Paula; Carvalho, Filipa; Gonçalves, João; Oliveira, João Paulo et al. (2014): A novel Alu-mediated microdeletion at 11p13 removes WT1 in a patient with cryptorchidism and azoospermia. In: *Reproductive biomedicine online* 29 (3), S. 388–391. DOI: 10.1016/j.rbmo.2014.04.017.
- Sheu, Yi-Jun; Stillman, Bruce (2010): The Dbf4-Cdc7 kinase promotes S phase by alleviating an inhibitory activity in Mcm4. In: *Nature* 463 (7277), S. 113–117. DOI: 10.1038/nature08647.
- Shibata, Rie; Takata, Ayako; Hashiguchi, Akinori; Umezawa, Akihiro; Yamada, Taketo; Hata, Jun-Ichi (2003): Responsiveness of chemotherapy based on the histological type and Wilms' tumor suppressor gene mutation in bilateral Wilms' tumor. In: *Pathology international* 53 (4), S. 214–220.

- Singh, Kulwant; Dilworth, F. Jeffrey (2013): Differential modulation of cell cycle progression distinguishes members of the myogenic regulatory factor family of transcription factors. In: *FEBS J.* 280 (17), S. 3991–4003. DOI: 10.1111/febs.12188.
- Sliva, Katja; Schnierle, Barbara S. (2010): Selective gene silencing by viral delivery of short hairpin RNA. In: *Virology* 7, S. 248. DOI: 10.1186/1743-422X-7-248.
- Solaini, Giancarlo; Sgarbi, Gianluca; Baracca, Alessandra (2011): Oxidative phosphorylation in cancer cells. In: *Biochimica et biophysica acta* 1807 (6), S. 534–542. DOI: 10.1016/j.bbabi.2010.09.003.
- Solhaug, Michael J.; Bolger, Philip M.; Jose, Pedro A. (2004): The developing kidney and environmental toxins. In: *Pediatrics* 113 (4 Suppl), S. 1084–1091.
- Solinas-Toldo, S.; Lampel, S.; Stilgenbauer, S.; Nickolenko, J.; Benner, A.; Döhner, H. et al. (1997): Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. In: *Genes Chromosomes Cancer* 20 (4), S. 399–407.
- Soneoka, Y.; Cannon, P. M.; Ramsdale, E. E.; Griffiths, J. C.; Romano, G.; Kingsman, S. M.; Kingsman, A. J. (1995): A transient three-plasmid expression system for the production of high titer retroviral vectors. In: *Nucleic Acids Res.* 23 (4), S. 628–633.
- Spraggon, L.; Dudnakova, T.; Slight, J.; Lustig-Yariv, O.; Cotterell, J.; Hastie, N.; Miles, C. (2007): hnRNP-U directly interacts with WT1 and modulates WT1 transcriptional activation. In: *Oncogene* 26 (10), S. 1484–1491. DOI: 10.1038/sj.onc.1209922.
- Stone, M. M.; Beaver, B. L.; Sun, C. C.; Hill, J. L. (1990): The nephroblastomatosis complex and its relationship to Wilms' tumor. In: *Journal of pediatric surgery* 25 (9), S. 933-7; discussion 937-8.
- Sury, R. de; Martinez, P.; Procaccio, V.; Lunardi, J.; Issartel, J. P. (1998): Genomic structure of the human NDUFS8 gene coding for the iron-sulfur TYKY subunit of the mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase. In: *Gene* 215 (1), S. 1–10.
- Swanson, Todd A.; Kim, Sandra I.; Glucksman, Marc J.; Lieberman, Michael (2010): Biochemistry, molecular biology, and genetics. 5th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins (Board review series).
- Tapscott, Stephen J. (2005): The circuitry of a master switch: MyoD and the regulation of skeletal muscle gene transcription. In: *Development* 132 (12), S. 2685–2695. DOI: 10.1242/dev.01874.
- Terenziani, Monica; Spreafico, Filippo; Collini, Paola; Piva, Luigi; Perotti, Daniela; Podda, Marta et al. (2004): Adult Wilms' tumor: A monoinstitutional experience and a review of the literature. In: *Cancer* 101 (2), S. 289–293. DOI: 10.1002/cncr.20387.
- Thevendran, Gowreeson; Farne, Hugo A.; Kaisary, Amir V. (2010): Wilms tumor in a 37-year-old. In: *J Clin Med Res* 2 (4), S. 194–197. DOI: 10.4021/jocmr377w.
- Ton, C.; Hwang, D. M.; Dempsey, A. A.; Liew, C. C. (1997): Identification and primary structure of five human NADH-ubiquinone oxidoreductase subunits. In: *Biochemical and biophysical research communications* 241 (2), S. 589–594. DOI: 10.1006/bbrc.1997.7707.
- Tongaonkar, Hemant B.; Qureshi, Sajid S.; Kurkure, Purna A.; Muckaden, Mary-Ann A.; Arora, Brijesh; Yuvaraja, Thyavihalli B. (2007): Wilms' tumor: An update. In: *Indian J Urol* 23 (4), S. 458–466. DOI: 10.4103/0970-1591.36722.
- Tontonoz, P.; Graves, R. A.; Budavari, A. I.; Erdjument-Bromage, H.; Lui, M.; Hu, E. et al. (1994): Adipocyte-specific transcription factor ARF6 is a heterodimeric complex of two nuclear hormone receptors, PPAR gamma and RXR alpha. In: *Nucleic acids research* 22 (25), S. 5628–5634.
- Ulfing, Norbert (2011): Kurzlehrbuch Histologie. 3., überarb. Aufl. Stuttgart [u.a.]: Thieme.

