

Aus dem Institut für Humangenetik und Anthropologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktorin: Univ.-Prof. Dr. Royer-Pokora

WTX-Mutationsanalyse bei Wilms-Tumoren

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Eva Heine

2017

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. N. Klöcker

Erstgutachterin: Univ.-Prof. Dr. B. Royer-Pokora

Zweitgutachter: Univ.-Prof. Dr. N. H. Stoecklein

Zusammenfassung

Der Wilms-Tumor (WT), auch Nephroblastom genannt, ist der häufigste Nierentumor bei Kindern. Die Inzidenz liegt bei ca. einem auf Zehntausend Kinder und hat einen Häufigkeitsgipfel zwischen dem zweiten bis vierten Lebensjahr. Es sind verschiedene genetische Faktoren bekannt, die an der Entstehung von WT beteiligt sind. Allerdings sind sie nur für etwa ein Viertel aller WT verantwortlich. 2007 entdeckte Rivera et al. ein weiteres betroffenes Gen: *Wilms Tumor Gene on the X chromosome (WTX)*. In dieser Erstpublikation war das Gen bei bis zu 30% der WT mutiert. Weitere Untersuchungen zeigten allerdings, dass der Anteil der *WTX*-Mutationen zum Teil wesentlich geringer war (12-20%).

Ziel der Arbeit war es zu untersuchen, ob *WTX*-Mutationen in den für diese Arbeit analysierten Proben nachweisbar waren und wie hoch deren Anteil war. Hierzu wurden die Methoden zur *WTX*-Mutationsanalyse etabliert und durchgeführt. Als Erstes durchliefen alle Proben ein Mutationsscreening mittels *denaturing high performance liquid chromatography*. Bei aberranten Ergebnissen folgte als Zweites eine Sequenzierung zur genauen Bestimmung der Mutation. Da Deletionen häufiger als Mutationen in *WTX* vorkamen, wurden einige Proben zudem in einer *quantitative real-time* PCR untersucht. Lag eine *WTX*-Deletion vor, wurde die Suche auf eine Deletion des kurzen und langen Arms des X-Chromosoms erweitert.

Ein weiterer Teil der Arbeit war die Analyse, ob *WTX* im WT exprimiert wurde. Dies erfolgte durch reverse Transkription.

Insgesamt wurden 48 Patientenproben untersucht. Bei elf dieser Proben (22,9%) lag eine Aberration in *WTX* vor. Es wurden sechs Punktmutationen (zwei davon in einer Probe) gefunden, wobei zwei der Mutationen noch nicht beschrieben waren. In der Deletionsanalyse waren sechs Proben auffällig. Bei diesen im *WTX*-Gen deletierten Proben ließen sich keine zusätzlichen Deletionen auf dem langen oder kurzen Arm des X-Chromosoms nachweisen.

Mutationen in *WTX* waren in den vorliegenden untersuchten Proben durch neu etablierte Methoden nachweisbar. Der Anteil der *WTX*-Aberrationen lag in dieser Arbeit etwas niedriger, als in der Erstpublikation von Rivera et al. beschrieben. Da *WTX* ein neu entdecktes Gen und seine Funktion noch nicht vollständig entschlüsselt werden konnte, lässt sich über die Auswirkung der *WTX*-Punktmutationen für den WT nur Vermutungen anstellen. Zum vollständigen Verständnis der Rolle von *WTX* in der Entstehung des WT sind noch weitere Untersuchungen notwendig.

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
ACN	Acetonitril
AK	Antikörper
Ala	Alanin
AN-Puffer	Ammoniumnitrat-Puffer
<i>APC</i>	<i>Adenomatous-polypsis-coli</i> -Gen
Aqua dest.	Aqua destillata
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
Arg	Arginin
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften
bl	bilateral
BMFZ	Biologisch-Medizinisches Forschungszentrum (Universität Düsseldorf)
bp	Basenpaare
C	Cytosin
cDNA	<i>complementary</i> DNA
CGH	<i>comparative genomic hybridization</i>
Ct	<i>cycle threshold</i>
CT	Computertomographie
<i>CTNNB1</i>	<i>β-Catenin</i> -Gen
DA	Diagnosealter
DEPC	Diethylpyrocarbonat
Del	Deletion
Δ	delta
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DHPLC	<i>denaturing high-performance liquid chromatography</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	<i>et alii/aliae</i> (und andere)
EtOH	Ethanol
<i>FAH</i>	<i>Fumarylacetoacetase</i> -Gen

FC	<i>Fold Change</i>
fs	<i>frameshift</i>
G	Guanin
<i>GAPDH</i>	<i>Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase-Gen</i>
Gln	Glutamin
Glu	Glutaminsäure
Gly	Glycin
GO-ESP	<i>Grand Opportunity Exome Sequencing Project</i>
GPOH	Gesellschaft für pädiatrische Onkologie und Hämatologie
°C	Grad Celsius
H ₂ O	Wasser
HCl	Chlorwasserstoff
His	Histidin
ILNR	intralobärer nephrogener Rest
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
Ko	Kontrolle
l	Liter
Leu	Leucin
LOH	<i>loss of heterozygosity</i>
LOI	<i>loss of imprinting</i>
M	Molar
♂	männlich
m	männlich
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
Mo	Monat
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MRT	Magnetresonanztomographie
mV	Millivolt

MW	Mittelwert
NaOH	Natriumhydroxid
<i>NDST1</i>	<i>N-deacetylase/N-sulfotransferase (heparan glucosaminyI) 1 – Gen</i>
NHLBI	<i>National Heart, Lung and Blood Institute</i>
nm	Nanometer
<i>OCRL</i>	<i>oculocerebrorenal syndrome of Lowe, phosphatidylinositol polyphosphate 5-phosphatase-Gen</i>
OD	optische Dichte
OH	Hydroxygruppe
OSCS	<i>osteopathia striata with cranial sclerosis</i> (Osteopathia striata mit kranialer Sklerose)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
Phe	Phenylalanin
<i>PHEX</i>	<i>Phosphate regulating endopeptidase on the X-chromosome-Gen</i>
PLNR	perilobärer nephrogener Rest
Pro	Prolin
qPCR	<i>quantitative real time</i> PCR
R ²	Determinationskoeffizient
ref SNP ID	<i>reference single nucleotide polymorphism identification number</i>
Rn	relative Fluoreszenz des Zyklus n
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Reverse Transkriptase
σ	Standardabweichung
Ser	Serin
SIOP	<i>Société Internationale d’Oncologie Pédiatrique</i>
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i> (Einzelnukleotid-Polymorphismus)
T	Thymin
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TCF	T-Zell-spezifischer Transkriptionsfaktor
TD	<i>Touchdown</i>
TEAA	Triethylammoniumacetat

Thr	Threonin
Temp	Temperatur
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tris HCl	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-Hydrochlorid
Tyr	Tyrosin
U	<i>Unit</i>
UCSC	<i>University of California, Santa Cruz</i>
ul	unilateral
UV	ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumenprozent
vgl.	vergleiche
vs.	versus
w	weiblich
♀	weiblich
WT	Wilms-Tumor
<i>WT1</i>	<i>Wilms-Tumor 1-Gen</i>
<i>WTX</i>	<i>Wilms Tumor gene on the X chromosome</i>
X	Stopp
Xp	kurzer Arm des X-Chromosoms
Xq	langer Arm des X-Chromosoms

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung – Der Wilms-Tumor	1
1.1	Geschichte und Epidemiologie.....	1
1.2	Klinik und Diagnostik.....	1
1.3	Entstehung	2
1.4	Stadieneinteilung.....	3
1.5	Therapie.....	4
1.6	Prognose.....	5
1.7	Nachsorge.....	5
1.8	Assoziierte Fehlbildungen	5
1.9	Molekulare Ursachen des WT	6
1.9.1	<i>Wilms-Tumor (WT) 1-Gen</i>	6
1.9.2	<i>β-Catenin-Gen</i>	7
1.9.3	<i>Wilms Tumor Gene on the X Chromosome (WTX)</i>	8
2	Material und Methoden.....	13
2.1	Material	13
2.1.1	Patientenkollektiv	13
2.1.2	Untersuchungsmaterialien	14
2.2	Methoden	20
2.2.1	DNA-Isolation.....	20
2.2.2	DNA-Konzentrationsbestimmung	21
2.2.3	Polymerase-Kettenreaktion.....	21
2.2.4	<i>denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC)</i>	33
2.2.5	Sequenzierung.....	37
2.2.6	Reverse Transkription (cDNA-Synthese)	39
3	Ergebnisse	41
3.1	Überblick über die <i>WTX</i> -Ergebnisse	41

3.2	PCR-Etablierung	42
3.3	Mutationsanalyse per DHPLC	43
3.3.1	Etablierung der DHPLC für <i>WTX</i>	43
3.3.2	DHPLC-Ergebnisse.....	44
3.4	Mutationsanalyse per Sequenzierung	47
3.5	<i>WTX</i> -Deletionsanalyse per qPCR	50
3.5.1	Primeretablierung zur <i>WTX</i> -Deletionsanalyse	51
3.5.2	Ergebnisse der qPCR	53
3.5.3	qPCR-Ergebnisse verschiedener WT eines Patienten.....	55
3.5.4	qPCR-Ergebnisse von mikrodisezierten Proben	58
3.5.5	qPCR-Ergebnisse zur Größenbestimmung der Deletion auf dem X-Chromosom.....	61
3.6	Reverse Transkription (cDNA-Synthese)	61
4	Diskussion.....	65
4.1	Diskussion der Etablierung verschiedener Methoden zur <i>WTX</i> -Analyse	65
4.2	Diskussion der gefundenen <i>WTX</i> -Mutationen.....	69
5	Literaturverzeichnis	79

1 Einleitung – Der Wilms-Tumor

1.1 Geschichte und Epidemiologie

Der Wilms-Tumor (WT) ist ein maligner Nierentumor, der vorwiegend im Kindesalter auftritt. In dieser Altersgruppe ist er der häufigste Nierentumor und überhaupt einer der häufigsten soliden Tumore (Kaatsch 2010). Er wurde benannt nach Max Wilms, der 1899 Gemeinsamkeiten verschiedener beschriebener kindlicher Nierentumore entdeckte und diese in einer Publikation unter „Die Mischgeschwülste der Niere“ (Wilms 1899) zusammenfasste. Aufgrund der Entstehung des Tumors aus embryonalem Gewebe wird der WT auch Nephroblastom genannt (s. 1.3).

Laut dem Jahresbericht 2013/14 des Deutschen Kinderkrebsregisters (Kaatsch und Spix 2014) liegt die kumulative Inzidenz bei 126 auf eine Millionen Kinder unter 15 Jahre, wobei Mädchen etwas häufiger betroffen sind als Jungen. Das mittlere Alter bei Diagnosestellung beträgt drei Jahre und ein Monat. In der überwiegenden Anzahl der Fälle tritt der WT unilateral (98%, Pastore et al. 2006) und sporadisch auf (nur 1,5% familiäres Auftreten, Breslow et al. 1996).

1.2 Klinik und Diagnostik

Der WT ist meist asymptomatisch und fällt in etwa zwei Drittel der Fälle durch eine schmerzlose Raumforderung des Abdomens auf (Furtwängler et al. 2005). Nur 10-15% der Erkrankten zeigen eine Hämaturie. Weit seltenere Symptome sind Obstipation, Gewichtsverlust, Harnwegsinfektion oder Diarrhoe.

Der WT wächst lokal destruierend und kann metastasieren. Vor allem regionale Lymphknoten und die Lunge können von Metastasen betroffen sein.

Zur Diagnostik werden verschiedene bildgebende Verfahren eingesetzt (Graf und Reinhard 2003). An erster Stelle steht die Abdomensonographie. Damit kann die Verdachtsdiagnose gestellt und die ungefähre Größe des Tumors abgeschätzt werden. Als nächstes folgt die Magnetresonanztomographie (MRT) des Abdomens zur Darstellung der genauen Ausbreitung des WT und dem eventuellen Vorliegen von Lymphknotenmetastasen. Falls kein MRT möglich ist oder diese Diagnostik Zweifel an der Diagnosestellung lässt, kann zusätzlich eine Computertomographie (CT) durchgeführt werden.

Zur weiteren Metastasensuche erhält jeder Patient außerdem ein Röntgenbild des Thorax. Gibt es hier einen Herdbefund, komplettiert ein Spiral-CT des Thorax die Diagnostik.

Laborchemisch sind bisher keine Parameter zur Diagnosestellung des WT etabliert. Kommt allerdings differentialdiagnostisch ein Neuroblastom in Betracht, müssen Katecholaminmetabolite im Urin und Serum bestimmt werden. Ein Neuroblastom ist ein Tumor, der aus der Neuralleiste entsteht. Er kann in ähnlicher Lage im gleichen Lebensalter wie der WT auftreten und stellt deshalb eine wichtige Differentialdiagnose dar.

Eine primäre Tumorbioptie wird nach der aktuellen Leitlinie der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (2008) für Kinder über sechs Monate und unter 16 Jahren nicht empfohlen.

1.3 Entstehung

Der WT ist ein embryonaler Tumor, der sich häufig aus einem nephrogenen Rest in der Niere entwickelt (Rivera und Haber 2005). Der nephrogene Rest ist embryonales Gewebe (auch metanephrogenes Blastem genannt), das normalerweise nach Abschluss der Nierenentwicklung in der Niere nicht mehr vorhanden ist. Die Nierenentwicklung ist zumeist in der 36. Schwangerschaftswoche beendet.

Von dem nephrogenen Rest gibt es zwei Subtypen, der perilobäre nephrogene Rest (PLNR) und der intralobäre nephrogene Rest (ILNR, Beckwith et al. 2009). Der PLNR-Subtyp liegt in der Peripherie und enthält überwiegend blastemale oder epitheliale Zellen. Er ist häufiger als der ILNR-Subtyp und ein WT hieraus entsteht eher spät. Der ILNR-Subtyp hingegen besteht aus verschiedenen Zelltypen, unter anderem Stromazellen. Er kommt überall im Nierenlappen, im Sinus renalis sowie in den Wänden des Sammelrohrsystems vor. Ein WT aus dem ILNR-Subtyp entwickelt sich früher.

In diesen nephrogenen Resten sind die Zellen noch undifferenziert und es können verschiedene Zelltypen entstehen. Wie bereits oben beschrieben, gehören Epithel-, Stroma- und Blastemzellen zu den häufig vorkommenden Zelltypen. Liegen diese drei Zelltypen dann im Tumor gleichzeitig vor, spricht man von einem triphasischen Tumor. Es können aber auch Mesenchymalzellen in verschiedene Differenzierungsstadien oder anaplastische Zellen vorkommen (s. 1.4).

1.4 Stadieneinteilung

Der WT wird anhand seiner Ausbreitung in verschiedene Stadien unterteilt (Tabelle 1, Vujanić et al. 2002). Je größer der Tumor bzw. dessen Ausbreitung, umso höher das Stadium. Davon ausgenommen sind Stadium IV und V. Diesen Stadien werden alle Tumore mit Metastasen (außer abdominelle Lymphknotenmetastasen, s.u.) bzw. alle bilateralen Tumore zugeordnet, unabhängig ihrer Größe.

Tabelle 1. Vereinfachte Stadieneinteilung des Wilms-Tumors nach Vujanić et al. (2002).

Stadium	Kriterien
I	Tumor auf Niere beschränkt
II	Tumorgewebe außerhalb der Nierenkapsel (Infiltration in Vena cava, Lymphgefäße oder anliegende Organe), vollständige Resektion möglich
III	Vorliegen eines der folgenden Kriterien: • keine vollständige Resektion des Tumors möglich • Tumorrupatur • offene Biopsie • abdominelle Lymphknotenmetastase • Tumorthrombus am Resektionsrand der Gefäße oder des Ureters
IV	hämatogene Metastase (Lunge, Leber, Knochen, Gehirn, etc.) oder lymphatische Metastase außerhalb des Abdomens oder Pelvis
V	Bilateraler Tumor

Des Weiteren kann der WT anhand von histologischen Kriterien in verschiedene Risikostufen eingeteilt werden. Die Risikostufen reichen vom niedrigen Risiko (Stufe I) über das intermediäre Risiko (Stufe II) bis zum hohen Risiko (Stufe III). Hier gibt es für vorbehandelte und primär nephrektomierte Patienten verschiedene Klassifikationen. Da in Deutschland meist eine präoperative Behandlung in Form einer Chemotherapie erfolgt, wird hier nur die Einteilung dieser Fälle dargestellt (Tabelle 2).

Tabelle 2. Vereinfachte histologische Einteilung des vorbehandelten Wilms-Tumors nach Vujanić et al. (2002).

Risiko	Histologie des Wilms-Tumors
I. niedrig	zystisch partiell differenziert komplett nekrotisch
II. intermediär	epithelreich stromareich Mischtyp regressiv fokale Anaplasie
III. hoch	blastemreich diffuse Anaplasie

Die präoperative Chemotherapie hat das Ziel, dass möglichst der gesamte Tumor zum Zeitpunkt der OP nekrotisch vorliegt. Dies würde einem niedrigen Risiko entsprechen. Nur wenn mehr als ein Drittel der Tumormasse noch vital ist, wird diese weiter analysiert und klassifiziert entsprechend der obigen Tabelle 2. Bei der vitalen Tumormasse müssen mehr als zwei Drittel der Masse eines Zelltyps vorliegen, um diese danach einzuteilen. Liegt zum Beispiel bei mehr als zwei Drittel der vitalen Masse ein epithelialer Zelltyp vor, würde der Tumor als epithelreich und demnach als intermediäres Risiko eingestuft werden.

Eine Ausnahme in dieser Nomenklatur erfolgt, wenn blastemale Zellen vorkommen. Beträgt dieser Anteil mindestens 10%, so wird der Tumor als Mischtyp bezeichnet. Übersteigt der Anteil aber wiederum zwei Drittel der vitalen Tumormasse, gilt er entsprechend der obigen Vorgehensweise als blastemreich und fällt somit in die hohe Risikostufe. Zu dieser Stufe zählen auch die WT mit diffuser Anaplasie.

1.5 Therapie

Die Therapie des WT sollte, wie auch bei anderen pädiatrisch-onkologischen Erkrankungen, im Rahmen von Studien und nach deren Protokollen erfolgen. Grundlage des Protokolls in Deutschland ist zumeist die Studie „SIOP 2001/GPOH“ (International Society of Paediatric Oncology, 2007). Die Therapie wird an das jeweilige Stadium und der Risikostufe angepasst. Sie besteht aus einer Chemotherapie, der Resektion des Tumors und eventuell einer Radiatio.

1.6 Prognose

Die Prognose ist mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 94% sehr gut (Kaatsch und Spix 2014), allerdings treten in 10-15% der Fälle Rezidive auf (D'Angio et al. 1989; Grundy et al. 1989).

Laut einer neueren Studie (Ness et al. 2013) hat eine überlebte kindliche Krebserkrankung und deren Therapie jedoch auch einen Einfluss auf das höhere Lebensalter. Die Untersuchung zeigte eine höhere Prävalenz für Gebrechlichkeit im Vergleich zu Gleichaltrigen. Gebrechlichkeit ist ein Phänotyp, der vor allem bei älteren Menschen auftritt. Er wird durch fünf körperliche Defizite charakterisiert: niedrige Muskelmasse, Erschöpfung, niedriger Energieverbrauch, Langsamkeit und Schwäche. Die höchste Prävalenz an Gebrechlichkeit zeigten Hirntumore, aber auch WT waren damit assoziiert. Als Grund dafür vermuten Ness et al. eine vorzeitige Alterung der Langzeitüberlebenden.

1.7 Nachsorge

Da in ca. 10-15% der Fälle Rezidive auftreten, ist die Nachsorge vor allem in den folgenden zwei Jahren besonders wichtig. Der Patient wird klinisch und mittels bildgebender Verfahren (Abdomensonographie, Röntgen Thorax, Skelettszintigraphie) untersucht (Schimpl 2010). Ebenfalls müssen mögliche Nebenwirkungen der Therapie überwacht werden. Dazu sind Kontrollen der Laborwerte, des Audiogramms und der Herzfunktion (durch EKG und Echokardiographie) nötig. Genauso wichtig ist die psychosoziale Anamnese. Psychische Belastungen sollen möglichst frühzeitig erkannt werden, damit, falls nötig, eine Therapie eingeleitet werden kann.

1.8 Assoziierte Fehlbildungen

In etwa zehn Prozent der Fälle ist der WT mit anderen kongenitalen Anomalien assoziiert (Merks et al. 2005; Narod et al. 1997). Hierzu zählen urogenitale Fehlbildungen, Aniridie oder Hemihypertrophie. Ein WT-assoziiertes Syndrom ist das sogenannte WAGR-Syndrom. Die Abkürzung leitet sich von den verschiedenen Komponenten des Syndroms ab: WT, Aniridie, Genitalfehlbildung und mentale Retardierung. Über die Höhe des Risikos der WT-Entstehung gibt es keine genauen Zahlen. Einige Autoren gehen davon aus, dass etwa die Hälfte der WAGR-Patienten einen WT entwickelt (Fischbach et al. 2005; Muto et al. 2002). Ein weiteres Syndrom,

das mit einem noch höheren WT-Risiko einhergeht, ist das Denys-Drash-Syndrom (Mueller 1994). Hier tritt der WT zusammen mit einer Nephropathie und einem intersexuellen Genitale auf. Die beiden Syndrome gehören zu den *Wilms-Tumor (WT) 1*-assoziierten Syndromen, da hier Aberrationen im *WT1*-Gen (s. 1.9.1) vorkommen. Bei den WT-assoziierten Fehlbildungen ist eine engmaschige und regelmäßige Kontrolle auf WT unerlässlich.

1.9 Molekulare Ursachen des WT

Bei der Erforschung der WT-Entstehung ergaben sich bereits früh Hinweise auf eine genetische Ursache. Knudson und Strong (1972) erklärten die Pathogenese des WT durch das *Two-Hit*-Modell. Dieses Modell kann sowohl auf sporadische als auch auf erbliche WT angewendet werden. Bei der sporadischen Form entsteht die Mutation spontan in einer somatischen Zelle, bei der erblichen Form liegt eine Keimbahnmutation bereits in der befruchteten Eizelle vor. Diese erste Mutation entspricht dem ersten *Hit*. Der zweite *Hit* ist eine Mutation in einer Nierenzelle, bzw. bei der sporadischen Form in genau der Nierenzelle, wo vorher der erste *Hit* stattgefunden hat. Vermehren sich diese Zellen nun weiter, kann daraus der WT entstehen.

Mittlerweile konnten einige Gene identifiziert werden, die bei dem WT eine Rolle spielen. Die häufigsten nachgewiesenen Genmutationen bei WT liegen in *WT1*, *Wilms Tumor Gene on the X Chromosome (WTX)* und im β -Catenin-Gen (*CTNNB1*; Scott et al. 2012). Diese Gene sollen im Folgenden näher erläutert werden.

Ein weiterer wichtiger Aspekt in der WT-Entstehung sind Allelverluste (*loss of heterozygosity*, LOH) oder epigenetische Veränderungen (*loss of imprinting*, LOI, Rainier et al. 1993). In der Vorstellung des *Two-Hit*-Modells sind diese häufig als zweiter *Hit* zu finden, wenn als erster *Hit* z.B. eine *WT1*-Mutation vorliegt.

1.9.1 *Wilms-Tumor (WT) 1*-Gen

Das *Wilms-Tumor (WT) 1*-Gen ist das erste identifizierte Gen, dessen Aberration an der Entstehung von WT beteiligt ist (Gessler et al. 1990; Call et al. 1990). Es liegt auf 11p13 und besteht aus zehn kodierenden Exons. Aufgrund von alternativen Spleißstellen können theoretisch 36 Isoformen gebildet werden (Hohenstein und Hastie 2006). Diese vielen verschiedenen Isoformen spiegeln die Komplexität und zum Teil widersprüchlichen Funktionen von *WT1* wider. Zum einen ist es ein

Tumorsuppressorgen im WT, zum anderen ein Onkogen in einigen adulten Tumoren. Das WT1-Protein hat eine DNA-Bindungsregion bestehend aus vier Zinkfinger-Motiven, die als Transkriptionsfaktor wirkt.

WT1 ist ein wichtiger Faktor in der Embryogenese, *WT1-knockout* Mäuse sind nicht lebensfähig (Kreidberg et al. 1993). In der Nierenentwicklung ist *WT1* zunächst für die Invasion der Ureterknospe und im weiteren Verlauf für die Differenzierung des Nephrons und der Glomeruli verantwortlich. Davies et al. (2003) postulierten, dass es bei einer Störung von *WT1* in dieser Phase zu einem abnormalen Zellwachstum kommt und es sich dabei um Vorläufer des WT handeln könnte.

WT1 ist in 10-15% aller WT mutiert. Besonders häufig ist hierbei die Zinkfingerregion betroffen, aber auch in anderen Regionen können Mutationen auftreten (Jeanpierre et al. 1998; Royer-Pokora et al. 2008; Schumacher et al. 1997). Wie bereits oben beschrieben sind das Denys-Drash- und WAGR-Syndrom mit bestimmten Aberrationen in diesem Gen assoziiert.

Mutationen im *WT1*-Gen unterstützen das *Two-Hit*-Modell von Knudson und Strong. Keimbahnmutationen in *WT1* führen nicht automatisch zu einem WT, sondern lediglich zu einem erhöhten Risiko für WT. Wie oben beschrieben, wäre also die Keimbahnmutation der erste *Hit* und zur WT-Entstehung wäre ein zweiter *Hit* notwendig.

1.9.2 β -Catenin-Gen

Das β -Catenin-Gen (*CTNNB1*) ist ein weiteres Gen, das in der WT-Entstehung eine Rolle spielt (Koesters et al. 1999). Es kodiert für das Protein β -Catenin und befindet sich auf 3p21. Es finden sich 17 Exons im Gen und es kommen drei Isoformen vor. Das Protein hat zwei verschiedene Hauptfunktionen (Bienz 2005). Zum einen ist es bedeutend für Zelladhäsion und zum anderen spielt es eine wichtige Rolle im Wnt-Signalweg. Die zweite Funktion scheint für verschiedene Tumore entscheidend zu sein. Der Wnt-Signalweg kann äußere Signale aufnehmen und überträgt sie über eine intrazelluläre Kaskade auf β -Catenin. Liegt kein Signal von außen vor, wird β -Catenin durch einen Proteinkomplex degradiert und abgebaut. Dieser Destruktionskomplex besteht u.a. aus *Adenomatous Polyposis Coli* (APC), Glykogensynthasekinase-3 β und Axin. Durch die Degradierung wird die Konzentration von β -Catenin in normalen Zellen auf einem niedrigen Level gehalten.

Ein Signal von außen erfolgt über das Protein Wnt. Es bindet an den äußeren Teil des Rezeptors und verhindert durch die ablaufende intrazelluläre Kaskade die Bildung des

Destruktionskomplexes. Dadurch wird β -Catenin nicht abgebaut und akkumuliert sowohl in der Zelle als auch im Zellkern. Im Zellkern reguliert β -Catenin dann zusammen mit T-Zell-spezifischen Transkriptionsfaktoren (TCF) die Transkription von Wnt-Zielgenen.

Mutationen in *β -Catenin* konnte schon in vielen verschiedenen Tumoren nachgewiesen werden, u.a. bei hepatozellulären Karzinomen, Neoplasien des Ovars oder auch im WT (Polakis 2000). Besonders häufig sind dabei Mutationen in Exon 3. Hier liegen Aminosäuren, die für die Phosphorylierung zuständig sind. Die Phosphorylierung ist der erste Schritt im Abbau von β -Catenin. Kann nun β -Catenin aufgrund der mutierten Aminosäuren nicht mehr phosphoryliert werden, resultiert daraus eine Stabilisierung des β -Catenins und es kann Zielgene im Zellkern aktivieren. In WT ist *CTNNB1* in 10-20% mutiert (Maiti et al. 2000). Neben Mutationen in Exon 3 kommen hier auch Mutationen in Exon 7 und 8 vor. Des Weiteren sind *CTNNB1*-Mutationen stark mit *WT1*-Mutationen assoziiert.

1.9.3 Wilms Tumor Gene on the X Chromosome (WTX)

Auf der Suche nach weiteren aberranten Genen im WT entdeckten Rivera et al. (2007) Deletionen in einer kleinen Region auf dem X-Chromosom. An dieser Stelle lag das bis dahin uncharakterisierte Gen *FAM123B/FLJ39827*. Aufgrund der Entdeckung in Zusammenhang mit WT nannten sie das Gen „*Wilms Tumor Gene on the X Chromosome*“, kurz *WTX*.

WTX liegt auf dem langen Arm des X-Chromosoms an der Stelle Xq11.1. Es gibt zwei Exons, allerdings wird nur das zweite Exon translatiert. Das Transkript besteht aus 7,5 kb und kodiert für ein Protein aus 1135 Aminosäuren.

Bisher sind zwei Spleißformen des *WTX* bekannt. Bei der gespleißten Form fehlen die Aminosäuren 50 bis 326 (Jenkins et al. 2008).

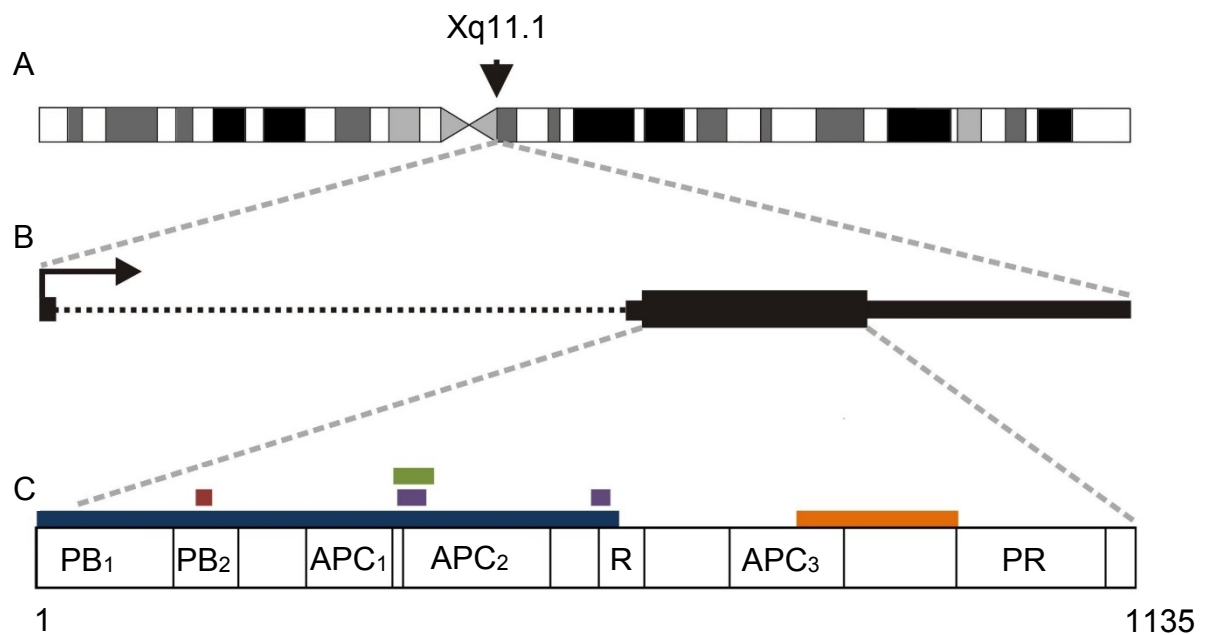


Abb. 1: WTX-Gen auf dem X-Chromosom und sein Proteinprodukt. A: X-Chromosom mit Lokalisation des WTX-Gens auf Xq11.1. B: WTX-Gen (Leserichtung von links nach rechts entspricht 5' zu 3'). Fettgedruckte Linie: kodierende Region. Dünngedruckte Linie: nicht-translatierte Region. Gepunktete Linie: Intron. C: WTX-Protein bestehend aus 1135 Aminosäuren mit eingezeichneten Bindungsstellen und Motiven. PB₁₋₂ = Phosphatidylinositol(4,5)-Bisphosphat-Bindungsstelle 1 und 2. APC₁₋₃ = APC-Bindungsstellen 1-3. R = Arginin-Glutaminsäure-Alanin-Sequenzmotiv. PR = prolinreiche Region. - = Axin-Conductin-Bindungsstelle. - = Kernlokalisierungssignal. - = *coiled-coil*-Domäne. - = saure Region. - = WT1-Bindungsregion. (Modifiziert nach Ruteshouser et al. 2008).

Die Funktion von WTX ist noch nicht vollständig entschlüsselt. Viele der vermuteten Funktionen basieren bisher auf dem Bindungs- sowie Expressionsmuster des WTX. In dem Protein kommen ein Kernlokalisierungssignal, zwei *coiled-coil* Domänen, eine saure sowie eine prolinreiche Region vor. Eine weitere Region ist ein Sequenzmotiv, das aus der Wiederholung der Aminosäuren Arginin (R), Glutaminsäure (E) und Alanin (A) besteht. Über dieses Motiv kann sich WTX an eine bestimmte Region des β -Catenins binden (Tanneberger et al. 2011b).

Es gibt noch weitere Bindungsregionen: WTX hat zum einen drei verschiedene Sequenzen, die jeweils mit dem Protein APC interagieren (Grohmann et al. 2007). Es kontrolliert die Verteilung von APC zwischen den Mikrotubuli und der Zellmembran. Grohmann et al. (2007) postulierten, dass WTX damit einen Einfluss auf die Zellmigration und -adhäsion hat.

Zum anderen liegt eine weitere Bindungsregion am N-Terminus des WTX. Dort kann es mit zwei verschiedenen Stellen an Phosphatidylinositol(4,5)-Bisphosphat binden (Grohmann et al. 2007). Phosphatidylinositol(4,5)-Bisphosphat ist ein bekanntes

Phospholipid, das fast ausschließlich an der Zellmembran vorkommt. Grohmann et al. konnten zeigen, dass WTX über dieses Protein an die Zellmembran bindet.

Über mindestens eine weitere Bindungsregionen kann WTX einen Komplex mit Axin/Conductin bilden (Tanneberger et al. 2011b).

Alle diese Bindungsregionen stehen in Zusammenhang mit dem Wnt-Signalweg. WTX bildet dabei mit anderen Proteinen einen β -Catenin-Destruktionskomplex, wodurch es schließlich zum Abbau von β -Catenin kommt (Major et al. 2007). Aufgrund dieser Eigenschaft wird *WTX* als Tumorsuppressorgen bezeichnet.

Allerdings konnte nachgewiesen werden, dass WTX über die Phosphorylierung des Lipoproteinrezeptor-Proteins 6 den Wnt-Signalweg ebenso aktivieren kann (Tanneberger et al. 2011a). Dadurch wird β -Catenin nicht abgebaut, sondern stabilisiert und kann im Zellkern die Transkription seiner Zielgene anstoßen. Diese gegensätzlichen Rollen sind auch bei anderen Proteinen des Wnt-Signalwegs bekannt (Axin, Glykogensynthasekinase 3 β) und bedarf genaueren Untersuchungen. Dennoch bleibt *WTX* laut Regimbald-Dumas und He (2011) ein Tumorsuppressorgen, da sein Verlust zu einem Anstieg des vorliegenden β -Catenins führt und somit zur Tumorgenese beiträgt.

Von den bisher bekannten Bindungsregionen gibt es allerdings auch eine, die nicht mit dem Wnt-Signalweg in Zusammenhang steht, sondern mit WT1. Die Aminosäuren 786 bis 952 können sich an die Zinkfingerregion des WT1 binden (Rivera et al. 2009). Ebenfalls konnten Rivera et al. (2009) zeigen, dass WTX im Zellkern vorkommen kann und die Transkription von einem WT1-Zielgen beeinflusst. Dies ließ die Gruppe vermuten, dass WTX (ebenso wie WT1) auch auf der Ebene der Transkription eine wichtige Rolle in der Zelldifferenzierung spielt.

Weitere Funktionen des WTX sind ebenfalls ähnlich wie die des WT1: WTX inhibiert Zellwachstum und kann einen Zellarrest sowie einen programmierten Zelltod induzieren (Kim et al. 2010).

Auch die Expressionen von WTX und WT1 ähneln sich in der Niere sowohl zeitlich als auch örtlich (Rivera et al. 2007): postnatal ist die Expression beider Proteine im Mausmodel besonders hoch. Drei Wochen später ist die Expression wieder abgefallen und bleibt dann auf einem niedrigeren Level. Die beiden Proteine werden im metanephrischen Mesenchym und in glomerulären Vorläuferzellen exprimiert. Außerhalb der Niere findet sich während der Embryogenese eine starke WTX-Expression im zentralen Nervensystem, Muskeln, urogenitalen System und in den beiden Hauptbronchi der Lunge.

Im Vergleich der WTX-Expression bei neonatalen und adulten Mäusen sieht man einen deutlichen Unterschied: neonatal ist die WTX-Expression im Gehirn und in der Niere wesentlich höher (Rivera et al. 2007).

Die Wichtigkeit von WTX während der Embryogenese zeigen *WTX-knockout* Mäuse (Moisan et al. 2011): bei komplett *WTX*-deletierten Mäusen kam es zu Malformationen in verschiedenen mesenchymalen Geweben (Knochen, Niere, Herz, Fettgewebe, Milz). Sie waren nicht lebensfähig und starben innerhalb des ersten Lebensstages.

Aberrationen in *WTX* kommen in WT vor. Die Rate schwankt allerdings zwischen minimal 12% (12 von 102, Perotti et al. 2008) und maximal 29% (15 von 51, Rivera et al. 2007). Als Aberrationen kommen sowohl Deletionen als auch Punktmutationen vor. Es sind auch Keimbahnmutationen in *WTX* beschrieben worden, allerdings nicht in WT, sondern bei der Osteopathia striata mit kranialer Sklerose (*osteopathia striata with cranial sclerosis*, OPCS; Jenkins et al. 2008; Perdu et al. 2010). Dies ist eine Skeletterkrankung, die mit einer erhöhten Knochendichte und Hyperostosen einhergeht. Namensgebend sind die dabei vorkommenden longitudinalen, osteosklerotischen Streifungen der Knochen sowie die kraniale Sklerose.

OPCS ist eine X-chromosomal-dominant vererbte Erkrankung mit variabler Penetranz. Neben den beiden oben genannten Merkmalen (Streifung und Sklerose) weisen die betroffenen Mädchen häufig einen Makrozephalus, eine Gaumenspalte und eine milde Lernstörung auf. Jungen dagegen haben zusätzlich kardiale, intestinale und/oder urogenitale Anomalien, die mit einer hohen fetalen bzw. neonatalen Letalität assoziiert sind. WT sind bei betroffenen Personen bislang nicht nachgewiesen worden, allerdings wurde in einer Nierenbiopsie eines verstorbenen Jungen mit OPCS multiple Foki von PLNR gefunden (Fukuzawa et al. 2010).

Die Lage von *WTX* als Tumorsuppressorgen auf dem X-Chromosom macht aus Knudsons' *Two-Hit*-Modell ein *One-Hit*-Modell. Bei Jungen würde eine *WTX*-Mutation theoretisch immer einen WT zur Folge haben. Bei Mädchen gäbe es zur Hälfte die Chance, dass das inaktivierte X-Chromosom betroffen wäre und folglich kein WT entstehen würde.

Somit müsste es mehr Jungen als Mädchen mit WT bzw. *WTX*-Mutationen geben. Insgesamt sind aber bei den WT mehr Mädchen betroffen (s.o.) und auch bei den Analysen von *WTX*-Mutationen gab es zwischen den Geschlechtern keinen Unterschied (Rivera et al. 2007).

Aufgrund der variablen Anzahl von *WTX*-Mutationen bei WT (12-29%, s. o.), sowie der unklaren Geschlechterverteilung sollte in dieser Arbeit die Rate von *WTX*-Mutationen

in einem weiteren Patientenkollektiv untersucht werden. Hierzu mussten zunächst die Methoden zur Mutationsanalyse von *WTX* etabliert werden, was ein weiterer Bestandteil der Arbeit war.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Patientenkollektiv

Es lag DNA von insgesamt 48 Personen vor. Davon waren 15 weiblich und 33 männlich. Ausgenommen einer Person handelte sich um Patienten, bei denen ein histopathologisch gesicherter WT vorlag. Das mittlere Diagnosealter der WT-Patienten lag bei 41 Monaten.

Die Patienten bzw. deren Erziehungsberechtigten wurden über die Studie aufgeklärt und gaben schriftlich ihr Einverständnis. Die Studiennummer der Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf lautet 2167. Alle Patientendaten waren vor Beginn der vorliegenden Arbeit pseudonymisiert worden.

Als Proben lagen mehrheitlich Tumor-DNA vor. Lagen bei einzelnen Patienten auch Blutproben vor, wurde zusätzlich die daraus isolierte DNA untersucht. Des Weiteren wurde DNA aus Zelllinien, teilweise aus verschiedenen Passagen, und aus mikrodisektiertem Material analysiert. Bei der DNA aus Tumoren, Zelllinien und mikrodisektiertem Material konnte auf vorbereitete Proben des hiesigen Instituts zurückgegriffen werden.

Zunächst wurden nur Proben untersucht, bei denen bisher keine *WT1*- oder *CTNNB1*-Mutation nachgewiesen werden konnte, aber eine Aberration wahrscheinlich war. Dies resultierte aus der Erstpublikation von Rivera et al. (2007). Die Autoren nahmen an, dass *WTX*-Mutationen nicht zusammen mit Mutationen in *CTNNB1* und *WT1* auftreten. Als weitere Publikationen zeigten, dass Genmutationen in *WTX* und *WT1* bzw. *CTNNB1* sehr wohl zusammen auftreten können (Ruteshouser et al. 2008), wurde die Analyse dahingehend ausgeweitet.

2.1.2 Untersuchungsmaterialien

2.1.2.1 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Betain	Sigma-Aldrich
DMSO	Sigma-Aldrich
dNTP Mix	Invitrogen
Ethanol: absolut / 70%	Merck
FastStart Universal SYBR Green Master (Rox)	Roche
MgCl ₂	Invitrogen
<i>Taq</i> DNA Polymerase, rekombinant	Invitrogen
Wasser: steril, bidestilliert, PCR-grade	Braun

2.1.2.2 Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Zusammensetzung/Herstellung
AN-PCR-Puffer	100 mM Tris HCl PH 8,3; 500 mM KCl; 15 mM MgCl ₂ ; 0,1% Gelatine
DEPC-H ₂ O	0,2% DEPC auf 1l H ₂ O
EDTA (0,5 M)	186,1 g EDTA, 20 g NaOH; 800 ml H ₂ O; pH auf 8,0 einstellen; ad 1l H ₂ O
Ficoll Ladepuffer (5x)	25% Ficoll 70; 25 mM EDTA; 0,1% Bromphenolblau; ad 10 ml H ₂ O
Natriumacetat	408,24 g auf 1l H ₂ O
TAE (50x)	2M Tris Base; 5,71% Eisessig (v/v), 50mM EDTA
<i>Taq</i> DNA Polymerase PCR Puffer	200 mM TrisHCl (pH 8,4), 500 mM KCl (Invitrogen)
TBE (10x)	0,89 M Tris Base; 0,89 M Borsäure; 0,02 M EDTA

v/v = Volumenprozent.

Alle Puffer und Lösungen wurden mit sterilem oder destilliertem Wasser angesetzt.

2.1.2.3 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Küvetten	Eppendorf
MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate	Applied-Biosystems
MicroAmp Optical Adhesive Film	Applied-Biosystems
Pipettenspitzen, gestopft	Starlab
Pipettenspitzen, 20 µl	LI-COR Biosciences
Pipettenspitzen, verschiedene Größen	Eppendorf
Reaktionsgefäße, verschiedene Größen	Eppendorf

Weiteres Verbrauchsmaterial des alltäglichen Laborbedarfs.

2.1.2.4 Kits

Kit	Hersteller
BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems
QIAamp DNA Blood Midi Kit	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit (250)	Qiagen

2.1.2.5 Geräte

Gerät	Hersteller
ABI Prism 7900 HT	Applied Biosystems
Jouan IG 150	Labexchange
Mastercycler gradient	Eppendorf
Mini-V8.10 Blot Module	Gibco/Life Technologies
NanoDrop 1000 Spectrophotometer	Thermo Scientific
PTC-100 Programmable Thermal Controller	MJ Research, Inc.
PTC-200 Peltier Thermal Cycler	MJ Research, Inc.
RC 3B Refrigerated Centrifuge	Sorvall® Instruments
Reax top	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG
RH basic 2 IKAMAG ®	IKA®-Werke Staufen GmbH & Co.KG
Ultrospec 2000 Photometer	Pharmacia Biotech
Waage ISO 9001	Sartorius
Wasserbad JB Academy	Grant Instruments
WAVE nucleic acid fragment analysis system	Transgenomic, Inc.
Zentrifuge 5415D	Eppendorf
Zentrifuge RT7	Sorvall
Zentrifuge Z233MK	HERMLE Labortechnik

2.1.2.6 Software und Internettools

Software/Internettool	Hersteller/Quelle
Adobe Acrobat Reader	Adobe Systems Software Ireland Limited
Chromas lite V2.01	Technelysium Pty. Ltd.
Citavi 4	Swiss Academic Software GmbH
UCSC Genome Browser	http://genome.ucsc.edu/
Melting Temperature Calculation	http://insilico.ehu.es/tm.php
Microsoft® Office 2010	Microsoft Corporation
NanoDrop-1000 V3.71	Thermo Scientific
Paint	Microsoft Corporation
Primer3 (v. 0.4.0)	http://frodo.wi.mit.edu/primer3/
SDS 2.1, 2.2 und 2.3	Applied Biosystems
WAVEMAKER™ software version V4.1	Transgenomic, Inc.
WAVE Analysis Software D-7000 HSM	Transgenomic, Inc.