- Vainio, Seppo; Lin, Yanfeng (2002): Coordinating early kidney development: lessons from gene targeting. In: *Nature reviews. Genetics* 3 (7), S. 533–543. DOI: 10.1038/nrg842.
- Varum, Sandra; Rodrigues, Ana S.; Moura, Michelle B.; Momcilovic, Olga; Easley, Charles A.; Ramalho-Santos, João et al. (2011): Energy metabolism in human pluripotent stem cells and their differentiated counterparts. In: *PloS one* 6 (6), S. e20914. DOI: 10.1371/journal.pone.0020914.
- Verschuur, Arnould C.; Vujanic, Gordan M.; van Tinteren, Harm; Jones, Kathy Pritchard; Kraker, Jan de; Sandstedt, Bengt (2010): Stromal and epithelial predominant Wilms tumours have an excellent outcome: the SIOP 93 01 experience. In: *Pediatr Blood Cancer* 55 (2), S. 233–238. DOI: 10.1002/pbc.22496.
- Vujanić Gordan M. (2009): Renal tumours of childhood: an overview. In: *Diagnostic Histopathology* 15 (11), S. 501–509.
- Vujanić, Gordan M.; Sandstedt, Bengt; Harms, Dieter; Kelsey, Anna; Leuschner, Ivo; Kraker, Jan de (2002): Revised International Society of Paediatric Oncology (SIOP) working classification of renal tumors of childhood. In: *Medical and pediatric oncology* 38 (2), S. 79–82.
- Vuononvirta, Raisa; Sebire, Neil J.; Dallosso, Anthony R.; Reis-Filho, Jorge S.; Williams, Richard D.; Mackay, Alan et al. (2008): Perilobar nephrogenic rests are nonobligate molecular genetic precursor lesions of insulin-like growth factor-II-associated Wilms tumors. In: *Clin. Cancer Res.* 14 (23), S. 7635–7644. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-08-1620.
- Wagner, Kay-Dietrich; Wagner, Nicole; Schedl, Andreas (2003): The complex life of WT1. In: *J. Cell. Sci.* 116 (Pt 9), S. 1653–1658.
- Wagner, Kay-Dietrich; Wagner, Nicole; Vidal, Valerie P I; Schley, Gunnar; Wilhelm, Dagmar; Schedl, Andreas et al. (2002): The Wilms' tumor gene Wt1 is required for normal development of the retina. In: *The EMBO journal* 21 (6), S. 1398–1405. DOI: 10.1093/emboj/21.6.1398.
- Wagner, E. K; Roizman, B. (1968): Effect of the Vinca alkaloids on RNA synthesis in human cells in vitro. In: *Science (New York, N.Y.)* 162 (3853), S. 569–570.
- Walker, Kenneth A.; Bertram, John F. (2011): Kidney development: core curriculum 2011. In: *American journal of kidney diseases: the official journal of the National Kidney Foundation* 57 (6), S. 948–958. DOI: 10.1053/j.ajkd.2011.03.009.
- Wallner, E. I.; Carone, F. A.; Abrahamson, D. R.; Kumar, A.; Kanwar, Y. S. (1997): Diverse aspects of metanephric development. In: *Microscopy research and technique* 39 (3), S. 261–284. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0029(19971101)39:3<261::AID-JEMT6>3.0.CO;2-N
- Wang, Qiuyu; Kumar, Shant; Slevin, Mark; Kumar, Patricia (2006): Functional analysis of alternative isoforms of the transcription factor PAX3 in melanocytes in vitro. In: *Cancer research* 66 (17), S. 8574–8580. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-0947.
- Wang, Z. Y.; Qiu, Q. Q.; Enger, K. T.; Deuel, T. F. (1993): A second transcriptionally active DNA-binding site for the Wilms tumor gene product, WT1. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90 (19), S. 8896–8900.
- Wegert, Jenny; Wittmann, Stefanie; Leuschner, Ivo; Geissinger, Eva; Graf, Norbert; Gessler, Manfred (2009): WTX inactivation is a frequent, but late event in Wilms tumors without apparent clinical impact. In: *Genes Chromosomes Cancer* 48 (12), S. 1102–1111. DOI: 10.1002/gcc.20712.