2.1.2.7 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma MWG Biotech bezogen.

Tabelle 3. WTX-Primer für PCR.

Primernamen	Primersequenz (5'-3')	Produktlänge (bp)
AF	CCAGACCCCACTGTGATGCTTCCTG	
AR	CAGCCACAGATGTCTTACATCTGGAGC	547
BF	CAGCTCCAAGAAAGGTCTCAGCAAG	
BR	CTGGATCTTTACAGGCCATTTTCTC	524
CF	GTCAGAGCCAGGCCTCATGAGCACG	
CR	CATCATCATCTGGCAAGGCCATCTC	538
DF	GGGATGTGACATCCCTGAAAAGCTTTG	
DR	CCTCACCTGAATCATCCTCAAATCC	516
EF	CAATATGAACCTGGGCTACCATCCCAC	
ER	CTGGCATGAGCTTCTCGGGCACGTG	516
FF	CCTCCATGGTCTGAAGCTCTGAGATG	
FR	CATAACGCTTCTCCAGAGGACGGAAG	535
GF	GAGTATCAGATGAGGCCCTTAGG	
GR	CACATCAGCGATGTCAAAGGTCACC	486
HF	GGAATGCCACTGTGAGTTTCTCACAGG	
HR	GTCCTCCTCATCTGAATCTTCCTGC	509
IF	GTGAGCAGCCTCCCTCGATACTTGG	
IR	ACGAGCTAGTTGAGGCCCAGATTC	471
JF	CCAACCAGTTGGACAGGCCTTCCAG	
JR	CTAGGTTTCCATTCATGGCAGTGGAG	471
KF	CTTCCAGTTCTGGAGGCTTCAGC	
KR	CCATAGATGGCAGAAGAGGCAAGTGG	403
KRa*	GCAGATGCACTTGAGTTGAACGTGG	428

A-K = Abschnitt in WTX. F = *forward*. R = *reverse*. a = *alternativ*. * = Hier wurde ein alternativer Primer zu KR erstellt und dieser zusammen mit KF verwendet.

Tabelle 4. WTX-Primer für qPCR.

Primernamen	Primersequenz (5'-3')	Produktlänge (bp)
WTX 5'-for	CATATGCCTGCCAATCAGGAC	
WTX 5'-rev	CAGTCACCTCCAGCACTGACTC	118
WTX 3'-for	AGCTGTACCACACTGTCCGTTC	
WTX 3'-rev	AGCTGTCTACCAGGTCCCACAC	111

for = forward. rev = reverse.

Tabelle 5. Primer der Referenzgene für qPCR.

Gen	Primernamen	Primersequenz (5'-3')	Produktlänge (bp)
FAH	FAH-for	GGTTGCTGATGGGATCTGTTG	
	FAH-rev	TTCTCCTTGTCCCTGAACATGAT	110
NDST1	NDST1-for	TCTGAGCTTTCCCTTCCCGTTA	
	NDST1-rev	GGAAGTGTCTGGCCCATCTTATA	107

for = forward. rev = reverse.

Tabelle 6. Primer auf dem X-Chromosom für qPCR.

Gen	Primernamen	Primersequenz (5'-3')	Produktlänge (bp)
PHEX	PHEX-for	TCTTCTTCTCTCACCAGGCTTACAG	
	PHEX-rev	AAGAAGAGCTGGTTGTTGGTGAA	106
OCRL	OCRL-for	GACTTCTTTGGTAGGAGGACCTGTTC	
	OCRL-rev	CGCAAAGGATACGGATTGTCTC	111

for = forward. rev = reverse.

2.1.2.8 Agarosegel

2%iges Agarosegel, verschiedene Größen, selbsthergestellt:

- Klein: 50 ml TBE/TAE, 1,0 g Agarose, 5 µl Ethidiumbromid
- Mittel: 80 ml TBE/TAE, 1,6 g Agarose, 8 µl Ethidiumbromid
- Groß: 120 ml TBE/TAE, 2,4 g Agarose, 12 µl Ethidiumbromid

2.1.2.9 Marker

DNA-Marker

TrackIt 1Kb DNA-Leiter (Invitrogen):

12216/11198/10180/9162/8144/7125/6108/5000/4072/3054/2036/1636/1018/517/50
6/395/344/298/220/201/154/134/75 bp

O'Gene Ruler™ 1Kb Plus DNA-Leiter (Fermentas):

20000/10000/7000/5000/4000/3000/2000/1500/1000/700/500/400/300/200/75 bp

100 bp DNA-Leiter (Invitrogen):

2072/1500/1400/1300/1200/1100/1000/900/800/700/600/500/400/300/200/100 bp

2.2 Methoden

2.2.1 DNA-Isolation

Um die DNA der Patienten auf Keimbahnmutationen untersuchen zu können, musste sie zuerst aus dem Blut isoliert werden. Es wurde das 'QIAamp DNA Blood Midi Kit' von Qiagen verwendet, wobei EDTA-Vollblut als Grundlage zur DNA-Isolation diente. Die DNA-Isolation erfolgte in vier Schritten: Zelllyse und Proteinverdau, Bindung der DNA an eine Säule, Waschung und abschließend Elution.

Zur Zelllyse und zum Proteinverdau wurden im ersten Schritt 2 ml EDTA-Blut bei Raumtemperatur in ein Falcon-Röhrchen pipettiert. Es wurden 200 µl Protease zugegeben und gemischt. Nach Zugabe von 2,4 ml AL-Lysepuffer wurde die Probe im Vortexmischer gründlich durchgemischt und zehn Minuten in einem Wasserbad bei 70 °C inkubiert. Somit waren die Zellmembranen aufgelöst und die Proteine denaturiert. Der zweite Schritt bestand aus der Bindung der DNA an eine Säule. Zu diesem Zweck wurden 2 ml absoluter Ethanol beigefügt und die Probe wurde wieder im Vortexer gemischt. Die Hälfte der Lösung (3,3 ml) wurde vorsichtig auf eine Säule gegeben. Das Röhrchen mit der Säule wurde verschlossen und drei Minuten bei 12.000 *rounds per minute* (rpm) zentrifugiert. Dieses erste entstandene Eluat wurde verworfen und nachdem die zweite Hälfte zentrifugiert worden war, wurde auch das zweite Eluat verworfen. Die DNA war nun an die Säule gebunden. Im dritten Schritt der DNA-Isolation wurde die Probe mit zwei Waschpuffern gewaschen. Der erste Waschpuffer war AW1-Puffer. Davon wurden 2 ml zugegeben und die Probe wurde eine Minute bei 3500 rpm zentrifugiert. Der zweite Waschpuffer war AW2-Puffer. Auch hier wurden 2 ml zugegeben und 15 Minuten bei 3500 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde die Säule auf ein neues, steriles Falcon-Röhrchen gesetzt. Nun folgte der letzte Schritt der DNA-Isolation, die Elution: 200 µl AE-Elutionspuffer wurden hinzugefügt und das Röhrchen wurde verschlossen. Es folgte eine Inkubation für fünf Minuten bei Raumtemperatur und eine Zentrifugation für ebenfalls fünf Minuten bei 4000 rpm. Das Eluat wurde noch einmal auf die Säule gegeben, wieder fünf Minuten inkubiert und zentrifugiert. Die DNA-Isolation war hiermit abgeschlossen und die DNA-Konzentration konnte auf dem NanoDrop bestimmt werden (s. 2.2.2). Die DNA-Proben konnten bei 4 °C oder -20 °C gelagert werden.

2.2.2 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration der DNA wurde mit Hilfe des NanoDrop 1000 Spektrophotometers bestimmt. Bei dieser Methode wird die optische Dichte mittels Absorptionsspektrometrie gemessen.

Die erste Messung erfolgte mit dem gleichen Lösungspuffer, mit dem die DNA eluiert war. Hierzu wurden 1,5 µl des Puffers auf den Messarm pipettiert und die Absorption bei 260 nm gemessen. Der ermittelte Wert wurde als Referenzwert festgelegt.

In der zweiten Messung wurde nun in gleicher Weise die Probe analysiert. Die DNA-Konzentration wurde mit Hilfe der Software NanoDrop-1000 V3.71 ermittelt, wobei die Berechnung auf dem Lambert-Beerschen Gesetz aufbaut. Um etwas über die Reinheit des Produktes aussagen zu können, wurde aus weiteren gemessenen Absorptionsspektren, die zwischen 230 und 280 nm lagen, eine Ratio ermittelt. Der Wert sollte bei der Bestimmung der DNA-Konzentration bei der Ratio 260/280 bei ungefähr 1,8 und bei der Ratio 260/230 zwischen 1,8 und 2,2 liegen.

2.2.3 Polymerase-Kettenreaktion

2.2.3.1 Grundlagen der Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) ist eine Methode zur Vervielfältigung bestimmter Genabschnitte, die jeweils durch spezifische flankierende Oligonukleotide (Primer) bestimmt werden.

Jede PCR basiert auf den folgenden drei Schritten: der Denaturierung, dem *Annealing* und der Elongation. Im ersten Schritt, der Denaturierung, wird die DNA auf 95°C erhitzt. Dadurch liegt sie anschließend einzelsträngig, also denaturiert, vor. Im zweiten Schritt, dem *Annealing*, können sich bei etwas geringerer Temperatur die komplementären Primer an die einzelsträngige DNA anlagern. Dieser Vorgang wird auch Hybridisierung genannt. Im dritten Schritt findet die Elongation statt. Eine wichtige Rolle spielt die thermostabile *Taq*-Polymerase. Sie ist eine DNA-Polymerase, die aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* (*Taq*) isoliert wurde. Am 3'-Ende des Primers lagert sie bei ca. 72°C die im Reaktionsgefäß vorhandenen Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP) an. So entsteht das gewünschte Produkt, das sogenannte Amplikon. Diese drei Schritte werden ca. 30-mal wiederholt. Es kommt zu einer exponentiellen Amplifikation, so dass nach Abschluss der PCR Millionen DNA-Kopien vorliegen.

Je nach Primer und gewünschtem Produkt müssen die einzelnen Schritte der PCR angepasst werden. Dies wird im Folgenden unter 2.2.3.2 beschrieben.

2.2.3.2 Etablierung der Primer zur Amplifikation von *WTX*

In dieser Arbeit sollte das Gen *WTX* analysiert werden. *WTX* besteht aus einem einzigen translatierenden Exon, das für 1135 Aminosäuren codiert. In der Erstpublikation über *WTX* verwendete Rivera et al. (2007) zwölf verschiedene Primerpaare (*WTX* A-K). Diese Primerpaare unterteilen das Gen in zwölf Abschnitte, die zwischen 400 und 550 Basenpaare (bp) groß sind. Die gleichen Primer wurden in dieser Arbeit benutzt. Um die Abläufe zu optimieren und zu beschleunigen, wurden im Verlauf der Arbeit jeweils zwei benachbarte Primer zusammengefasst. Somit entstanden Amplikons mit einer Größe von 650 bis 880 bp. Vorab mussten die PCR-Bedingungen für jedes Primerpaar, wie im Weiteren beschrieben, aufwendig etabliert werden.

Nach einer ersten Näherung der Annealingtemperatur durch Internettools (<http://insilico.ehu.es/tm.php>, Bikandi et al. 2004) wurde zur weiteren Spezifizierung die PCR auf einem Gradientencycler durchgeführt. Hier gab es zwölf verschiedene Positionen mit unterschiedlichen Temperaturen (Tabelle 7).

Tabelle 7. Temperaturen des Gradientencyclers (Eppendorf) an den Positionen 1-12.

Position	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Temp (°C)	55	55,3	56,5	58,3	60,6	63,2	65,9	68,5	71	73,1	74,6	75,4

Temp = Temperatur.

Der Mastermix für die PCR im Gradientencycler enthielt die in Tabelle 8 aufgeführten Komponenten.

Tabelle 8. Mastermix.

Komponente	Ausgangsmenge	Volumen (µl)	Endmenge
dH ₂ O	-	33,5	-
Tris HCl (pH 8,4)*	200 mM	5	20 mM
KCl *	500 mM		50 mM
MgCl ₂	15 mM		1,5 mM
dNTP	10 mM	1	0,2 mM
<i>Forward</i> Primer	50 µM	2,5	2,5 µM
<i>Reverse</i> Primer	50 µM	2,5	2,5 µM
<i>Taq</i> -Polymerase	5 U	0,5	2,5 U
Kontroll-DNA	20 ng	5	100 ng
Endvolumen		50	

Mastermix mit Mengenangaben der einzelnen Komponenten und dadurch entstehenden Endkonzentrationen. * = Tris HCl und KCl sind im PCR-Puffer (Invitrogen) enthalten und wurden nicht extra hinzugefügt. dH₂O = destilliertes Wasser.

Vom Mastermix wurden jeweils 45 µl in ein 0,2 ml Reaktionsgefäß gefüllt. Als letztes wurden 5 µl der Patienten-DNA hinzugefügt. In ein Reaktionsgefäß wurde anstatt der DNA Wasser hinzugefügt, die sogenannte Wasserprobe. Sie diente der Kontrolle, um eventuelle Kontaminationen der einzelnen Komponenten zu identifizieren und wurde bei jeder PCR mitgeführt. Die Patienten-DNA wurde normalerweise mit einer Endkonzentration von 100 ng eingesetzt. Der gesamte Mastermix wurde auf Eis pipettiert, um einen vorzeitigen Reaktionsbeginn zu verhindern.

Als PCR-Programm wurde ein Basisprogramm im Gradientencycler erstellt (Tabelle 9).

Tabelle 9. PCR-Programm „WTX“.

PCR Schritt	Zyklus	Temp (°C)	Zeit (min)
Vorabdenaturierung	1	94	5
Denaturierung	35	94	1
<i>Annealing</i>	35	Gradient 1-12	0,5
Elongation	35	72	1
Elongation	1	72	10
Kühlen	1	4	∞

∞ = unendlich.

Die Schritte Denaturierung, *Annealing* und Elongation wurden in der Reihenfolge 35 Mal wiederholt. Zuletzt erfolgte eine längere Elongation für zehn Minuten und zum Abschluss wurde die Probe bis zur Entfernung aus dem Cycler gekühlt.

Zur Analyse der Ergebnisse wurden 5 µl der Probe mit 5 µl destilliertem Wasser und 2,5 µl Ficoll-Ladepuffer (ein Saccharose-Epichlorhydrin-Copolymer) auf einem 2%igem Agarosegel aufgetragen. Durch Elektrophorese wurden die Produkte der Länge nach aufgetrennt. Um die Größe der Amplikons zu überprüfen, wurde eine 1Kb DNA-Leiter als Referenz herangezogen. Die Temperatur der Position, bei der es die größte DNA-Menge und keine Nebenprodukte gab, wurde schließlich als *Annealing*-Temperatur für die PCR-Analyse der Proben verwendet (Beispiel *WTX*-Fragment I, Abb. 2).

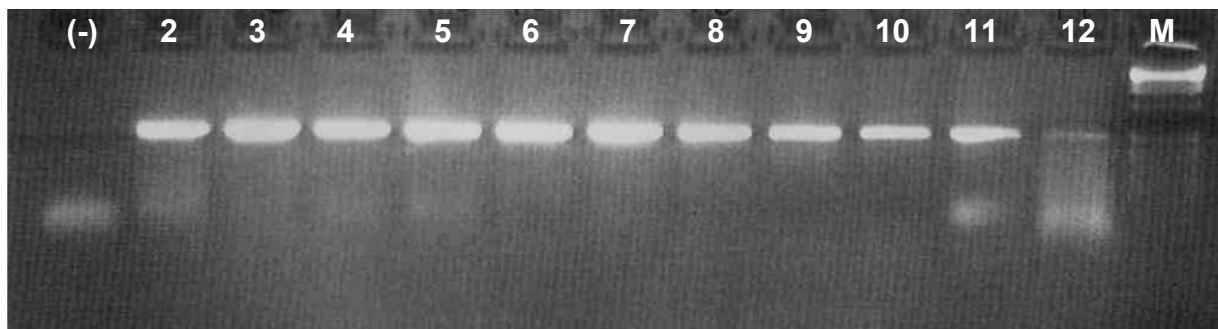


Abb. 2: PCR-Ergebnis von Fragment I. Gelelektrophorese-Bild. PCR auf Gradientencycler. (-) = Wasserprobe. 2-12 = Position im Gradientencycler (Tabelle 7). M = Marker (1 Kb DNA-Leiter).

In dem Beispiel von *WTX*-Fragment I wurden die PCR-Produkte an Position 3 und 6 zur Wiederholung der Analyse ausgesucht, da hier die größte Menge des Produkts und keine Primerdimere vorlagen. Primerdimere nennt man die Hybridisierung von *reverse* und *forward* Primer. Wenn sich Primerdimere ausbilden, kann keine Elongation stattfinden und das gewünschte Amplikon wird nicht oder nur vermindert gebildet. Primerdimere gab es an den Positionen 2, 4, 5, 11 und 12.

Bei besonders schwer zu amplifizierenden Produkten oder bei Amplikons, bei denen die Menge des Produktes für weitere Analysen nicht ausreichte, mussten weitere Bedingungen verändert werden. Es wurden z.B. Änderungen in den Pufferzusammensetzungen vorgenommen: eine Erhöhung der $MgCl_2$ -Konzentration bis 50 mM, die Verwendung von AN-Puffer, der Zusatz von Betain oder DMSO, um die Spezifität zu steigern.

Die Amplifikation des Fragments K erwies sich als besonders schwierig. Weder Änderungen in den Pufferzusammensetzungen noch in den Konzentrationen der

Primer oder der DNA ergaben ein ausreichendes Produkt. Auch Temperaturänderungen führten nicht zu dem gewünschten Ergebnis, so dass neue *forward* und *reverse* Primer designt wurden. Hierbei war das Internettool „Primer3“ (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>, Untergasser et al. 2012) hilfreich. Es wurde darauf geachtet, dass sich zum einen keine internen *hairpins* im Primer selbst und zum anderen keine Primerdimere zwischen den beiden Primern ausbilden konnten. *Hairpins* entstehen, wenn die Basen innerhalb eines Primers zueinander komplementär sind und hybridisieren. Es wurden Primer von einer Länge von ca. 20 Basenpaaren (bp) gewählt mit einem möglichst geringen Guanin (G)- und Cytosin (C)-Gehalt. Die theoretisch errechneten *Annealing*-Temperaturen lagen im Bereich von 50 bis 60 °C.

2.2.3.3 *Touchdown* (TD)-PCR

Da das gewünschte PCR-Produkt nicht bei allen Primerpaaren ausreichend war bzw. weil es Primerdimere oder Artefakte gab, wurde eine *Touchdown* (TD)-PCR durchgeführt. Bei dieser Methode wird die *Annealing*-Temperatur schrittweise verringert. Am Beispiel von WTX-Fragment I lässt sich diese Variante der normalen PCR erklären: Die größten Produkte auf dem Gradientencycler ohne Vorliegen von Primerdimeren fanden sich an den Positionen 3 und 6 (Abb. 2). Position 3 entsprach einer *Annealing*-Temperatur von 56,5 °C und Position 6 63,2 °C. Um eine größere Menge des PCR-Produkts bei diesen Temperaturen zu erreichen, wurde das Programm auf TD 60-57 umgestellt (Tabelle 10). Es wurden eher die niedrigeren Temperaturen gewählt, da sich die Produktmenge bei den höheren Temperaturen verringerte (Position 8-12, Abb. 2).

Tabelle 10. PCR-Programm: TD 60-57.

PCR Schritt	Zyklus	Temp (°C)	Zeit (min)
Vorabdenaturierung	1	95	5
Denaturierung	6	95	0,5
<i>Annealing</i>	6	60	0,5
Elongation	6	72	2
Denaturierung	6	95	0,5
<i>Annealing</i>	6	59	0,5
Elongation	6	72	2
Denaturierung	6	95	0,5
<i>Annealing</i>	6	58	0,5
Elongation	6	72	2
Denaturierung	19	95	0,5
<i>Annealing</i>	19	57	0,5
Elongation	19	72	2
Elongation	1	72	8
Kühlen	1	4	∞

Fettgedruckte Zahlen = geänderte *Annealing*-Temperaturen. ∞ = unendlich.

Wie der Tabelle 10 zu entnehmen ist, wurde bei der TD-PCR nach der Vorabdenaturierung die *Annealing*-Temperatur schrittweise verringert: Die *Annealing*-Temperatur startete bei der TD 60-57 bei 60 °C und durchlief sechs Zyklen. Jeder Zyklus bestand dabei aus den Schritten Denaturierung, *Annealing* und Elongation. Nach Verringerung der *Annealing*-Temperatur um ein Grad auf 59 °C folgten weitere sechs Zyklen. Dann wurden bei 58 °C ebenfalls sechs Zyklen ausgeführt. Das *Annealing* endete bei 57 °C nach 19 Zyklen. Die Elongation und die Kühlung schlossen wie gewöhnlich die PCR ab. Das Ergebnis für die TD 60-57 des WTX-Fragments I ist in Abb. 3 dargestellt.

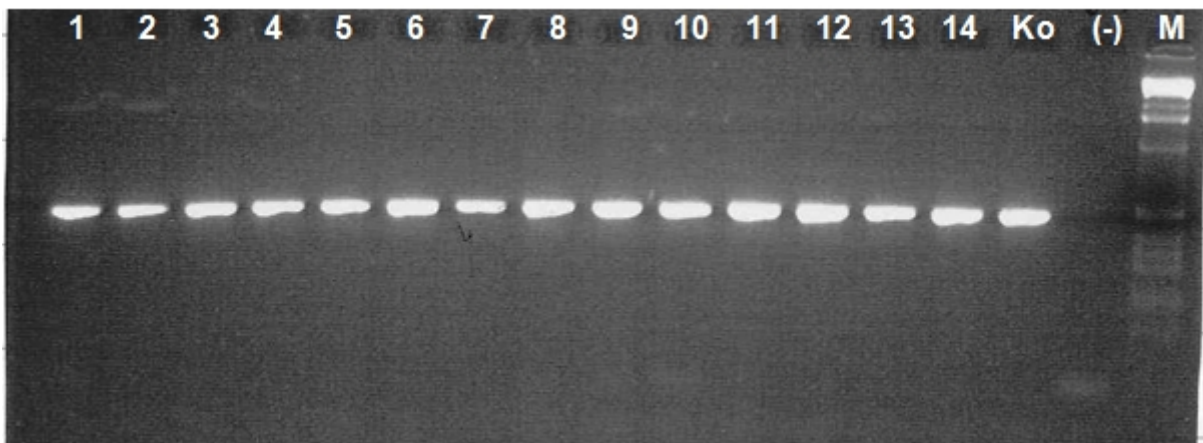


Abb. 3: Touchdown-PCR-Ergebnis von WTX-Fragment I. Gelelektrophorese-Bild. PCR-Programm: TD 60-57. 1-14 = Patienten-DNA. Ko = Kontroll-DNA. (-) = Wasserprobe. M = Marker (1 Kb DNA-Leiter).

Analog dazu fing die *Annealing*-Temperatur z.B. bei der TD 64-61 bei 64°C an, wurde für jeweils 6 Zyklen um 1 °C verringert, bis bei 61°C die restlichen 19 Zyklen stattfanden.

2.2.3.4 Quantitative *real-time* PCR (qPCR)

2.2.3.4.1 Grundlagen der qPCR

Die quantitative *real-time* PCR (qrt-PCR oder auch, wie hier im Folgenden, qPCR genannt) ist eine weitere Variante der PCR. Das Besondere der qPCR ist, dass eine quantitative Bestimmung des Amplikons vorgenommen wird. Die Quantifizierung geschieht durch eine Fluoreszenz-Messung, die während eines PCR-Zyklus erfasst wird. In dieser Arbeit wurde FastStart Universal SYBR Green Master (ROX) von Roche verwendet. SYBR-Green ist ein Cyanin-Farbstoff, der in doppelsträngige DNA interkaliert, sich also dort einlagert. Durch die Interkalierung entsteht das Fluoreszenzsignal. Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge des PCR-Produktes zu. Die Messung dieser Fluoreszenz erfolgte in der exponentiellen Phase, da hier die optimalen Reaktionsbedingungen vorlagen. Hätte die Messung in der ersten Phase der Amplifikation stattgefunden, wäre die vorhandene DNA-Menge (das *template*) noch zu begrenzt gewesen. Somit hätte eine schlechtere Zusammensetzung der einzelnen Komponenten vorgelegen. Ebenso ungünstig wäre die Messung in der dritten und letzten Phase gewesen, da es hier schon zu einer dramatischen Steigerung der Produktmenge gekommen wäre, welche zu einer Hemmung der Synthese geführt hätte.

Der gemessene Wert lag demnach am Anfang der exponentiellen Phase, wo sich die Fluoreszenz erstmals signifikant über die Hintergrundfluoreszenz legte. Dieser Wert wird als *cycle threshold* (Ct) bezeichnet. Als passive interne Referenz wirkte der Farbstoff ROX zur Signalnormalisierung. So wurden zufällige Intensitätsänderungen in der Fluoreszenz ausgeglichen.

Das Ziel dieses Experimentes war, wie oben dargestellt, zu analysieren, ob *WTX* in den Patientenproben deletiert war. Um nicht nur vollständige Deletionen des Gens, sondern auch partielle erfassen zu können, ergaben sich zwei Primerpaare. Das eine lag am 5'- und das andere am 3'-Ende des *WTX* (*WTX* 3' und *WTX* 5', Rivera et al. 2007). Weitere Primerpaare waren *FAH* und *NDST1* (Ruteshouser et al. 2008), die als Referenzgene für die Berechnung fungierten (s.u.). Um sicherzustellen, dass nur DNA amplifiziert wurde, lagen alle Primer in einer Intron-Exon-Region.

Vor der Analyse der Patienten-DNA war eine Primeroptimierung notwendig, um herauszufinden, bei welchen Konzentrationen der geringste Ct-Wert ohne unspezifische Amplifikationen vorlag.

Dazu wurde das jeweilige Primerpaar in neun unterschiedlichen Konzentrationen zueinander eingesetzt (Tabelle 11).

Tabelle 11. Primeroptimierung: Konzentrationen der Primer im 20 µl PCR-Ansatz.

Endkonzentrationen			
reverse Primer (10 µM)	forward Primer (10 µM)		
	50 nM	300 nM	900 nM
50 nM	A 0,1 µl/0,1 µl	B 0,6 µl/0,1 µl	C 1,8 µl/0,1 µl
300 nM	D 0,1 µl/0,6 µl	E 0,6 µl/0,6 µl	F 1,8 µl/0,6 µl
900 nM	G 0,1 µl/1,8 µl	H 0,6 µl/1,8 µl	I 1,8 µl/1,8 µl

20 µl PCR-Ansatz. A-I = Primermengen in unterschiedlichen Verhältnissen zueinander. Ausgangsmenge der Primer je 10 µM. Erste Zahl = eingesetztes Volumen des *forward* Primers; zweite Zahl = eingesetztes Volumen des *reverse* Primers.

Wie in Tabelle 12 aufgelistet wurde der Mastermix zusammengesetzt.

Tabelle 12. Primeroptimierung: Mastermix mit Mengenangaben der Komponenten.

Komponenten (µl)	A	B	C	D	E	F	G	H	I
2x SYBR Mix	35	35	35	35	70	35	35	35	35
<i>forward</i> Primer	0,35	2,1	6,3	0,35	4,2	6,3	0,35	2,1	6,3
<i>reverse</i> Primer	0,35	0,35	0,35	2,1	4,2	2,1	6,3	6,3	6,3
DNA (2ng/µl)	17,5	17,5	17,5	17,5	H ₂ O/DNA*	17,5	17,5	17,5	17,5
Wasser	16,8	15,05	10,85	15,05	26,6	9,1	10,85	9,1	4,9
Gesamt	70	70	70	70	105:2+17,5*	70	70	70	70

Als Mastermix wurde die 3,5fache Menge angesetzt, bei Konzentration E die siebenfache Menge. 20 µl pro Reaktionsgefäß. Primer-Konzentration: 10 µM. A-I = Primermengen in unterschiedlichen Verhältnissen zueinander (Tabelle 11). * = Bei Konzentration E wurden entweder 17,5 µl Wasser oder DNA pro Reaktionsgefäß eingesetzt.

Es wurden immer Triplets angesetzt, aus denen bei der Analyse ein Mittelwert gebildet wurde. Dies war nötig, um Pipettier- und Messungenauigkeiten auszugleichen. Deshalb wurde pro Konzentration A-I die 3,5fache Menge des Mastermixes angesetzt. Eine Ausnahme war Konzentration E: Hier wurde die siebenfache Menge für zwei Triplets angesetzt. Zu dem einen Triplet wurde wie gewohnt die DNA hinzu pipettiert, zur anderen kam dagegen Wasser hinzu. Diese Wasserprobe diente, wie bei der gewöhnlichen PCR, der Kontrolle. Das Wasser bei der qPCR war PCR-*grade*. Das bedeutet, dass es frei von Nukleasen, DNA-/Nukleinsäure-Kontamination und Proteasen sowie autoklaviert und membrangefiltert war.

Je 20 µl der Ansätze wurden in ein Reaktionsgefäß einer 96-*well*-Platte pipettiert und zum Schluss mit einer optischen Folie verschlossen. Die Proben wurden in das Gerät ABI Prism 7900HT installiert und über das Programm SDS 2.1 die Software gestartet. Nach Einstellung der gewünschten Parameter konnte mit dem qPCR-Programm begonnen werden (Tabelle 13).

Tabelle 13. qPCR-Programm.

	Zeit (min)	Temp (°C)	Rampe (%)
Startdenaturierung	10	95	100
Denaturierung	0,25	95	100
<i>Annealing</i> / Elongation	1	60	100

Die Denaturierung und das *Annealing* bzw. die Elongation durchliefen 40 Zyklen.

Im Anschluss an das qPCR-Programm erfolgte die Erstellung einer Schmelzkurve (Tabelle 14).

Tabelle 14. Bedingungen zur Erstellung der Schmelzkurve.

	Zeit (s)	Temp (°C)	Rampe (%)
Aufschmelzen	15	95	100
Rehybridisieren	15	60	100
Aufschmelzen	15	95	2

Bei der langsamen Erhöhung der Temperatur auf 95 °C wurde die DNA denaturiert und der zuvor interkalierte Farbstoff wieder freigesetzt. Durch diese Änderung der Fluoreszenz konnte eine Schmelzkurve erstellt werden. Die Schmelzkurven aller Amplikons wurden zuletzt miteinander verglichen. Hier war die Höhe, Lage und die Anzahl der Peaks wichtig.

2.2.3.4.2 Berechnung der Ergebnisse: relative Quantifizierung

Zur Berechnung der Ergebnisse wurde die relative Quantifizierung herangezogen. Sie steht im Gegensatz zur absoluten Quantifizierung. Bei der absoluten Quantifizierung wird allein der absolute Wert des entstandenen Produkts ermittelt. Bei der relativen Quantifizierung dagegen wird der Wert des zu analysierenden Gens auf einen Referenzwert bezogen. Dieses Verfahren dient der Normalisierung der DNA-Menge. Für diesen Referenzwert ist ein Gen notwendig, das möglichst konstant vorliegt. In WT weisen die Chromosomen 5 und 15 am wenigsten Aberrationen auf (s. 4.1). Deshalb wurde bei der *WTX*-Deletionssuche *FAH* (lokalisiert auf 5q33.1) und *NDST1* (lokalisiert auf 15q25.1) als Referenzgene verwendet.

Die Ergebnisse wurden in drei Schritten mit der $\Delta\Delta C_t$ -Methode berechnet. Als Erstes erfolgte die Subtraktion des C_t -Werts des Testgens von dem des Referenzgens (dies entspricht ΔC_t). Als Zweites wurde der ΔC_t -Wert der potentiellen Mutante vom Wildtyp subtrahiert, wodurch man zum $\Delta\Delta C_t$ -Wert gelangt. Hiervon wurde dann als Drittes die Ratio gebildet. Der endgültige Wert war $2^{-\Delta\Delta C_t}$, s. nachfolgende Formel:

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = \frac{2^{(Ct \text{ Wildtyp Testgen} - Ct \text{ Mutante Testgen})}}{2^{(Ct \text{ Wildtyp Referenzgen} - Ct \text{ Mutante Referenzgen})}}$$

$$= 2^{(Ct \text{ Wildtyp Testgen} - Ct \text{ Mutante Testgen} - Ct \text{ Wildtyp Referenzgen} + Ct \text{ Mutante Referenzgen})}$$

Zur besseren Veranschaulichung wurde aus dieser Berechnung der *Fold Change* (FC)-Wert errechnet. Der FC-Wert gibt die quantitative Änderung im Vergleich zum Initialwert an. Er wurde aus dem Kehrwert von $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ermittelt. Lag die Zahl dabei unter eins, war der Wert negativ.

Die nachfolgende Abb. 4 zeigt das Ergebnis einer qPCR. In dem Amplifikationsplot ist die relative Fluoreszenz in Abhängigkeit zur Zykluszahl aufgetragen. In diesem Beispiel wurde das 3'-Ende des Testgens *WTX* betrachtet (Primer: *WTX* 3'). Als Referenzgen wirkte *FAH*. Die Patientenprobe PEB war die potentielle Mutante und die Kontroll-DNA der Wildtyp. Bis zum ca. zwanzigsten Zyklus konnte sich die Fluoreszenz von SYBR Green nicht signifikant über die Hintergrundfluoreszenz abheben. Es fand zwar eine Amplifikation statt, diese war jedoch zur Detektion zu gering. Ab dem 20. Zyklus stieg die relative Fluoreszenz steil an. Diese Phase war die exponentielle Amplifikation. Im Anschluss daran kam es zu einem Plateau. Hier kam es durch die große Produktmenge zur Hemmung der Synthese. Der Ct-Wert, der für die Berechnung der Ergebnisse wichtig ist, lag in der exponentiellen Phase. Die Werte für das Referenzgen betrugen bei PEB (Mutante) 23,68 und bei der Kontroll-DNA (Wildtyp) 23,63. Für das Testgen lagen die Werte für PEB bei 27,48 und für die Kontroll-DNA bei 24,73. Die relative Fluoreszenz von PEB beim Testgen stieg erst bei einer höheren Zykluszahl als bei der Kontroll-DNA an. Die Amplifikation von PEB fand also später statt. Dies ging auch aus der Berechnung hervor: der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Wert lag bei 0,15. Dies bedeutet, dass die Kopie von *WTX* 3' der Probe PEB in Bezug auf *FAH* und der Kontroll-DNA nur 0,15fach vorlag. Der errechnete FC-Wert betrug -6,67. Die Kopienzahl von PEB im Vergleich zur Kontroll-DNA und *FAH* war um das ca. Sechsfache erniedrigt (Abb. 4).

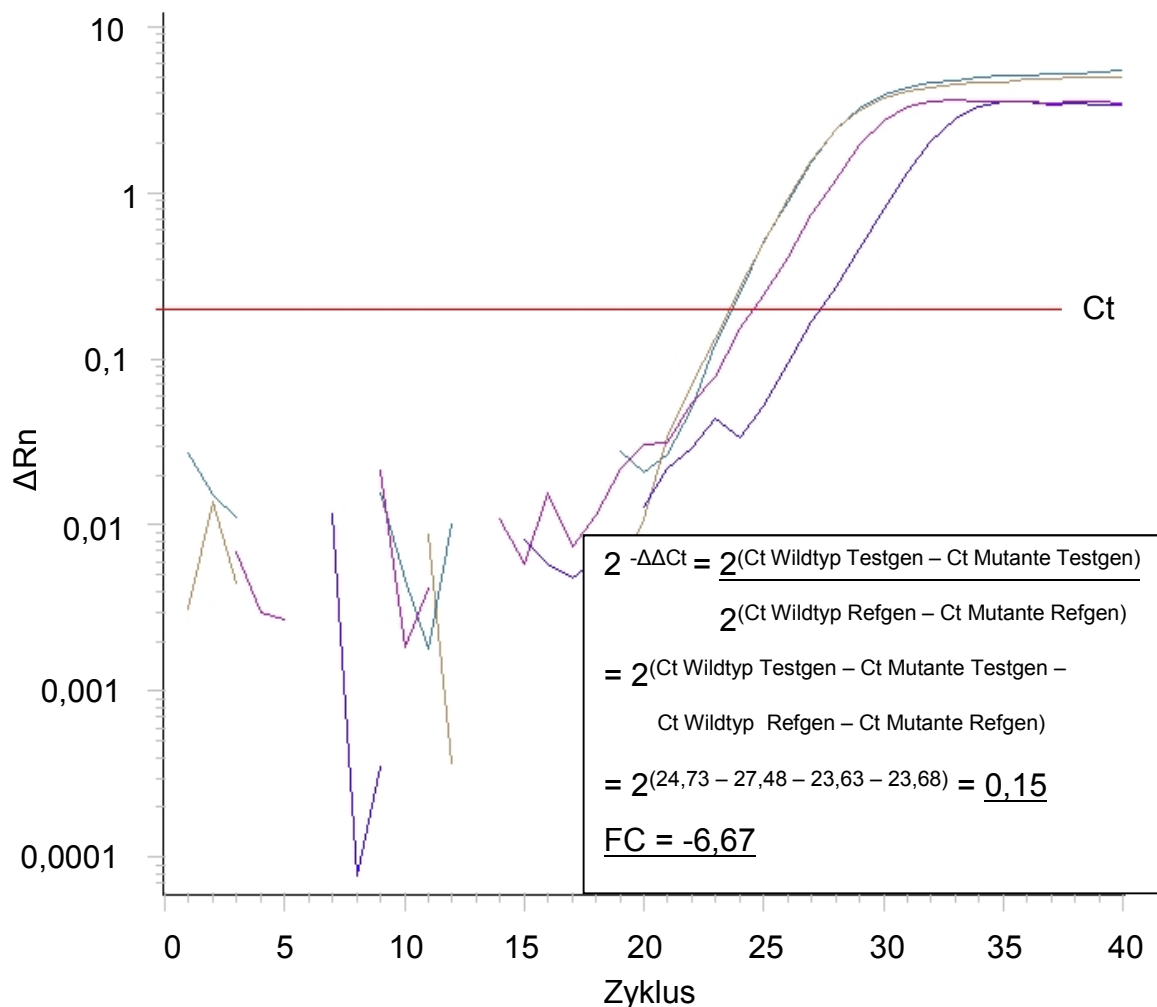


Abb. 4: Amplifikationsplot: Beispiel zur Berechnung der $\Delta\Delta Ct$ -Methode. qPCR-Ergebnis. Relative Fluoreszenz in Abhängigkeit zur Zyklusanzahl. Testgen = *WTX* 3'. Refgen = Referenzgen (in diesem Beispiel *FAH*). Mutante = PEB. Wildtyp = Kontroll-DNA. ΔRn = relative Fluoreszenz pro n'ter Zyklus. Ct = cycle threshold. FC = Fold Change. - = *WTX* 3' Kontroll-DNA. - = *WTX* 3' PEB. - = *FAH* PEB. - = *FAH* Kontroll-DNA.

Bei der Detektion einer Deletion (wie im oben beschriebenen Beispiel) wurde eine weitere qPCR durchgeführt. Ziel war es, die Größe der Deletion einschätzen zu können. Es wurden Gene auf dem langen und kurzen Arm des X-Chromosoms ausgewählt: *OCRL* (Lokalisation: Xq25) und *PHEX* (Lokalisation: Xp22.11) (nach Ruteshouser et al. 2008). Nach einer wie oben beschriebenen Primeroptimierung wurden diese Primer anstatt der *WTX*-Primer in gleicher Weise eingesetzt.

2.2.4 *denaturing high-performance liquid chromatography* (DHPLC)

2.2.4.1 Grundlagen der DHPLC

Die DHPLC (*denaturing high-performance liquid chromatography*) ist eine Methode zur Mutationsanalyse. Die Analyse basiert auf der Unterscheidung zwischen Homo- und Heteroduplices.

Bei der Analyse von *WTX* gab es für die DHPLC eine Besonderheit. Wie bereits erwähnt (s. 1.9.3) liegt *WTX* auf dem X-Chromosom. Somit enthalten männliche Proben mit dem Karyotyp XY nur eine Kopie des *WTX*, weibliche mit dem Karyotyp XX dagegen zwei. Aus diesem Grund mussten männliche und weibliche Proben unterschiedlich in die DHPLC eingesetzt werden.

Bei den männlichen Proben war im ersten Schritt die separate *WTX*-Amplifikation einer Patientenprobe und einer Kontroll-DNA erforderlich. Bei der Kontroll-DNA wurde davon ausgegangen, dass keine Mutation vorlag, sondern ein sogenannter Wildtyp. Die zu analysierende Patientenprobe dagegen konnte eine Mutation enthalten. Sie war also eine potentielle Mutante.

Die beiden Proben (männliche Probe und Kontroll-DNA) wurden im gleichen Verhältnis zueinander vermischt und erhitzt, so dass sie denaturierten. Bei einer langsamen Abkühlung lagerten sich die verschiedenen DNA-Stränge der potentiellen Mutante und des Wildtyps wieder aneinander an. Lag tatsächlich eine Mutation vor, konnten hierbei zwei verschiedene Formen entstehen:

Die eine Form entstand bei einem *Mismatch*. Dabei lagerte sich der Strang einer Kontroll-DNA an den einer Mutante, beispielsweise mit einer Punktmutation, an. Die Mutation bewirkte, dass die Basen nicht komplementär zueinander waren (z.B. A und G oder T und C). Deshalb konnten sich keine Wasserstoffbrücken ausbilden. Diese Form wird Heteroduplex genannt.

Die zweite Form bildete sich bei einem passenden Match aus. Bei DNA-Strängen, die in der Sequenz übereinstimmten, konnten sich wie gewöhnlich die Wasserstoffbrücken ausbilden. Diese Form heißt Homoduplex.

Aufgrund der Mischung der beiden Formen, Hetero- und Homoduplices, konnten Mutationen detektiert werden (s.u.).

Würde also nur eine männliche Probe allein in die DHPLC eingesetzt werden, würden aufgrund der Lage von *WTX* auf dem X-Chromosom nur Homoduplices entstehen und eine Mutation könnte übersehen werden. Bei den weiblichen Proben war eine Mischung mit Kontroll-DNA nicht notwendig, da bei ihnen ohnehin zwei Kopien von *WTX* vorliegen. Enthält die eine Kopie eine Mutation und die andere dagegen nicht,

würden sich hier nach dem Erhitzen und wieder langsamen Abkühlen in der DHPLC Heteroduplices ausbilden. Homozygote Mutationen (also Mutationen auf beiden Kopien des *WTX*) konnten hiermit allerdings nicht detektiert werden.

Nachdem also die Proben durch den Temperaturwechsel de- und wieder renaturierten, wurde im zweiten Schritt das Gemisch auf eine Säule injiziert. In der Säule befanden sich zwei Phasen, eine mobile und eine stationäre. Die mobile Phase bestand aus Triethylammoniumacetat (TEAA), die stationäre aus einer hydrophoben, neutralen Polymermatrix aus Polystyren-Divinylbenzol Partikeln. Über die Alkylgruppen des TEAA wurde eine Verbindung zwischen der stationären und der mobilen Phase hergestellt. Die doppelsträngige DNA wiederum lagerte sich mit seinen negativ geladenen Phosphatgruppen an die freie positive Ladung des TEAA an. Somit wirkte das TEAA als Brücke zwischen der DNA und der stationären Phase, da zu dieser aufgrund der hydrophoben Partikel keine direkte Bindung entstehen konnte. Durch die Erhöhung einer Acetonitril (ACN)-Konzentration wurde die Bindung der doppelsträngigen DNA ans TEAA langsam aufgelöst. Dabei lösten sich als erstes die Heteroduplices ab, da sie thermodynamisch instabiler sind als die Homoduplices. Diese Instabilität kam durch die nicht vorhandene Wasserstoffbrücke zustande, da sich durch die fehlende Aneinanderlagerung des Doppelstrangs ein hydrophiler Kern bildete. Der hydrophile Kern interagierte mit der wässrigen Lösung der mobilen Phase und löste sich dadurch schneller ab. Die Homoduplices mit intakten Wasserstoffbrücken blieben deshalb länger am TEAA gebunden. Dieser Zeitunterschied in der Loslösung der Doppelstränge war zur Detektion einer Mutation essentiell.

Nach Ablösung wurde die Absorption der DNA durch einen UV-Detektor bei 254 nm gemessen. Mit Hilfe der WAVEMAKER™ Software konnte ein Zeit-Absorptionschromatogramm erstellt werden. Bei Vorliegen einer Mutation stellten sich theoretisch vier Peaks dar, da es vier verschiedene Hybridisierungsprodukte gab: Zuerst zeigten sich zwei aufeinanderfolgende Peaks für die Heteroduplices (einmal A-G- und einmal T-C-Basenfehlpaarung), dann folgten zwei Peaks für die Homoduplices (A-T- und G-C-Basenpaarung). Da die Peaks in der Praxis aufgrund der kurzen Retentionszeiten jedoch meist schneller aufeinanderfolgten, sah man dort nur zwei Peaks (im ersten Peak die Hetero-, im zweiten Peak die Homoduplices).

Lag nur der Wildtyp vor, gab es nur einen Peak, da nur eine (richtige) Basenpaarung vorlag.