- Weirich, A.; Leuschner, I.; Harms, D.; Vujanic, G. M.; Tröger, J.; Abel, U. et al. (2001): Clinical impact of histologic subtypes in localized non-anaplastic nephroblastoma treated according to the trial and study SIOP-9/GPOH. In: *Ann. Oncol.* 12 (3), S. 311–319.
- Wells, Julie; Rivera, Miguel N.; Kim, Woo Jae; Starbuck, Kristen; Haber, Daniel A. (2010): The predominant WT1 isoform (+KTS) encodes a DNA-binding protein targeting the planar cell polarity gene Scribble in renal podocytes. In: *Molecular cancer research : MCR* 8 (7), S. 975–985. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-10-0033.
- Wilms, Max (1899): Die Mischgeschwülste der Niere. Leipzig: A. Georgi (Die Mischgeschwülste / Von Dr. M. Wilms, Docent für Chirurgie in Leipzig, 1).
- Yachida, Shinichi; Jones, Siân; Bozic, Ivana; Antal, Tibor; Leary, Rebecca; Fu, Baojin et al. (2010): Distant metastasis occurs late during the genetic evolution of pancreatic cancer. In: *Nature* 467 (7319), S. 1114–1117. DOI: 10.1038/nature09515.
- Yang, L.; Han, Y; Suarez Saiz, F.; Saurez Saiz, F.; Minden, M. D. (2007): A tumor suppressor and oncogene: the WT1 story. In: *Leukemia* 21 (5), S. 868–876. DOI: 10.1038/sj.leu.2404624.
- Yoshizawa-Sugata, Naoko; Ishii, Ai; Taniyama, Chika; Matsui, Etsuko; Arai, Ken-ichi; Masai, Hisao (2005): A second human Dbf4/ASK-related protein, Drf1/ASKL1, is required for efficient progression of S and M phases. In: *The Journal of biological chemistry* 280 (13), S. 13062–13070. DOI: 10.1074/jbc.M411653200.
- Yu, Jing; Valerius, M. Todd; Duah, Mary; Staser, Karl; Hansard, Jennifer K.; Guo, Jin-Jin et al. (2012): Identification of molecular compartments and genetic circuitry in the developing mammalian kidney. In: *Development (Cambridge, England)* 139 (10), S. 1863–1873. DOI: 10.1242/dev.074005.
- Zhang, Yi; Yang, Jin-Ming (2013): Altered energy metabolism in cancer: a unique opportunity for therapeutic intervention. In: *Cancer biology & therapy* 14 (2), S. 81–89. DOI: 10.4161/cbt.22958.
- Zheng, Jie (2012): Energy metabolism of cancer: Glycolysis versus oxidative phosphorylation (Review). In: *Oncology letters* 4 (6), S. 1151–1157. DOI: 10.3892/ol.2012.928.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinen ganz besonderen Dank an meine Doktormutter Frau Prof. Dr. Royer-Pokora richten, für die Möglichkeit diese Arbeit an ihrem Institut und unter ihrer Anleitung durchzuführen zu können und ihr Vertrauen in mich. Ihre permanente Unterstützung, wertvollen Anregungen sowie ihr offenes Ohr bei kniffligen Fragestellungen haben sehr zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen. Auch ihr großes Interesse an den durchgeführten Versuchen und ihre wissenschaftliche Begeisterung haben mich stets aufs Neue motiviert. Des Weiteren möchte ich mich für die konstruktive Kritik und die Korrektur bei der Anfertigung dieser Arbeit sowie das Gutachten und die Abnahme der Prüfung bedanken.

Herrn Prof. Dr. William F. Martin danke ich herzlich für das Erstellen des Gutachtens und für die Abnahme der Prüfung.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen Mitarbeitern vom Institut für Humangenetik und Anthropologie, die mich während der ganzen Zeit begleitet haben und für eine angenehme Arbeitsatmosphäre gesorgt haben. Besonders danke ich hier Ina Bachmann und Sabrina von Spee. Beide haben mich in schwierigen Situationen aufgebaut und mir jederzeit hilfsbereit zur Seite standen.

Mein größter Dank gilt meiner Familie, meiner wunderbaren Freundin Coline und meinen besten Freunden. Während der gesamten Zeit waren sie alle ein fester Anker in mach stürmischen Augenblicken. Sie gaben mir immer wieder Rückhalt und standen mir unterstützend und liebevoll zur Seite. Coline war in schwierigen Situationen sehr geduldig mit mir und hat stets aufbauende Worte für mich parat gehabt hat, die mich motiviert haben, so manch lange Nacht am Computer zu verbringen. Nicht genug danken kann ich ihr für die unzähligen Korrekturen, die sie vorgenommen hat, damit diese Arbeit lesefreudiger wird. Meine Schwestern Inna und Valentina haben es immer zu verstehen gewusst, mich auf andere Gedanken zu bringen. Alle zusammen haben grundlegend zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen, wofür ich ihnen für immer dankbar sein werde.

Eidesstattliche Erklärung

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe unter Beachtung der Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keinen erfolglosen Promotionsversuch unternommen.

Ort, Datum

Unterschrift