2.2.4.2 Durchführung der DHPLC

Im Fall der *WTX*-Mutationsanalyse wurde zunächst die Analysetemperatur mit Hilfe der WAVEMAKER™ Software berechnet. Zu diesem Zweck wurden die amplifizierten Sequenzen jedes Primerpaares in das Programm eingegeben. Die Schmelzprofile wurden dann für jedes Amplikon in Abhängigkeit von der Sequenz ermittelt. Als optimale Schmelztemperaturen eigneten sich diejenigen, bei denen noch mindestens 75% der Probe in helikaler Form vorlagen.

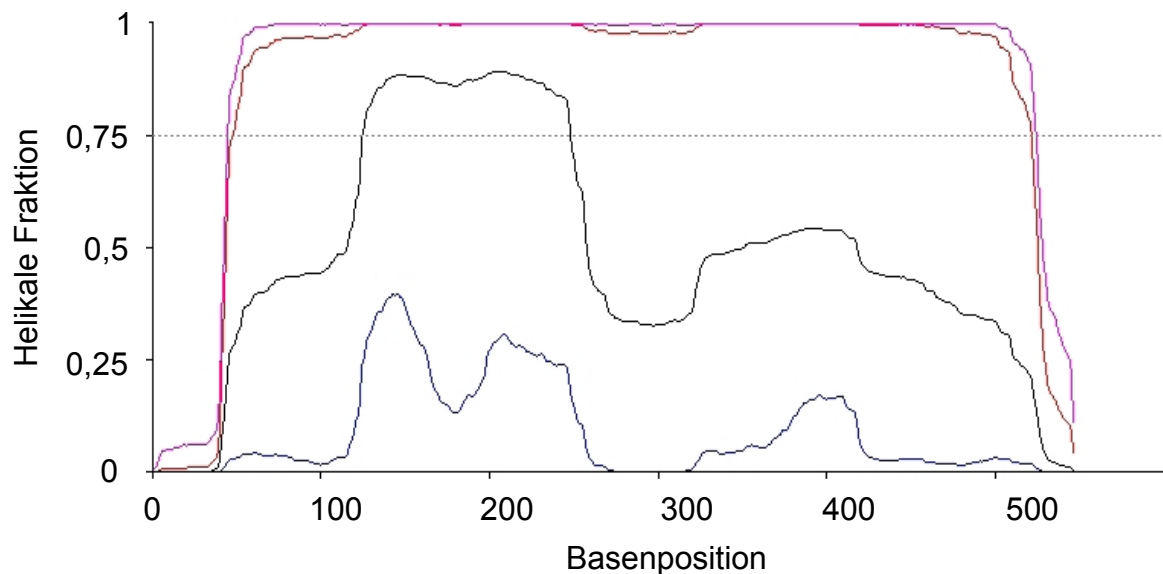


Abb. 5: Schmelzkurvenprofil für *WTX*-Fragment A. Die Kurve zeigt die helikale Fraktion an der jeweiligen Basenposition. Erstellt mit WAVEMAKER™ Software. - = 59 °C. - = 60 °C. - = 61 °C. - = 62 °C.

In Abb. 5 ist beispielhaft das Schmelzkurvenprofil von *WTX*-Fragment A für vier Temperaturen (59, 60, 61, 62 °C) dargestellt. Als Analysetemperaturen wurden die Temperaturen 60 und 61 °C gewählt. Die Temperaturen 59 und 62 °C waren aus folgenden Gründen nicht geeignet: Bei 59 °C lag fast keine Denaturierung vor und im Gegensatz dazu war das Amplifikationsprodukt bei 62 °C zu weit aufgespalten (helikale Fraktion größtenteils unter 0,25).

Die ermittelten Temperaturen aller Primerpaare lagen zwischen 59 und 63 °C. Es erfolgten Probedurchläufe mit den aus jeweils zwei Kontroll-DNAs amplifizierten Fragmenten. Die Schmelzprofile wurden analysiert und die optimalen Temperaturen für jedes einzelne Fragment festgestellt. Die Analyse der Patientenproben erfolgte bei bis zu drei Temperaturen, abhängig vom Schmelzprofil. Zum Teil wurde eine Temperatur als Hauptanalysetemperatur bewertet, weitere Temperaturen wurden zum

Ausschluss von Analyseungenauigkeiten dazu genommen. Die nachfolgende Tabelle 15 zeigt die Analysetemperaturen für alle *WTX*-Fragmente.

Tabelle 15. Analysetemperaturen der einzelnen *WTX*-Fragmente.

<i>WTX</i> -Fragment	Analysetemp (°C)	<i>WTX</i> -Fragment	Analysetemp (°C)
A	60/ 61	G	60 /61
B	60/62	H	59/ 61
C	60/ 61	I	61/ 62
D	60	J	59/ 62
E	60/ 61	J/Ka	59/60/61
F	61/ 62		

Fettgedruckte Temperaturen = Hauptanalysetemperatur.

Wie in 2.2.3.3 beschrieben, wurden zur Ablaufoptimierung und -beschleunigung später die Fragmente zusammengefasst und mit den nachfolgend aufgelisteten Temperaturen analysiert (Tabelle 16).

Tabelle 16. Analysetemperaturen der kombinierten *WTX*-Fragmente.

<i>WTX</i> -Fragment	Analysetemp (°C)	<i>WTX</i> -Fragment	Analysetemp (°C)
A/B	60/61/62	G/H	59/60/61
C/D	59/60	I	61/62
E/F	59/60/62	J/Ka	59/61/62

Nach Durchführung der PCR für die einzelnen *WTX*-Fragmente wurde per Gelelektrophorese das Resultat überprüft. Anhand der Gelelektrophorese konnte auch die Menge des Produkts abgeschätzt werden und so die Kontroll- und Patienten-DNA im gleichen Verhältnis zueinander vermengt werden.

Die oben beschriebene Denaturierung wurde im Thermocycler mit dem Programm WAVE durchgeführt, wobei zunächst für drei Minuten mit 95 °C gestartet und dann pro Minute die Temperatur um 1 °C verringert wurde. Insgesamt wurden so 30 Zyklen durchlaufen. Abschließend wurde die Probe auf 4 °C gekühlt.

Danach wurden die Proben luftblasenfrei in eine 96-*well*-Platte pipettiert. Das Volumen der Proben variierte zwischen 5 und 15 µl je nach der PCR-Produktmenge. Dabei wurde jeweils ein Überschuss mit einberechnet, damit bei der Analyse nicht eingezogene Luft das Ergebnis verfälschte.

Dann wurde diese Platte in das Gerät installiert und die Puffer überprüft. Per Software wurde das für das jeweilige Fragment spezifische Programm gestartet und die Analyse bei den errechneten Schmelztemperaturen durchgeführt. Auffällige Kurvendiagramme wurden anschließend sequenziert.

2.2.5 Sequenzierung

Die Sequenzierung dient der Entdeckung von Mutationen in der Basenabfolge der DNA. Es wurde die Sequenzierung basierend auf der Methode nach Sanger (Sanger et al. 1977) benutzt. Bei dieser Methode wurden Didesoxynukleoside verwendet, die mit unterschiedlichen Farbstoffen markiert waren. Diese Didesoxynukleoside führten aufgrund einer fehlenden OH-Gruppe am 3'-C-Atom bei der Synthese zu einem Kettenabbruch. Nach Anregung der Farbstoffe mittels Laser konnte das Gerät die für die einzelnen Basen verwendeten Fluoreszenzen detektieren. Über die Software Chromas lite wurde die Sequenz graphisch dargestellt und konnte ausgewertet werden.

Zur Vorbereitung dieser automatischen Sequenzierung waren die im Weiteren erläuterten Schritte erforderlich:

Als Erstes war die Aufreinigung des PCR-Produkts notwendig, wobei in dieser Arbeit das 'QIAquick PCR Purification Kit' von Qiagen laut Herstellerangaben verwendet wurde. Damit für die Sequenzierung das gereinigte Produkt nur in einer Leserichtung vorlag, wurde ein erster Sequenzreaktionsansatz mit dem *forward*-Primer und ein zweiter mit dem *reverse*-Primer vermengt. Diese Ansätze setzten sich mit Hilfe des 'BigDye® Terminator Cycle Sequencing Kit' von Applied Biosystems, wie in Tabelle 17 folgt, zusammen.

Tabelle 17. Komponenten des ,BigDye® Terminator Cycle Sequencing Kit'.

Komponente	Volumen
gereinigtes PCR-Produkt	15 ng
BigDye Reaction Buffer (5x)	1,5 µl
BigDye Terminator Mix	1 µl
spezifischer Primer (10 µM)	0,5 µl
steriles H ₂ O	ad 10 µl

Im Thermocycler wurde ein dafür geeignetes PCR-Programm benutzt (Tabelle 18).

Tabelle 18. PCR-Programm zur Sequenzierung.

PCR Schritt	Zyklus	Temperatur (°C)	Zeit (min)
Vorabdenaturierung	1	94	2
Denaturierung	25	96	0,17
Annealing	25	50	0,5
Elongation	25	60	0,08
Kühlen	1	4	∞

∞ = unendlich.

Als Zweites erfolgte die Produktaufreinigung. In der folgenden Tabelle 19 sind die dafür benötigten Komponenten aufgelistet.

Tabelle 19. Komponenten der Produktaufreinigung zur Sequenzierung.

Komponente	Volumen (µl)
Sequenzreaktions-Produkt	10
H ₂ O	46
Natriumacetat (3 Molar)	6,3
100% Ethanol	156

Das Protokoll zur weiteren Verarbeitung enthielt drei Schritte: Im ersten Schritt wurde die Probe 30 Minuten bei 12.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend verworfen und das unsichtbare Pellet mit 200 µl 70%igem Ethanol gewaschen.

Im zweiten Schritt wurde die Probe 15 Minuten bei 12.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder verworfen und das unsichtbare Pellet noch einmal mit 200 µl 70%igem Ethanol gewaschen.

Im dritten und letzten Schritt wurde wieder 15 Minuten bei 12.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und das Pellet ca. zehn bis max. 30 Minuten bei 37°C getrocknet. Diese getrocknete Probe war nun fertig zur weiteren Verarbeitung für den Gellauf der Sequenzierung. Dieser letzte Schritt der Sequenzierung wurde im Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum (BMFZ) der Universität Düsseldorf in Auftrag gegeben. Zur Ergebniskontrolle wurden Referenzsequenzen der Datenbank der *University of California*, Santa Cruz (UCSC, Kent et al. 2002) verwendet.

2.2.6 Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

CDNA steht für *complementary* DNA und zwar die zur *messenger*-Ribonukleinsäure (mRNA) komplementäre DNA. Diese cDNA kann durch das Enzym Reverse Transkriptase (RT) aus mRNA synthetisiert werden. Das heißt, dass optimalerweise nach der Synthese nur der Anteil der DNA als cDNA vorliegt, der auch tatsächlich transkribiert wurde.

Diese Methode wurde durchgeführt um festzustellen, ob bei einer gefundenen Deletion bei weiblichen Patienten das aktive oder das inaktive X-Chromosom betroffen war. Da weibliche Personen zwei X-Chromosomen haben, wird in der Zelle eines dieser zwei X-Chromosomen inaktiviert. Das liegt dann als sogenanntes Barr-Körperchen vor und die Gene dieses inaktivierten X-Chromosoms werden nicht transkribiert. Die qPCR von genomischer DNA konnte nur nachweisen, ob *WTX* deletiert ist. Es konnte keine Aussage darüber gemacht werden, ob bei einer heterozygoten Deletion das aktive oder inaktive X-Chromosom betroffen war. Eine mit cDNA durchgeführte qPCR dagegen könnte dies nachweisen, denn nur wenn das aktive X-Chromosom betroffen wäre, wäre es auch in dieser qPCR deletiert.

Zur cDNA-Synthese wurde das Kit ‚High-Capacity cDNA Reverse Transcription‘ von Applied Biosystems verwendet. Der Mastermix bestand aus den in Tabelle 20 folgenden Chemikalien.

Tabelle 20. Komponenten der ‚High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit‘.

Komponente	Volumen (µl)
10x TaqMan RT Puffer	2,0
25x dNTP Mix (100 mM)	0,8
10x RT Random Primers	2,0
RNase Inhibitor	1,0
MultiScribe® Reverse Transcriptase (50 U/µl)	1,0
DEPC H ₂ O	3,2
RNA bzw. DEPC H ₂ O	10,0

20 µl Ansatz. RT = Reverse Transkriptase. RNase = Ribonuklease. DEPC = Diethylpyrocarbonat.

Es wurden zwei Mastermixe erstellt, einer mit der Reversen Transkriptase und einer ohne. Stattdessen wurde dem zweiten Ansatz Wasser hinzugefügt. Dies wurde zur Kontrolle des Ergebnisses durchgeführt, um eine Kontamination auszuschließen. Es wurde 1 µl RNA mit einer Konzentration von 400 ng/µl auf 10 µl Diethylpyrocarbonat

(DEPC) behandeltem Wasser pipettiert, so dass die RNA mit einer Endkonzentration von 40 ng/μl vorlag. Als Primer kamen zufällige Hexamerprimer zum Einsatz. Sie lagerten sich beliebig an die mRNA an, so dass im Anschluss alle Bereiche der mRNA vorlagen.

Die PCR wurde unter den in Tabelle 21 folgenden Bedingungen durchgeführt.

Tabelle 21. PCR-Programm zur cDNA-Synthese.

PCR Schritt	Temp (°C)	Zeit (min)
1	25	10
2	37	120
3	85	5
4	4	∞

∞ = unendlich.

Die fertig synthetisierte cDNA lag in einer Konzentration von 20 ng/μl im Reaktionsgefäß vor (400 ng RNA auf einen 20 μl Ansatz). Dieser wurde im Verhältnis von 1:10 verdünnt, um die für die qPCR erforderliche Konzentration von 2 ng/μl zu erhalten. Hiervon wurden nach Protokoll (2.2.3.4.1) 5 μl in die anschließende qPCR eingesetzt, um Aberrationen in *WTX* 3' oder 5' zu erkennen.

3 Ergebnisse

3.1 Überblick über die *WTX*-Ergebnisse

Um zu untersuchen, ob Mutationen in *WTX* bei Patienten mit WT vorlagen, wurden an insgesamt 48 Patientenproben verschiedene genetische Analysen durchgeführt. In der Mehrzahl der Fälle handelte es sich bei den Patientenproben um Tumor-DNA, nur in Einzelfällen lag Blut-DNA vor.

Im Folgenden sind Details zu den Patientenproben mit Auffälligkeiten im *WTX*-Gen tabellarisch dargestellt (Tabelle 22).

Tabelle 22. Patientendaten und die zugehörigen Mutationen.

Probe	Sex	Tumor- stadium	ul/bl	Histo	DA (Mo)	<i>WTX</i> - Mutation	<i>CTNNB1</i> - Mutation	<i>WT1</i> - Mutation
EH	w	-	-	-	-	Ala264Thr	n.u.	n.u.
JAH	m	IV	ul	Tri	24	Arg358X	-	-
MD- 305	w	V	bl	S	12	Phe159Leu Gln1019Gln	Ser45Pro	Ser50X
SAD	w	II	ul	B	155	Arg491His	-	-
SG	w	II	ul	Regr	20	Pro884Leu	-	-
DT	m	I	ul	S	29	Del (5', 3')	Ser45Tyr, Thr41Ala, His36Pro	Glu272fs
NJ	m	I	ul	Tri	37	Del (5')	-	-
MLO	m	V	bl	ILNR/S	3	Del (5', 3') (Hälfte)	Thr41Ala, Ser45Phe	Ala10fs
JUB	w	IV	ul	Regr	49	Del (5', 3')	-	-
PEB	m	II	ul	S	60	Del (5', 3')	-	-
LB	m	I	ul	S	12	Del (5', 3')	DelSer45	Ser136fs

w = weiblich. m = männlich. ul = unilateral. bl = bilateral. Histo = Histologie: B = blastemreich, Tri = triphasisch, S = stromareich, Regr = regressiv, ILNR = intralobärer nephrogener Rest. DA = Diagnosealter. Mo = Monate. X = Stopp. Fs = *frameshift*. Del = Deletion. - = nicht vorhanden. n.u. = nicht untersucht.

Wie in der obigen Tabelle aufgeführt, waren elf von 48 untersuchten DNA-Proben auffällig (22,9%). Sechs der Proben zeigten eine Deletion von längeren Sequenzen innerhalb des Gens, fünf zeigten eine Punktmutation (Tabelle 22, Spalte *WTX*-

Mutation). Bei einer der Proben (EH) handelte es sich um eine Keimbahnmutation. Die anderen Mutationen wurden im Tumormaterial nachgewiesen. Zu diesen Proben lag keine Blut-DNA zur Überprüfung einer Keimbahnmutation vor.

Vor der eigentlichen Analyse fand eine zeitintensive Etablierung der Methoden für *WTX* statt. Bei der Mutationsanalyse wurde zuerst *WTX* aus genomischer DNA mittels PCR amplifiziert. Aufgrund der Länge von *WTX* wurde das Gen in zwölf Abschnitte unterteilt (s. Primer bei Rivera et al. 2007). Die Genabschnitte wurden dann im ersten Schritt per DHPLC untersucht. Diese Methode hat eine sehr hohe Sensitivität und einen hohen Probendurchsatz, so dass sie als erstes Screening geeignet ist. Im zweiten Schritt wurden aberrante Produkte sequenziert.

Da laut verschiedenen Publikationen (Fukuzawa et al. 2009; Perotti et al. 2008; Rivera et al. 2007; Ruteshouser et al. 2008) auch häufig Deletionen in *WTX* vorlagen, wurden im dritten Schritt qPCRs durchgeführt.

3.2 PCR-Etablierung

Zur molekularen Analyse von *WTX* war zunächst eine Vervielfältigung des Gens mittels PCR notwendig. Für jedes einzelne Paar der zwölf *WTX*-Primer mussten die Bedingungen der PCR etabliert werden.

Als Erstes wurde pro Primerpaar eine PCR auf einem Gradientencycler mit zwölf verschiedenen Temperaturen durchgeführt (vgl. 2.2.3.2). Die PCR-Produkte wurden auf einem Agarosegel aufgetragen und ausgewertet. Dabei war es wichtig, dass keine Primerdimere und keine unspezifische Amplifikation vorlagen. Unter diesen Kriterien wurde für jedes Amplikon die Temperatur ausgewählt, die die größte Produktmenge ergab (Tabelle 23).

Tabelle 23. Annealing-Temperaturen für *WTX*-Amplikons.

<i>WTX</i> -Amplikon	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
<i>Annealing</i> -Temp	65,9	58,3	56,5	60,6	68,5	60,6	55,3	60,6	56,5	60,6	-

Annealing-Temperatur in °C. - = kein Ergebnis.

Bei Fragment K kam es trotz mehrmaliger Änderung (s. 2.2.3.2) der PCR-Bedingungen zu keiner oder nur einer ungenügenden Amplifikation. Auch das Design von drei neuen Primern erbrachte nicht den gewünschten Erfolg. Schließlich ließ sich durch die Kombination des *forward* Primers des Fragments J mit dem alternativen *reverse*

Primer des Fragments K (Ka) in einer PCR mit den gewöhnlichen Bedingungen (s. 2.2.3.2) das gewünschte Ergebnis erzielen. Auch die anderen Primer wurden zusammengelegt: Es wurde der *forward* Primer des vorherigen mit dem *reverse* Primer des nachfolgenden Fragments verwendet und die PCR auf TD-PCR umgestellt (s. 2.2.3.3). Die „neuen“ Fragmente konnten dann mit folgenden Temperaturen analysiert werden (Tabelle 24).

Tabelle 24. Temperaturen der TD-PCR für WTX-Amplikons.

WTX-Amplikon	A/B	C/D	E/F	G/H	I	J/Ka
TD-PCR	64-61	60-57	64-61	62 ¹	60-57	64-61

TD = *Touchdown*. ¹ = normale PCR durchgeführt.

Bei dem Fragment G/H (Tabelle 24, Spalte 5) wurde eine normale PCR bei einer Annealingtemperatur von 62 °C durchgeführt, da bei einer TD-PCR unspezifische Amplifikationen auftraten.

3.3 Mutationsanalyse per DHPLC

Nach Amplifikation aller Proben durch PCR erfolgte im nächsten Schritt die Analyse per DHPLC. Die DHPLC kann aufgrund von unterschiedlichen Schmelzprofilen Hetero- von Homoduplices unterscheiden und somit Mutationen nachweisen. Hierzu wurden die Proben mit einem zuvor untersuchten Wildtyp gemischt. Abhängig vom PCR-Ergebnis wurden die Probe und der Wildtyp im möglichst gleichen Volumenverhältnis eingesetzt.

3.3.1 Etablierung der DHPLC für WTX

Zunächst musste die DHPLC für die zwölf Primerpaare des WTX etabliert werden. Als Erstes wurden hierfür die Schmelzprofile über die WAVEMAKER™ Software errechnet (s. 2.2.4.2).

Für alle zwölf Abschnitte des WTX fiel die Entscheidung für verschiedene Vor-Analysetemperaturen. Es folgten Probedurchläufe, die mit je zwei Kontrollen durchgeführt wurden. Als Kontrollen dienten die Blut-DNA gesunder Personen. Die Schmelzprofile wurden ausgewertet und auffällige Kurven wurden weiter analysiert. Anhand der ausgewerteten Daten wurden die endgültigen Analysetemperaturen festgelegt (s. 2.2.4.2, Tabelle 15 und Tabelle 16).

3.3.2 DHPLC-Ergebnisse

Insgesamt 10,4% der untersuchten Patientenproben zeigten bei der Mutationsanalyse mittels DHPLC aberrante Kurvenverläufe. Absolut bedeutete dies, dass von den 48 analysierten Patientenproben fünf auffällig waren. Zum Teil wurde die DHPLC von 13 dieser Proben inklusive vorheriger PCR von Frau Edith Höricht-Lieb (MTA des humangenetischen Instituts Düsseldorf) durchgeführt.

Die gefundenen Auffälligkeiten lagen in den Fragmenten A, C, E, I und J/Ka.

Eine der Proben zeigte bereits bei den Probendurchläufen einen auffälligen Kurvenverlauf. Es war eine gesunde Probanden-DNA, die als Kontrolle (EH) eingesetzt worden war (Abb. 6).

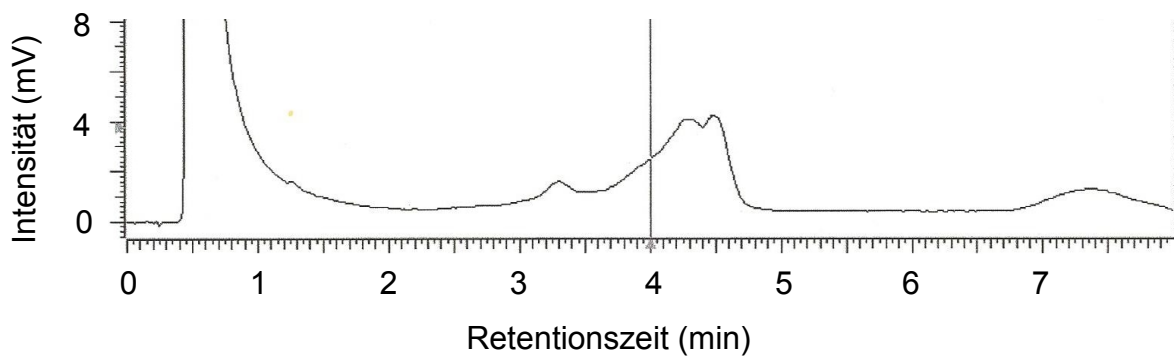


Abb. 6: WTX-Mutation in Fragment C. DHPLC. Zeit-Absorptionschromatogramm. Probendurchlauf mit der gesunden Kontrollprobe EH. Temperatur: 61 °C. - = Kontrollprobe EH.

Um auch bei Kontroll-DNAs Mutationen erkennen zu können, wurden immer zwei DNA-Proben von verschiedenen gesunden Probanden analysiert (Abb. 7).

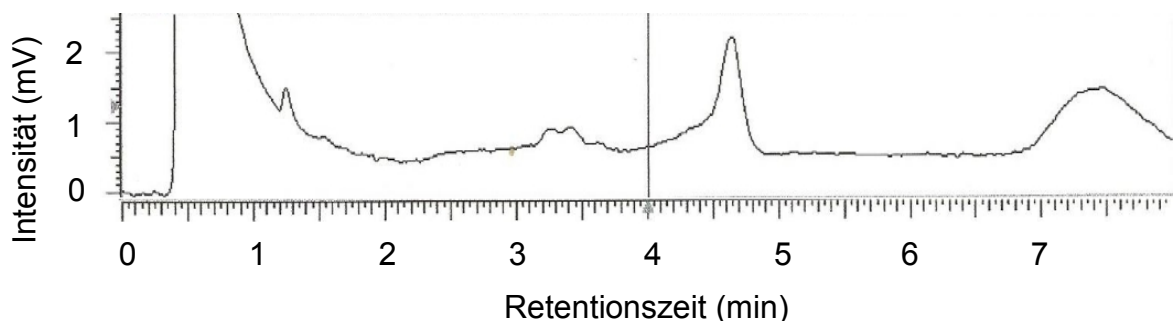


Abb. 7: Fragment C. DHPLC. Zeit-Absorptionschromatogramm. Probendurchlauf mit zweiter gesunder Kontrollprobe. Temperatur: 61 °C. - = Kontrollprobe.

Vergleicht man nun die beiden Abbildungen (Abb. 6, Abb. 7), fällt direkt der unterschiedliche Kurvenverlauf auf.

Nach Erkennen der Mutation wurde diese durch eine andere gesunde Probanden-DNA ersetzt. Eine andere Probe zeigte gleich in zwei Fragmenten Auffälligkeiten. Die nachfolgenden Abbildungen (Abb. 8 - Abb. 12) zeigen die Zeit-Absorptionsdiagramme der detektierten Mutationen.

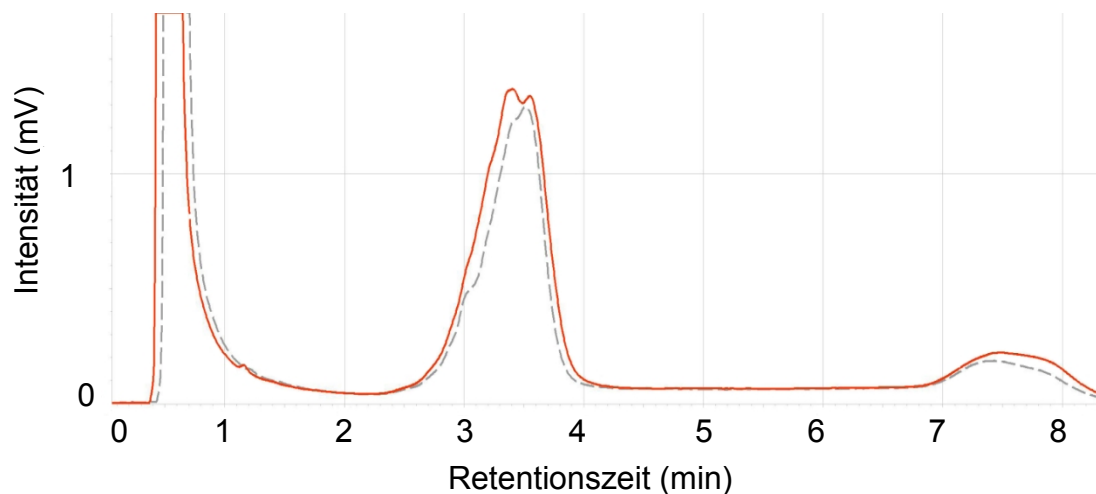


Abb. 8: WTX-Mutation in Fragment A/B. DHPLC. Zeit-Absorptionschromatogramm. Temperatur: 62°C. — = MD305. -- = Kontrollprobe.

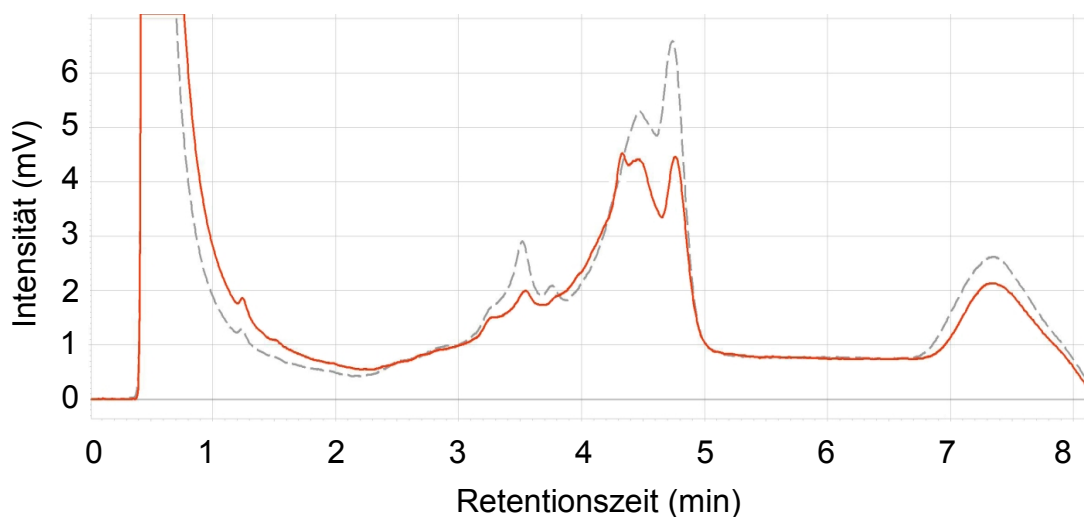


Abb. 9: WTX-Mutation in Fragment C. DHPLC. Zeit-Absorptionschromatogramm. Temperatur 61 °C. — = JAH. -- = Kontrollprobe.

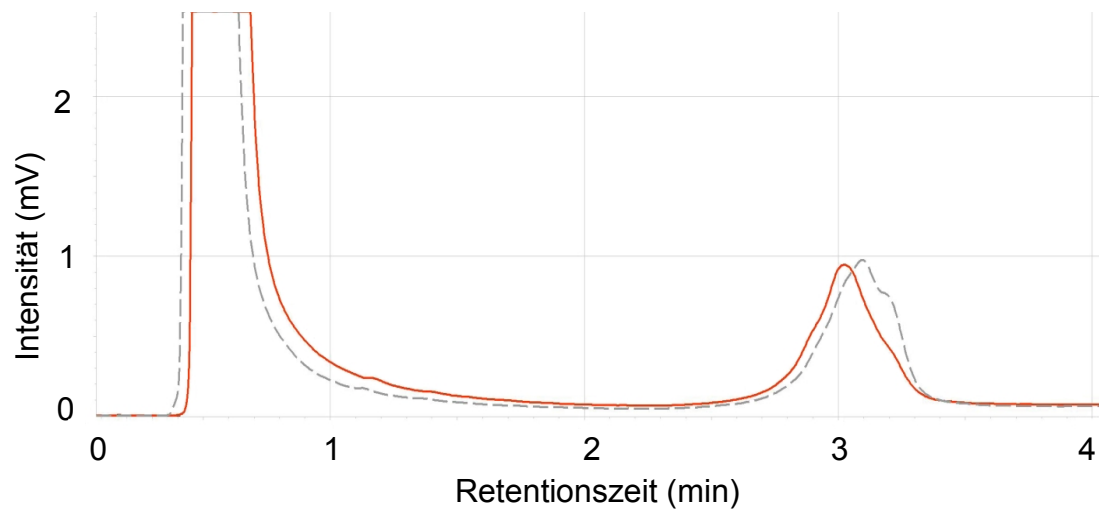


Abb. 10: WTX-Mutation in Fragment E/F. DHPLC. Zeit-Absorptionschromatogramm. Temperatur: 62 °C. — = SAD. -- = Kontrollprobe.

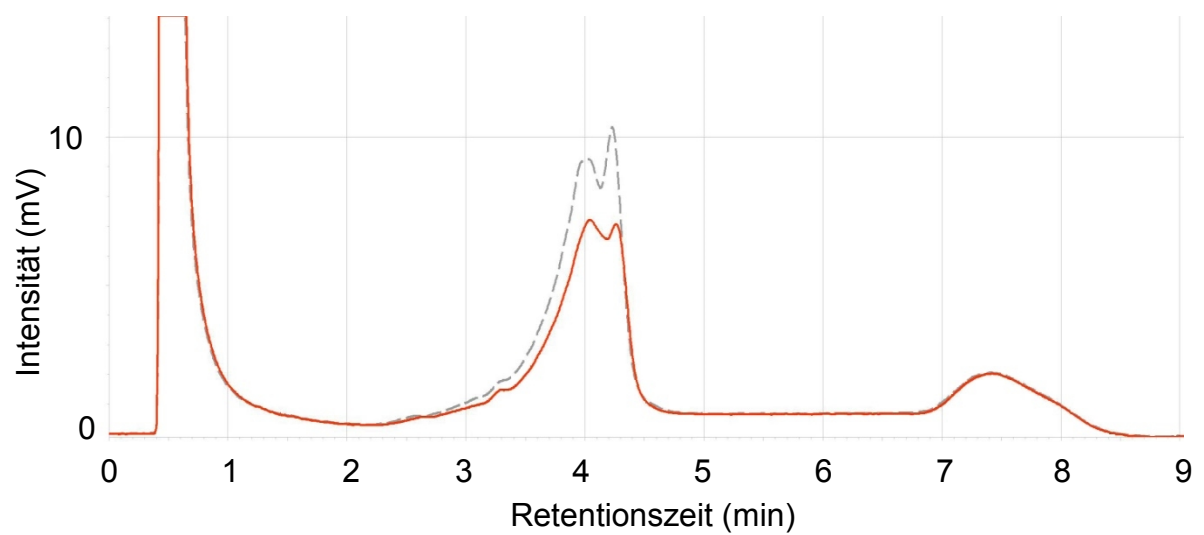


Abb. 11: WTX-Mutation in Fragment I. DHPLC. Zeit-Absorptionschromatogramm. Temperatur: 62 °C. — = SG. -- = Kontrollprobe.

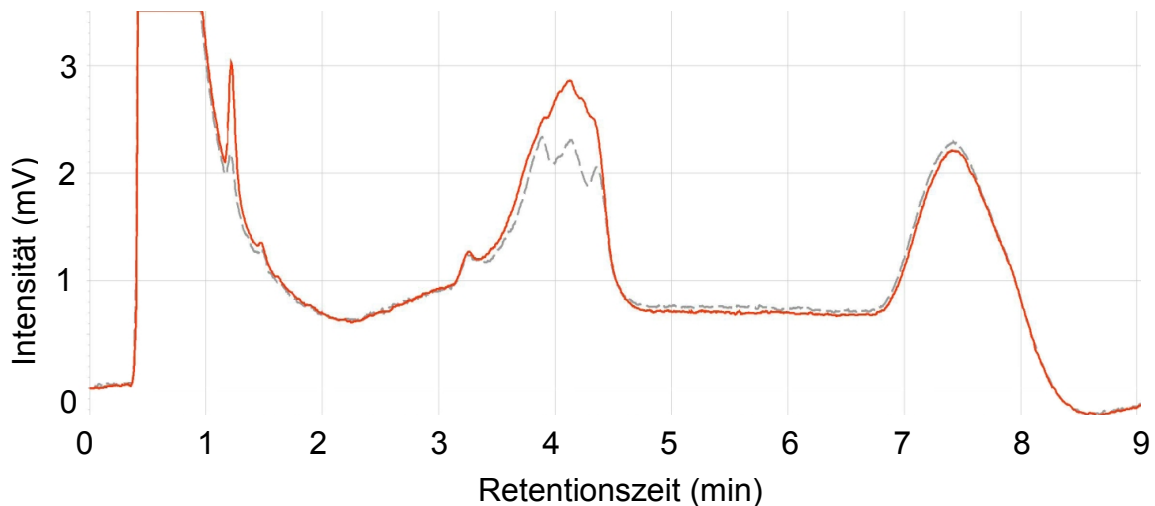


Abb. 12: WTX-Mutation in Fragment J/Ka. DHPLC. Zeit-Absorptionschromatogramm. Temperatur: 61 °C. — = MD305. -- = Kontrollprobe.

Anhand der Abbildungen lässt sich erkennen, dass die Kurvenverläufe in dem Zeit-Absorptionsdiagramm nicht so eindeutig waren, wie in der Theorie beschrieben (2.2.4.1). Die Hetero- und Homoduplexe waren zumeist nicht als Doppelpeaks aufgetrennt. Daher war der Vergleich mit der Kontrolle wichtig: Wicht der Kurvenverlauf der Probe deutlich von dem der Kontrolle ab, wurde diese Probe sequenziert. Dies konnte beispielsweise der Unterschied sein, dass im Gegensatz zur Kontrolle der zweite Peak der Probe niedriger war als der Erste (Abb. 11). In einem anderen Fall (Abb. 10) war der einzige Unterschied, dass der Peak der Probe früher auftrat als der der Kontrolle.

3.4 Mutationsanalyse per Sequenzierung

Um zu untersuchen, ob die aberranten Fragmente in der DHPLC tatsächlich eine Mutation trugen, wurde eine Sequenzierung durchgeführt. Die Sequenzierung erfolgte nach Sanger (s. 2.2.5). Dazu wurden fluoreszenz-markierte dNTP's eingesetzt, die durch Anregung des Farbstoffs detektiert werden konnten. Die Ergebnisse wurden mit Hilfe der Software Chromas lite dargestellt. Diese Sequenz wurde mit einer Sequenz des amplifizierten Gens aus der UCSC-Datenbank verglichen.

Alle sechs Proben, die in der DHPLC Auffälligkeiten zeigten, wurden sequenziert (die Vorbereitung zweier Proben zum Gellauf der Sequenzierung wurden durch Frau Höricht-Lieb durchgeführt). Bei allen konnte eine Mutation bestätigt werden. Jede der

festgestellten Mutationen war eine Punktmutation. Hiervon gibt es drei verschiedene Arten, die alle nachgewiesen werden konnten: stille, *missense*- und *nonsense*-Mutationen.

Eine stille Punktmutation beschreibt eine Mutation, bei der zwar eine Base ausgetauscht wurde, die jedoch für die gleiche Aminosäure kodiert. Dies war bei MD305 in Fragment J/Ka der Fall. An Position 3057 fand sich anstatt Adenin die Base Guanin. Das Triplet CAG kodierte genauso wie das vorherige Triplet CAA für Glutamin (Gln) (Abb. 13).

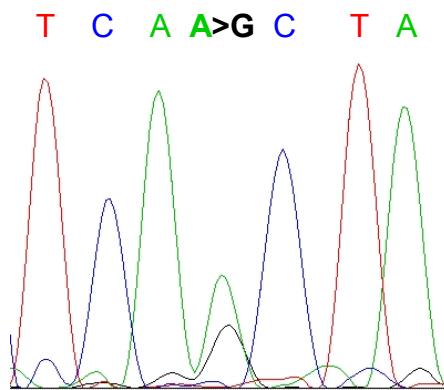


Abb. 13: Stille WTX-Punktmutation in Fragment J/Ka. Sequenzierung. Probe: MD305. *Forward*-Strang. Heterozygoter Basenaustausch an Position 3057: A>G. Protein: Gln1019Gln. A = Adenin. C = Cytosin. G = Guanin. T = Thymin.

In den meisten Fällen (vier Proben) konnte eine *missense*-Mutation nachgewiesen werden: Diese liegt vor, wenn ein Basen- und dadurch auch ein Aminosäurenaustausch stattfindet. Die betroffenen Proben waren: EH (ehemalige Kontrollprobe), MD305, SAD und SG (Abb. 14).

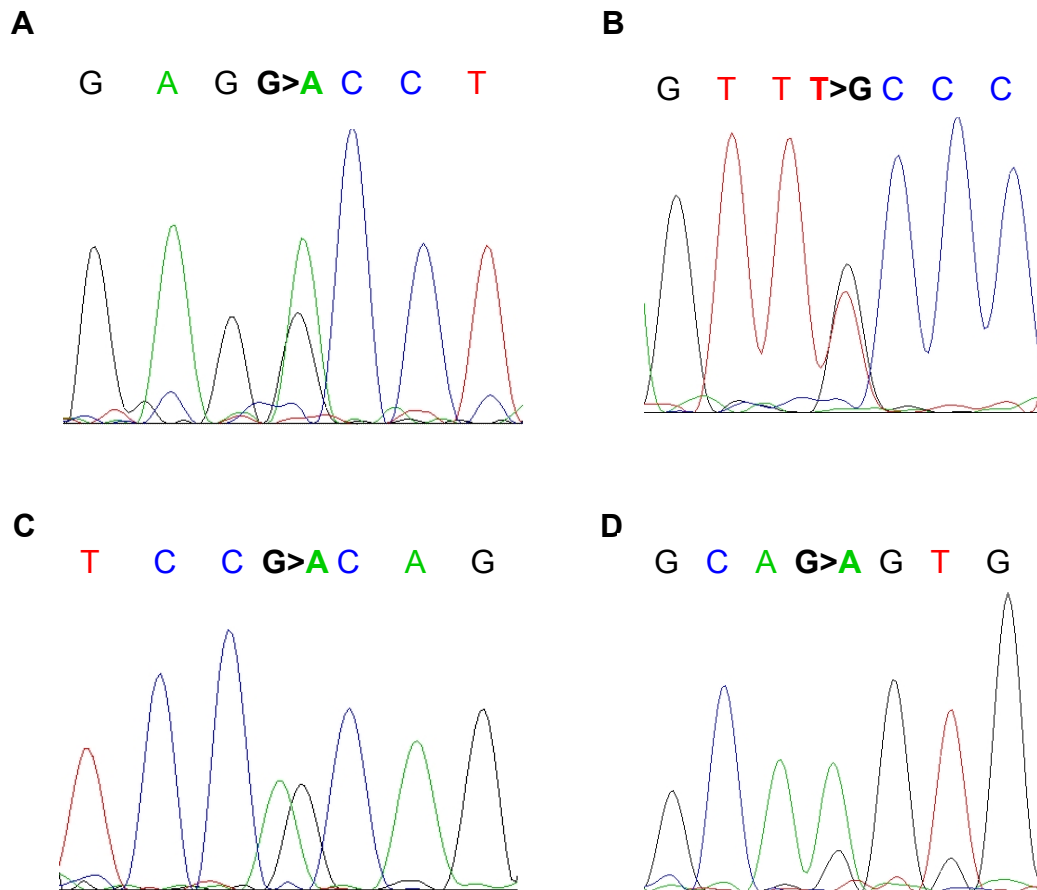


Abb. 14: WTX-missense-Mutationen in verschiedenen Fragmenten. Sequenzierung.

A: Fragment C. Probe: EH. *Forward*-Strang. Heterozygoter Basenaustausch an Position 790 G>A. Protein: Ala264Thr. **B: Fragment A/B.** Probe: MD 305. *Forward*-Strang. Heterozygoter Basenaustausch an Position 477 T>G. Protein: Phe159Leu. **C: Fragment E.** Probe: SAD. *Forward*-Strang. Heterozygoter Basenaustausch an Position 1472 G>A. Protein: Arg491His. **D: Fragment I.** Probe: SG. *Reverse*-Strang. Heterozygoter Basenaustausch an Position 2651 C>T. Protein: Pro884Leu. A = Adenin. C = Cytosin. G = Guanin. T = Thymin.

Bei einer nonsense-Mutation führt der Basenaustausch zur Kodierung eines Stoppcodons. Somit kommt es zu einem Abbruch der Proteinsynthese. Dies lag bei JAH in Fragment C vor (Abb. 15).

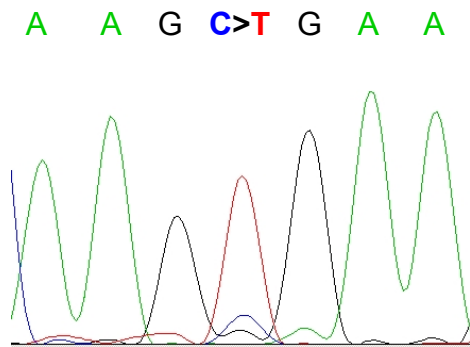


Abb. 15: *WTX*-nonsense-Mutation in Fragment C. Sequenzierung. Probe: JAH. *Forward*-Strang. Basenaustausch an Position 1072 C>T. Protein: Arg358X. A = Adenin. C = Cytosin. G = Guanin. T = Thymin.

Zusammenfassend wurden also durch die DHPLC und die anschließende Sequenzierung sechs Punktmutationen entdeckt. Es gab eine stille Mutation, vier *missense*-Mutationen und eine *nonsense*-Mutation. Tabelle 25 zeigt die Proben mit den gefundenen Punktmutationen und den daraus resultierenden Proteinveränderungen im Überblick.

Tabelle 25. *WTX*-Sequenzierungsergebnisse: Punktmutationen.

Probenname	Punktmutation im Gen	Proteinmutation
EH	790G>A	Ala264Thr
JAH	1072C>T	Arg358X
MD-305	477T>G	Phe159Leu
	3057A>G	Gln1019Gln
SAD	1472G>A	Arg491His
SG	2651C>T	Pro884Leu

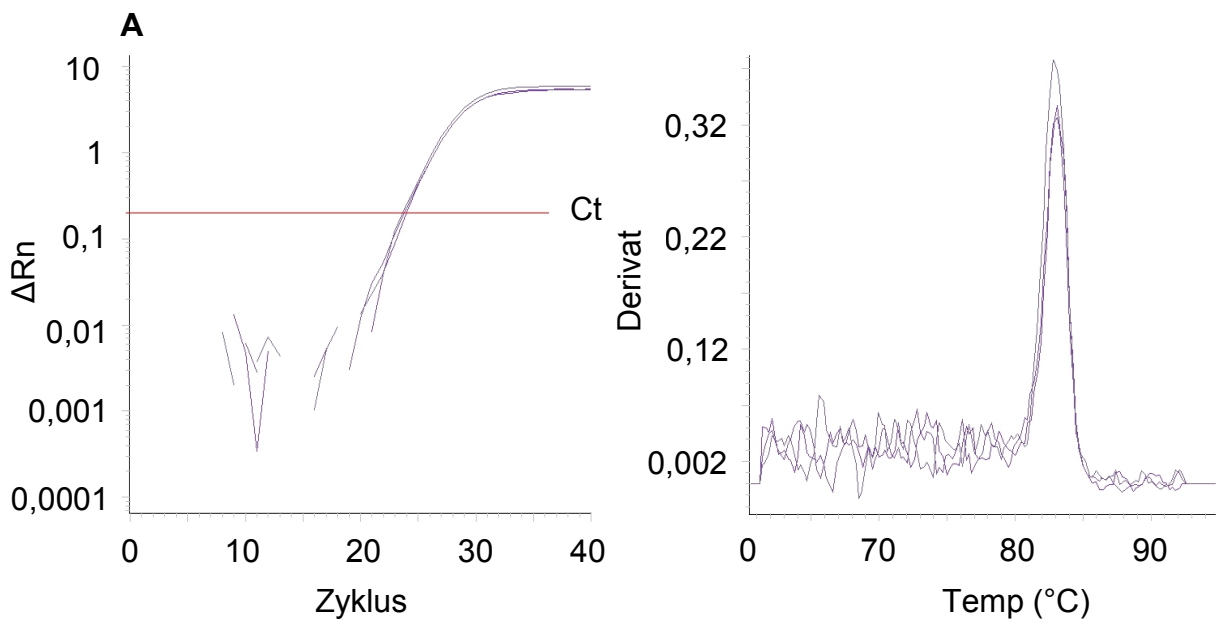
3.5 *WTX*-Deletionsanalyse per qPCR

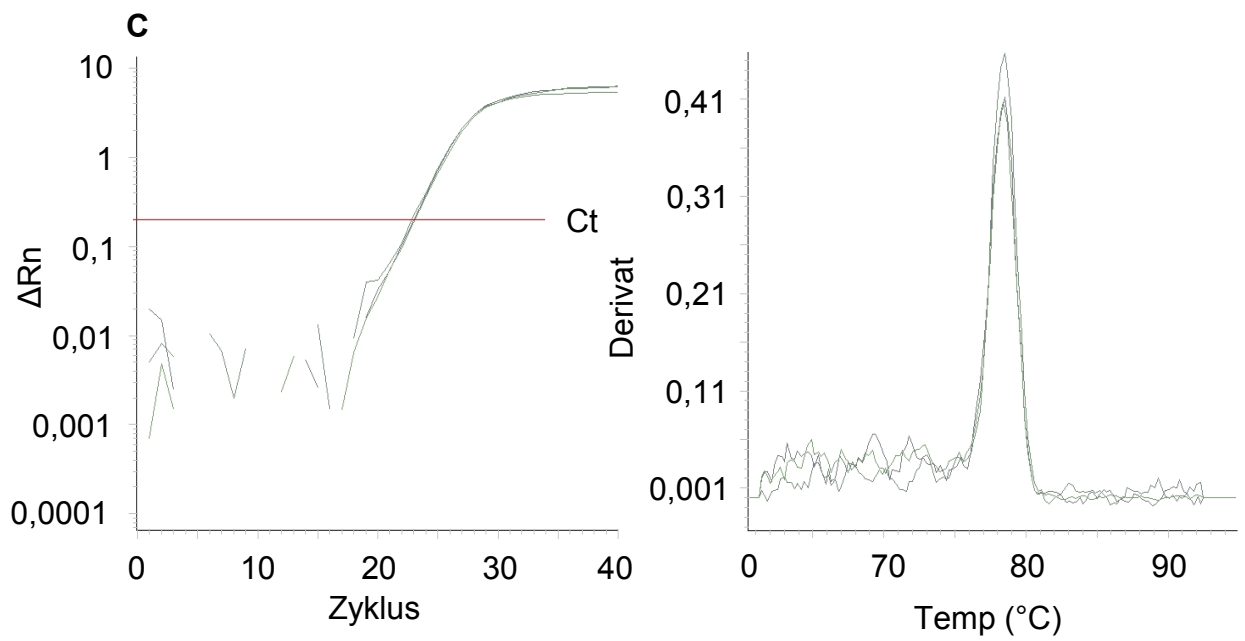
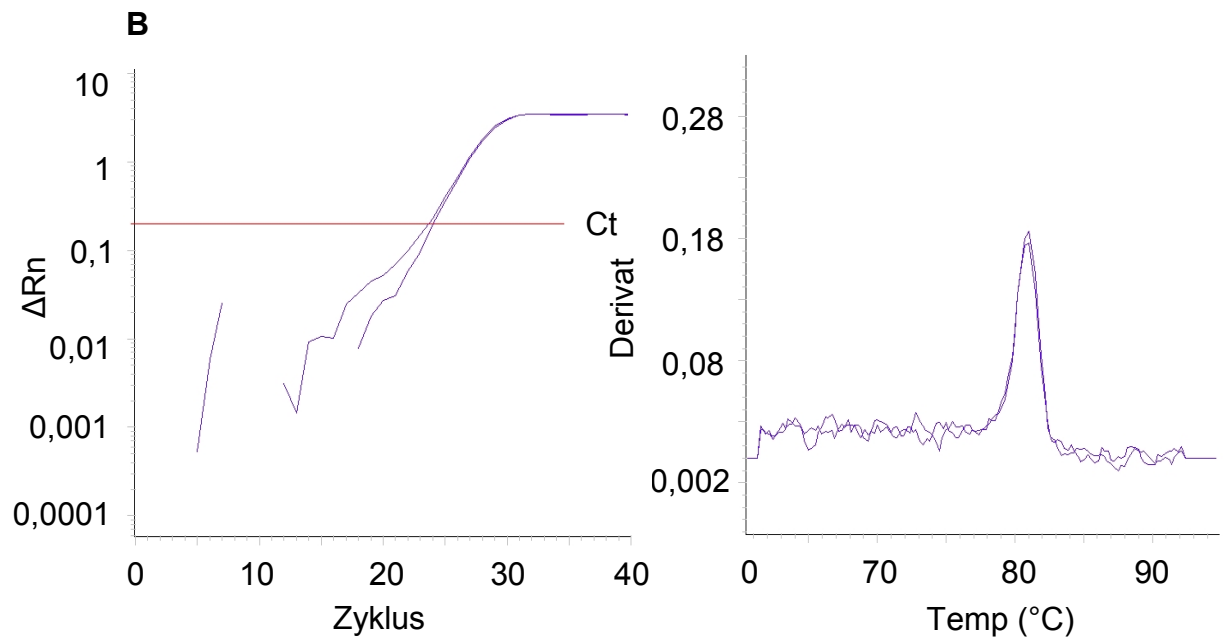
Um die Proben auch auf Deletionen zu überprüfen, wurde eine qPCR durchgeführt. Die qPCR bestimmt bei der Amplifikation von DNA-Abschnitten die Quantifizierung des entstehenden Produkts. Um die Höhe der Quantifizierung messen zu können, wurde in dieser Arbeit SYBR Green eingesetzt. SYBR Green ist ein Farbstoff, der sich in doppelsträngige DNA interkaliert und dadurch fluoresziert. Diese Fluoreszenz kann dann gemessen werden.

3.5.1 Primeretablierung zur *WTX*-Deletionsanalyse

Zur Deletionsanalyse von *WTX* wurden zwei Primer verwendet. Der eine Primer lag am Anfang des Gens (*WTX* 5') und der andere am Ende (*WTX* 3'). Als Referenzgene wurden *FAH* und *NDST1* benutzt. Wie in 2.2.3.4.1 beschrieben, durchliefen die Primer zuerst eine Optimierung. Die *forward* und *reverse* Primer wurden jeweils in neun verschiedenen Konzentrationen zueinander eingesetzt. Anschließend wurde für die Analyse das beste Verhältnis der Primerkonzentrationen nach folgenden Kriterien ausgesucht: Zum einen sollten die drei Proben des Triplikats bei der Amplifikation möglichst keine Abweichungen voneinander zeigen. Hierzu wurden die drei Proben des Triplikats im Amplifikationsplot miteinander verglichen. Zum anderen sollte das gewünschte Produkt ohne Nebenprodukte vorliegen. Dies war aus der Dissoziationskurve erkennbar, die nur einen Peak aufweisen sollte. Wie bei allen PCR wurde das Ergebnis nur verwendet, wenn die Wasserprobe negativ war.

Nach diesen Kriterien wurde die Konzentration E (je 0,6 µl *forward* und *reverse* Primer) für *WTX* 5', *FAH* und *NDST1* ausgesucht. Bei *WTX* 3' fiel die Entscheidung für die Konzentration D (0,1 µl *forward* und 0,6 µl *reverse* Primer, Abb. 16).





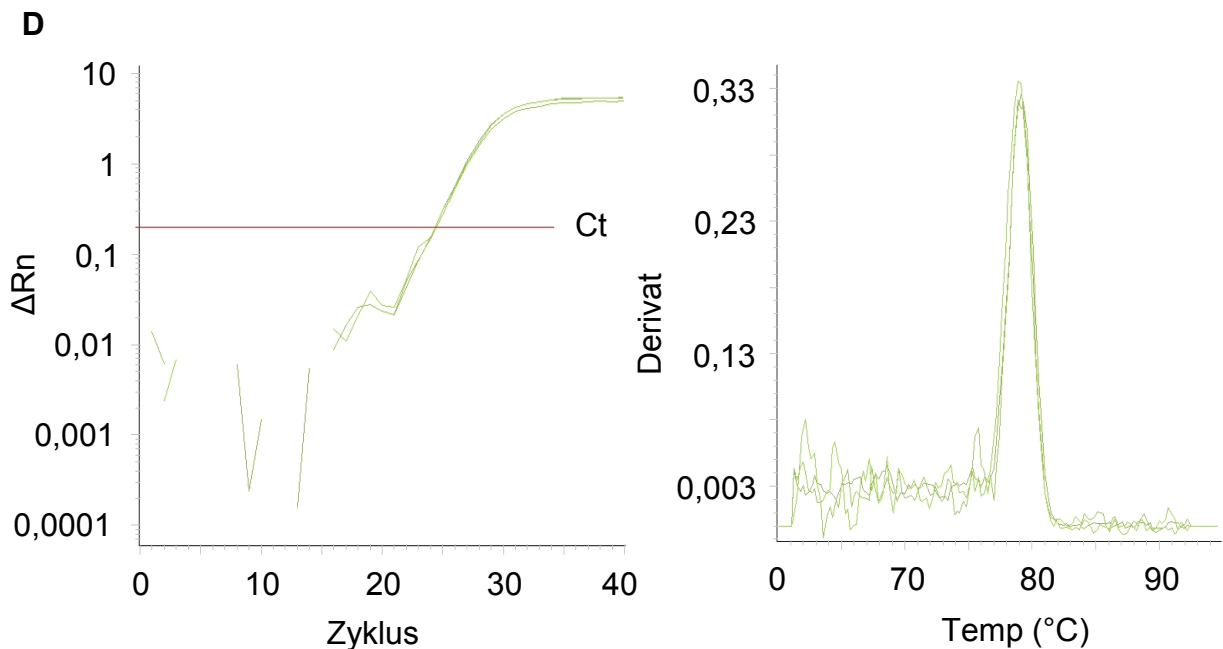


Abb. 16: Primeroptimierung mit dem optimalen Verhältnis der Primerkonzentrationen. Linke Spalte: Amplifikationsplot. Rechte Spalte: Dissoziationskurve. qPCR. A: *WTX* 5', Konzentration E. B: *WTX* 3', Konzentration D. C: *FAH*, Konzentration E. D: *NDST1*, Konzentration E. ΔRn = relative Fluoreszenz des Zyklus n in Bezug auf die Hintergrundfluoreszenz. Ct = *cycle threshold*.

Die später gebrauchten Primer *PHEX* und *OCRL* durchliefen ebenfalls eine Primeroptimierung. Die besten Resultate zeigten sich bei Konzentration E (s.o., je 0,6 μ l *forward* und *reverse* Primer), so dass die Primer in diesem Verhältnis bei der Analyse eingesetzt wurden.

3.5.2 Ergebnisse der qPCR

Nachdem die Primer etabliert worden waren, konnte mit der Deletionsanalyse begonnen werden. Insgesamt wurden 26 Patienten untersucht. Jede Probe wurde als Triplikat angesetzt und der Versuch an einem anderen Tag wiederholt, um das Ergebnis wie auch in den vorherigen Versuchen mit zwei verschiedenen Kontrollen zu bestätigen. Die eine Kontrolle war ein Pool aus ca. 16 verschiedenen DNAs, die andere war isolierte DNA aus dem Blut einer einzelnen Person. Erwartungsgemäß wurden die zu den Proben gleichgeschlechtlichen Kontrollen benutzt. Die Patientenproben waren größtenteils Tumor-DNA. Des Weiteren wurde DNA aus zwei WT-Zelllinien verwendet (kultiviert im hiesigen Institut). Eine der WT-Zelllinien wurde in zwei verschiedenen Passageschritten untersucht.

Es ließen sich sechs Aberrationen nachweisen, was bedeutet, dass 23,1% der Proben Auffälligkeiten zeigten. Fünf der Proben waren von männlichen Patienten und eine war von einer weiblichen Patientin. Die Ergebnisse einer der männlichen Proben werden gesondert unter 3.5.3 erläutert, da es sich hierbei um verschiedene Tumorstadien eines Patienten handelt.

Die Mehrzahl der Deletionen lagen in *WTX* 5' und in *WTX* 3' (Abb. 17 - Abb. 19). Vermutlich fehlt bei diesen Deletionen das gesamte *WTX*-Gen.

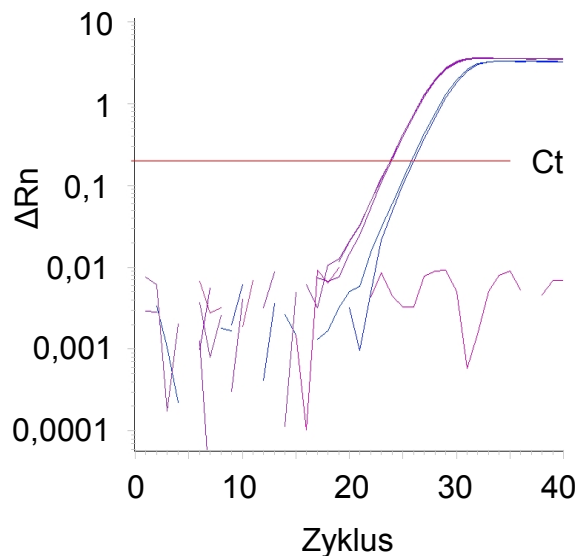


Abb. 17: Deletion in *WTX* 3' einer weiblichen Probe. qPCR. JUB in Bezug auf eine weibliche Kontrolle und Wasser. - = JUB, - = Kontrollprobe, - = Wasser. ΔRn = relative Fluoreszenz des Zyklus n in Bezug auf die Hintergrundfluoreszenz. Ct = cycle threshold.

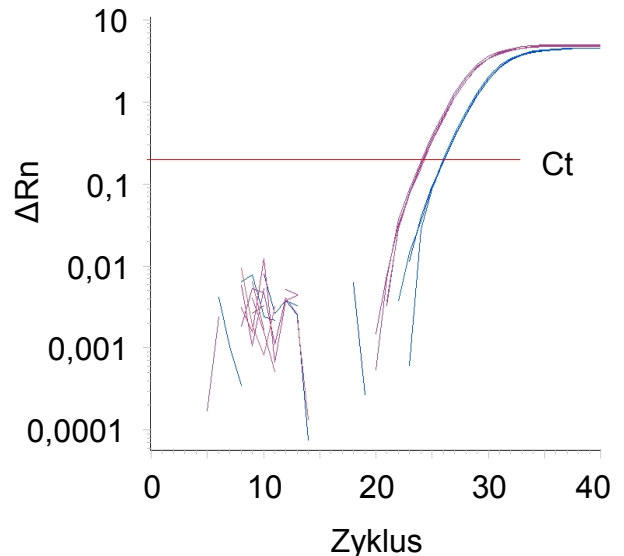


Abb. 18: Deletion in *WTX* 5' einer weiblichen Probe. qPCR. JUB in Bezug auf eine weibliche Kontrolle und Wasser. - = JUB, - = Kontrollprobe, - = Wasser. ΔRn = relative Fluoreszenz des Zyklus n in Bezug auf die Hintergrundfluoreszenz. Ct = cycle threshold.

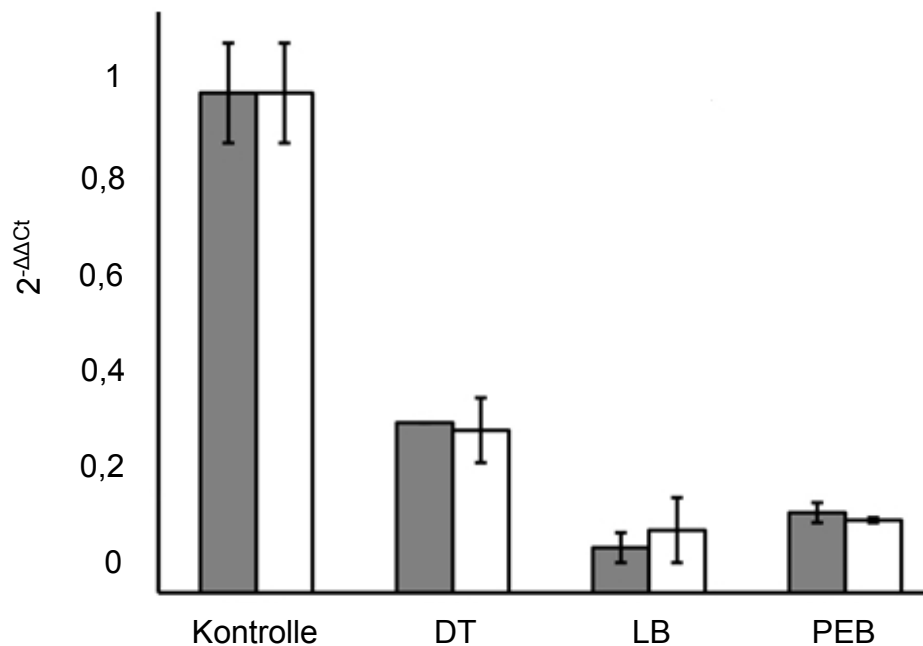


Abb. 19: WTX-Deletionsnachweis in drei männlichen Proben. qPCR. $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Werte im Vergleich zur männlichen Kontrollprobe. Grau = WTX 3', weiß = WTX 5'.

Eine der männlichen Patientenproben wies jedoch nur eine Deletion in WTX 5' auf (Tabelle 26). Dieses Ergebnis bestätigte sich in dem Wiederholungsversuch und galt für beide Referenzgene (*NDST1* und *FAH*).

Tabelle 26. WTX 3'-/5'-qPCR-Ergebnisse für NJ.

Probe	Detektor	$2^{-\Delta\Delta C_t}$
NJ	WTX 3'	0,9
NJ	WTX 5'	0,16

$2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Werte bezogen auf das Referenzgen *FAH* und einen männlichen Kontrollpool.

Die obige Tabelle 26 zeigt exemplarisch das Ergebnis für die Probe NJ: Der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Wert für WTX 3' liegt bei 0,9 und weist damit auf ein annähernd komplettes Vorliegen des Gens hin. Der Wert für WTX 5' liegt dafür wesentlich niedriger bei 0,16, was auf eine Deletion in diesem Teil des Gens hinweist.

3.5.3 qPCR-Ergebnisse verschiedener WT eines Patienten

Es wurde ein Patient analysiert, der einen bilateralen WT und Rezidive erlitten hatte. Initial war bei diesem Patienten rechts ein WT und links ein ILNR gefunden worden. Das WT-Rezidiv trat in beiden Nieren auf. In einer vorherigen Arbeit (Uschkereit 2008) war bereits aufgefallen, dass unterschiedliche Mutationen in *CTNNB1* in den verschiedenen Tumoren vorkamen. Daher wurde die DNA der verschiedenen Tumore

auf Deletionen in *WTX* untersucht. Es lag Tumor-DNA von dem rechten Initialtumor (MLO5), dem linken ILNR (MLO2) und den Rezidiven vor (MLO1, MLO3, MLO4, Spezifizierung s. Tabelle 27).

Tabelle 27. Patient MLO: Probenbezeichnung der verschiedenen Tumore mit *CTNNB1*-Mutation.

Probe	Tumor	<i>CTNNB1</i> -Mutation
MLO1	Rezidiv rechts	Ser45Phe
MLO2	intralobärer nephrogener Rest links	Wildtyp
MLO3	Rezidiv links, oberer Pol	Thr41Ala
MLO4	Rezidiv links, unterer Pol	Thr41Ala
MLO5	Initialtumor rechts	Wildtyp

Die Ergebnisse zeigten, dass *WTX* nur in einer der fünf verschiedenen Proben deletiert war (MLO5). In dieser Probe des rechten Initialtumors war die relative Kopienzahl von *WTX* 3' und *WTX* 5' in etwa halbiert. Die anderen Proben zeigten keine Aberrationen (Tabelle 28).

Tabelle 28. WTX3'/5'-qPCR-Ergebnis für MLO1-5.

Probe	Detektor	Ct MW	σ	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	FC
MLO1	WTX 3'	26,27	0,01	1,26	1,26
MLO2	WTX 3'	25,92	0,06	1,28	1,28
MLO3	WTX 3'	26,12	0,07	1,02	1,02
MLO4	WTX 3'	25,90	0,04	1,18	1,18
MLO5	WTX 3'	27,58	0,05	0,48	-2,08
Ko ♂	WTX 3'	25,97	0,07	1,06	1,06
Ko-Pool ♂	WTX 3'	26,36	0,06		
Wasser	WTX 3'	negativ	negativ	negativ	negativ
MLO1	WTX 5'	25,89	0,01	1,11	1,11
MLO2	WTX 5'	25,68	0,28	1,02	1,02
MLO3	WTX 5'	25,64	0,11	0,96	-1,04
MLO4	WTX 5'	25,48	0,08	1,07	1,07
MLO5	WTX 5'	27,15	0,07	0,44	-2,27
Ko ♂	WTX 5'	25,50	0,05	0,99	-1,01
Ko-Pool ♂	WTX 5'	25,79	0,08		
Wasser	WTX 5'	negativ	negativ	negativ	negativ
MLO1	FAH	24,29	0,10		
MLO2	FAH	23,97	0,07		
MLO3	FAH	23,84	0,05		
MLO4	FAH	23,83	0,04		
MLO5	FAH	24,22	0,04		
Ko ♂	FAH	23,74	0,05		
Ko-Pool ♂	FAH	24,05	0,05		
Wasser	FAH	negativ	negativ	negativ	negativ

$2^{-\Delta\Delta Ct}$ - und FC-Wert bezogen auf Ko-Pool ♂ und FAH. Fettgedruckte Zahlen zeigen die verringerten $2^{-\Delta\Delta Ct}$ - und FC-Werte. Ko = Kontrolle. ♂ = männlich. Ct = *cycle threshold*. MW = Mittelwert des Triplets. σ = Standardabweichung. FC = *Fold Change*.

Wie in Tabelle 28 ersichtlich, liegt die relative Kopienzahl bei MLO5 für WTX 3' bei 0,48. Dieser Wert bezieht sich auf den männlichen Kontroll-Pool und das Referenzgen FAH. Ebenso wurden die Werte auf die männliche Kontrolle und das weitere Referenzgen NDST1 bezogen, die das Ergebnis bestätigten. Auch bei der Wiederholung zeigten diese vier Werte, dass die relative Kopienzahl im Vergleich nur

zur Hälfte vorhanden ist. Das Gleiche galt bei MLO5 für *WTX* 5', auch hier lagen die Ergebnisse bei circa der Hälfte der relativen Kopienzahl bezogen auf die Kontrollen.

3.5.4 qPCR-Ergebnisse von mikrodisezierten Proben

Um zu untersuchen, ob eine Deletion von *WTX* überall im Tumor oder nur in bestimmten Arealen vorliegt, wurde mikrodisezierte Tumor-DNA verwendet. Es lagen zwei Proben vor, aus denen durch Mikrodisektion DNA aus verschiedenen Regionen des Tumors gewonnen worden war. Die DNA war aus Formalin fixierten Paraffinschnitten isoliert worden (Dr. C. Duhme). Es lagen Anteile aus Stroma, Epithel, Muskel und Blastem vor (Tabelle 29).

Tabelle 29. Probenbezeichnung mit Zuordnung des Tumorbereichs.

Probe	Bereich des Tumors
LR-E1	Epithel Bereich 1
LR-E2	Epithel Bereich 2
LR-S1	Stroma
LR-B1	Blastem Bereich 1
LR-B2	Blastem Bereich 2
DT-E1	Epithel
DT-M1	Muskel Bereich 1
DT-M2	Muskel Bereich 2
DT-S1	Stroma Bereich 1
DT-S2	Stroma Bereich 2

Aufgrund der geringen Menge des Materials musste der Umfang der Analyse eingeschränkt werden. Es wurde *FAH* als einziges Referenzgen verwendet und es wurden nur Duplikate erstellt. Zudem konnte die qPCR nur ein einziges Mal durchgeführt werden.

Die Analyse der mikrodisezierten Proben gestaltete sich schwierig. Insgesamt konnten von den zehn analysierten Proben (Tabelle 29) nur zwei verwertet werden. Die übrigen Proben konnten aus verschiedenen Gründen nicht in die Analyse mit einbezogen werden: Zum einen Teil lagen Primerdimere vor, zum anderen Teil war das falsche Produkt amplifiziert worden. Bei einigen Proben fand keinerlei Amplifikation statt, auch nicht beim mitgeführten Referenzgen.

Bei LR waren mehrere Proben nicht auswertbar. LR-B1 fiel aus der Auswertung, da die Probe nicht amplifiziert werden konnte. Weder die Testgene noch das Referenzgen zeigten ein Produkt. Ebenso wies LR-E1 keine Amplifikation bei *WTX* 3' und 5' auf, nur bei *FAH* wurde eine Probe des Duplikats amplifiziert. Im Vergleich zu den Kontrollen war allerdings erkennbar, dass dies das falsche Produkt war (vermutlich handelt es sich hierbei um die Bildung von Primerdimeren, Abb. 20). Somit konnten die Werte nicht zur Auswertung verwendet werden.

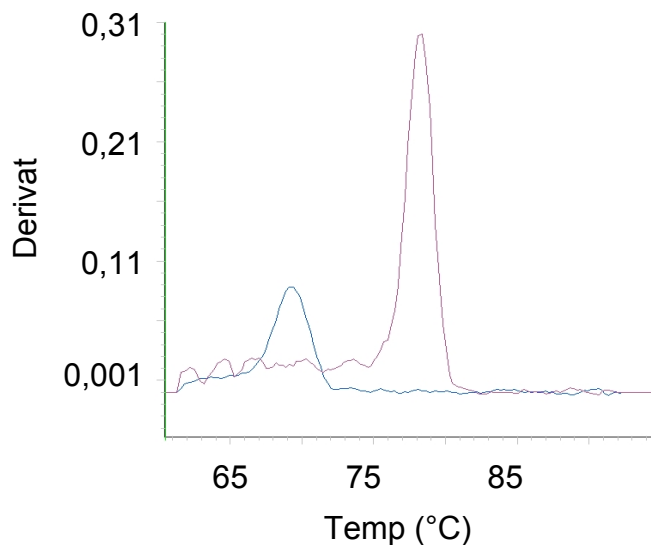


Abb. 20: Dissoziationskurve von *FAH*. qPCR. Schmelzprofile der Amplikons von LR-E1 und Kontrolle.
 — = LR-E1. — = Ko-Pool ♂

Ein ähnliches Bild zeigte sich bei LR-B2: Hier fanden sich in einer Probe des Duplikats in dem Referenzgen zwei verschiedene Peaks. Ein Peak lag bei ca. 69°C (ähnlich wie in Abb. 20), ein zweiter Peak lag bei ca. 77,5 °C. Bei dem ersten Peak könnte es sich ebenfalls um Primerdimere handeln. Der zweite Peak ist im Vergleich zum Peak der Kontrolle um ca. 0,5 °C verschoben. In den Testgenen zeigte sich nur in einer Probe eine Amplifikation in einem späten Zyklus. Da aber wie oben beschrieben das Referenzgen nicht verwertet werden konnte, wurde dieses Ergebnis nicht verwendet. Bei LR-E2 zeigte eine Probe des Duplikats bei *FAH* ein falsch amplifiziertes Produkt, die andere Probe hingegen war richtig amplifiziert worden. Daher wurde nur mit der letzteren Probe für das Ergebnis weitergerechnet. LR-E2 zeigte bei *WTX* 3' keine Amplifikation, hier könnte also eine Deletion vorliegen. Bei *WTX* 5' wurde eine der beiden Proben amplifiziert, jedoch in einem wesentlich späteren Zyklus als die Kontrollen. Das Schmelzprofil des amplifizierten Produkts ließ eine geringe

Abweichung im Vergleich mit der Kontrolle erkennen: Der Peak der Probe lag bei ca. 82,5°C, wohingegen die Peaks der Kontrollen bei ca. 83 °C lagen (Abb. 21).

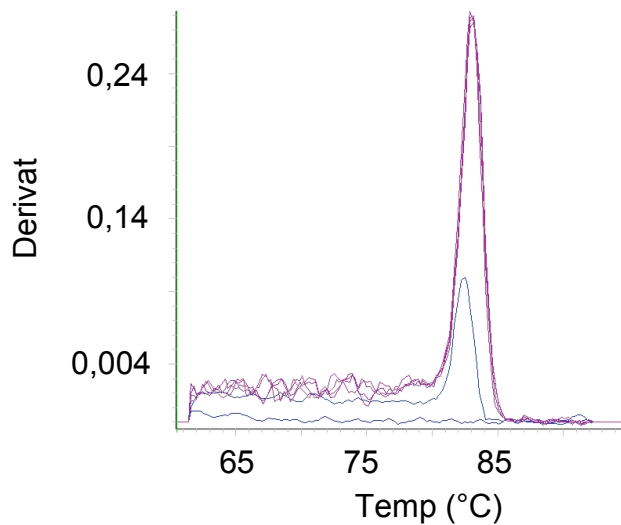


Abb. 21: Dissoziationskurve von WTX 5'. qPCR. Eine Probe des Duplikats von LR-E2 zeigte kein amplifiziertes Produkt, das Schmelzprofil der anderen Probe zeigte einen Peak bei ca. 82,5 °C. Die Peaks in der Schmelzkurve der Kontrollen lagen bei ca. 83 °C. — = LR-E2. — = Ko-Pool ♂ und Kontrollprobe ♂.

Um trotzdem eine Berechnung nach der $\Delta\Delta C_t$ -Methode durchzuführen, wurde der Unterschied im Schmelzprofil vernachlässigt. Zur Berechnung wurden für LR-E2 der Wert der amplifizierten Probe bei WTX 5' und das richtige amplifizierte Produkt bei FAH verwendet. Der FC-Wert bezogen auf den männlichen Kontrollpool lag bei 3,51 und der FC-Wert bezogen auf die männliche Kontrollprobe betrug 3,58. Somit implizierten die FC-Werte einen Zugewinn des Gens. Diese Berechnung stand im Gegensatz zum Amplifikationsplot. Der Amplifikationsplot zeigte, dass im Vergleich zu den Kontrollen die Amplifikation von WTX 5' bei LR-E2 wesentlich später stattfand. Dies weist auf eine Deletion hin.

LR-S1 zeigte in drei von den vier untersuchten Proben eine im Vergleich zu dem Referenzgen normale Amplifikation. Die FC-Werte lagen zwischen -1,11 und 1,21 jeweils in Bezug auf ein Referenzgen und den beiden Kontrollen. Die Probe, die keine Amplifikation zeigte, war eine Probe des Duplikats bei der Analyse von WTX 5'. Allerdings wies die Dissoziationskurve eines Duplikats des Referenzgens einen Doppelpeak auf. Vermutlich handelte es sich hierbei wieder um die Bildung von Primerdimeren, bzw. die Ausbildung des richtigen Produkts (ähnlich wie bei LR-B2, s. o.).

Die Untersuchung der mikrodisezierten Proben von DT ergab ähnliche Probleme: hier waren insgesamt vier Proben (DT-S1, -S2, -M1 und -M2) aufgrund der Bildung eines falschen Amplifikats nicht analysierbar. Die einzige verwertbare Probe war DT-E. Sie zeigte im Bezug auf das Referenzgen und bei beiden Kontrollen eine Deletion in *WTX* 5' und 3'.

3.5.5 qPCR-Ergebnisse zur Größenbestimmung der Deletion auf dem X-Chromosom

Um die Größe der Deletion näher zu bestimmen, wurden die Proben, die eine Deletion in *WTX* aufwiesen, weiter untersucht. Die Probe JUB fiel heraus, da nicht mehr genügend Material vorlag. Es wurden die Gene *PHEX* und *OCRL* verwendet (s. 2.2.3.4.2), wobei *PHEX* auf dem kurzen (Xp) und *OCRL* auf dem langen (Xq) Arm des X-Chromosoms zu finden ist. Auch diese Gene wurden wieder zusammen mit zwei Referenzgenen (*FAH* und *NDST1*, s.o.) und zwei Kontrollen analysiert.

Hier zeigten sich keine Auffälligkeiten, diese Regionen des X-Chromosoms schienen bei allen Proben vollständig vorzuliegen.

3.6 Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Die Reverse Transkription wurde mit dem Ziel durchgeführt um festzustellen, ob von der DNA in den Tumورproben auch tatsächlich ein Transkript synthetisiert wurde. Dies war in Bezug auf *WTX* besonders wichtig, weil in der menschlichen weiblichen Zelle immer eins der beiden X-Chromosomen (das Chromosom, auf dem das Gen *WTX* liegt) inaktiviert wird und als Barr-Körperchen vorliegt. Die Inaktivierung erfolgt normalerweise zufällig. Bei heterozygoten Mutationen, die bei weiblichen Patienten entdeckt wurden, konnte anhand der qPCR keine Aussage getroffen werden, ob sich die Mutation auf dem aktiven oder inaktiven X-Chromosom befindet und ob es somit zur Synthese eines *WTX*-Proteins führt.

Es wurden insgesamt fünf Tumورproben von weiblichen Patienten analysiert und zwei zusätzliche Wildtyp-Tumورproben als Kontrollen eingesetzt. Bei den RNA-Proben konnte auf vorhandenes Material des Instituts zurückgegriffen werden.

Bei den Kontrollen für die Expression von *WTX* handelte es sich um eine weibliche und eine männliche Tumورprobe, deren genomische DNA zuvor schon anhand von DHPLC, Sequenzierung und qPCR auf *WTX*-Aberrationen analysiert worden waren. Weder die männliche noch die weibliche Probe wies eine Deletion in *WTX* auf. In der

männlichen Probe zeigte sich auch keine *WTX*-Mutation, jedoch war in vorangegangenen Dissertationen (Uschkereit 2008; Busch 2010) eine *missense*-Mutation in *CTNNB1* (Thr41Ala) und eine *frameshift*-Mutation in *WT1* (Val431fsX87) festgestellt worden. Die genomische DNA der weiblichen Tumorable wies im *WTX* zwei Punktmutationen auf: 3057 A>G und 477 T>G. Des Weiteren gab es eine *missense*-Mutation in *CTNNB1* (Ser45Pro) und eine *nonsense*-Mutation in *WT1* (Ser50X).

Wie im Methodenteil beschrieben (s. 2.2.6), wurde die cDNA-Synthese an den insgesamt sieben Proben mit Hilfe des High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit von Applied Biosystems durchgeführt. Je Probe wurde die Synthese einmal mit der Reversen Transkriptase (+RT) und einmal ohne (-RT) durchgeführt, so dass für jede RNA anschließend eine -RT- und eine +RT-Probe vorlagen. Diese beiden Proben wurden nach entsprechender Konzentrierung in die qPCR eingesetzt. Da es sich um eine große Anzahl an Proben handelte, fand eine Analyse zunächst nur am 3'-Ende von *WTX* statt.

Die Analysen dieser Proben wiesen Probleme auf: Zum einen zeigten sich große Schwankungen innerhalb der Triplets (sowohl bei Patienten- als auch Kontroll-DNA), zum anderen waren auch bei den -RT-Proben Amplifikationen zu erkennen. Aufgrund der Verunreinigung der -RT-Proben sind diese Ergebnisse nicht verwertbar. Die Amplifikation der -RT-Proben startete im Vergleich zu den +RT-Proben erst in späten Zyklen (Abb. 22). Auch in der Dissoziationskurve zeigten sich die -RT-Proben in etwa an der gleichen Stelle wie das Ampikon in den +RT-Proben und es lagen keine Primerdimere vor. Dies weist möglicherweise darauf hin, dass keine Deletion vorliegt.

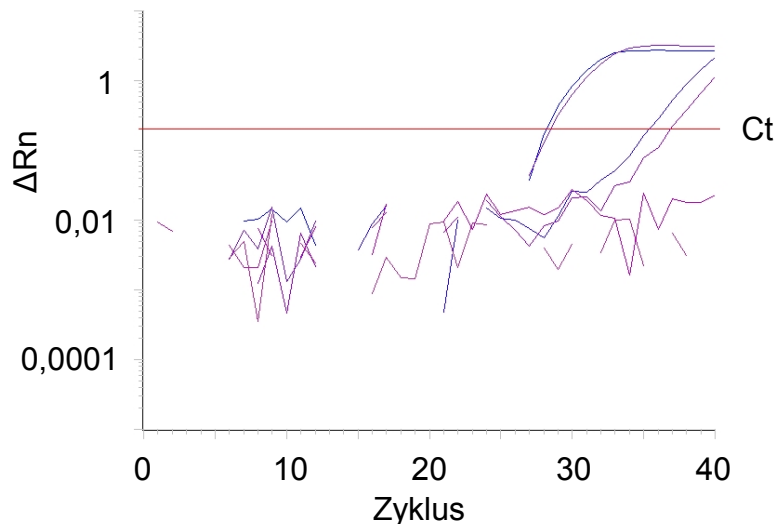


Abb. 22: Amplifikationsplot von *WTX* 3'. qPCR. +RT- und -RT-Proben. Die -RT-Proben (jeweils SE und Kontrolle) sind die beiden Kurven, die später den *cycle threshold* (Ct) überschreiten. - = SE. - = Kontrolle. - = Wasser. ΔRn = relative Fluoreszenz des Zyklus n in Bezug auf die Hintergrundfluoreszenz.

Ebenso zeigten sich Amplifikationen in den -RT-Proben der beiden Referenzgene *NDST1* und *FAH*, nicht jedoch in den Wasserkontrollen. Um das Ergebnis zu verifizieren wurden alle Proben in einer Gelelektrophorese (Abb. 23) analysiert.

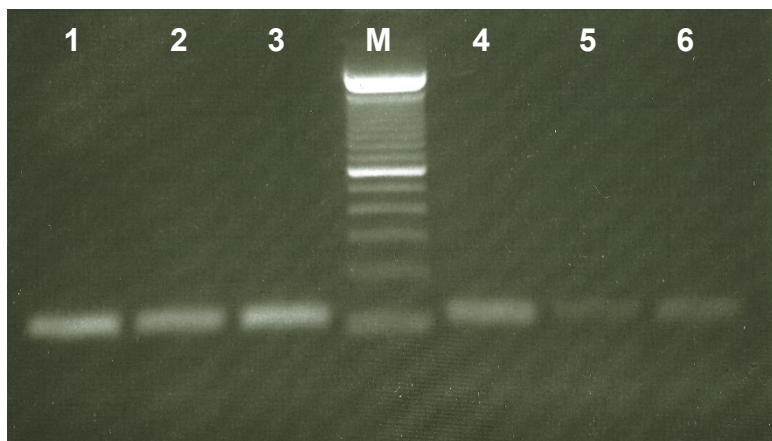


Abb. 23: *FAH*-qPCR-Proben. Gelelektrophorese. 1-3 = +RT-Proben (1 = SE, 2 = Ko1, 3 = Ko2); 4-6 = -RT-Proben (4 = SE, 5 = Ko1, 6 = Ko2).

Beispielhaft sieht man hier die PCR-Fragmente an der erwarteten Stelle (Produktlänge von *FAH* bei den verwendeten Primern entspricht 110 bp, s. 2.1.2.7), wobei keine Primerdimere vorlagen. Allerdings waren nicht nur bei den +RT-, sondern auch bei den -RT-Proben *FAH*-Amplifikate zu sehen. Die Wasserkontrolle zeigte kein PCR-Fragment (hier nicht gezeigt). Eine mögliche Erklärung wäre, dass die RNA-Proben

noch mit DNA verunreinigt waren. Da die Tumor-RNA verbraucht war, konnte diese Unstimmigkeit nicht weiter aufgeklärt werden.

4 Diskussion

4.1 Diskussion der Etablierung verschiedener Methoden zur *WTX*-Analyse

Das Ziel des ersten Teils dieser Arbeit lag darin, die Methoden zur *WTX*-Analyse zu etablieren. Als Erstes galt es das Gen zu amplifizieren. Dies erfolgte mit zuvor beschriebenen Primern (Rivera et al. 2007). Dennoch gelang eine Amplifikation nicht problemlos und mehrere Parameter mussten, wie in 2.2.3.2 beschrieben, umgestellt, angepasst oder verändert werden. Einen deutlichen Vorteil erbrachte die Umstellung auf die *Touchdown* (TD)-PCR (s. 2.2.3.3). Bei dieser Methode wird mit einer relativ hohen Temperatur begonnen, die möglichst knapp unterhalb der Denaturierungstemperatur liegt (Don et al. 1991). Somit binden die Primer spezifisch und bilden im Idealfall das gewünschte Amplifikat. Wird die Temperatur gesenkt, kann es auch zu unspezifischen Bindungen kommen. Die bereits vorhandenen und korrekt gebildeten Amplifikate verhindern aber eine übermäßige Amplifikation dieser unspezifischen Bindungen. Somit erhöht diese Methode ebenso die Sensitivität wie Spezifität und ist besonders hilfreich für schwierig zu amplifizierende Produkte (Korbie und Mattick 2008). Dies bestätigte sich auch für das *WTX*-Gen. Die Amplifikation war spezifischer (kein Auftreten von Nebenprodukten) und ließ sich sogar noch steigern. Zusätzlich führte das Zusammenlegen benachbarter Primer zur Amplifikation eines größeren Genabschnitts und damit zu einer höheren Durchlaufquote.

Nach der schließlich erfolgreichen Amplifikation folgte die DHPLC. Die Wahl fiel auf diese Methode, da sie sich gut als erstes Screening zur Mutationsanalyse eignet. Dies liegt zum einen an den niedrigen Kosten und zum anderen sowohl an der hohen Sensitivität als auch Spezifität (Xiao und Oefner 2001). Zu beachten war hierbei der Unterschied der männlichen und weiblichen *WTX*-Proben, da das Gen auf dem X-Chromosom liegt. Männliche Proben mussten mit einer Kontroll-DNA vermischt werden, um aberrante Proben zu detektieren, weibliche dagegen nicht. Nachteil dieser Methode war, dass weibliche homozygote Mutanten (im Gegensatz zu den heterozygoten, s. 2.2.4.1) somit nicht erkannt werden konnten. Hier hätten sich in der ungemischten Probe die komplementären Stränge wieder zueinander angelagert, so dass in der DHPLC nur Homoduplices und keine Aberrationen zu erkennen gewesen wären. Andererseits handelte es sich bei der Mehrzahl der Proben um Tumor-DNA, also DNA, die aus dem Tumor gewonnen wurde. Die Tumor-DNA war zumeist ein Gemisch aus verschiedenen Zellen. Dies lag zum einen an dem Tumor selbst (unter anderem bestehend aus Epithel-, Blastem- oder Mesenchymalzellen), zum anderen

an der Vermischung mit normaler DNA (z.B. noch vorhandene normale Nierenzellen oder Blutzellen, wie z.B. Leukozyten, im Tumor). Wie viele „normale“ Zellen in der Tumor-DNA vorlagen, wurde in dieser Arbeit nicht bestimmt. Es ist aber davon auszugehen, dass es keine reine Tumor-DNA war und somit die Chance besteht, dass auch weibliche homozygote Mutationen im Tumor aufgrund des Gemisches mit normaler DNA in der DHPLC zu erkennen gewesen wären.

Somit wären nur homozygote Keimbahnmutationen in weiblichen Patientenproben nicht erkennbar gewesen (zur Relevanz von Keimbahnmutationen s. 4.2).

Im letzten Schritt der Mutationsanalyse wurden die in der DHPLC gefundenen aberranten *WTX*-Proben nach Sanger sequenziert und damit sechs Mutationen bestätigt (s. 3.4).

Um Deletionen in *WTX* nachzuweisen, fanden zudem Untersuchungen an 26 Patienten statt (s. 3.5.2). Verschiedene Publikationen konnten nachweisen, dass Deletionen häufiger als Punktmutationen in *WTX* vorkamen (Rivera et al. 2007; Fukuzawa et al. 2009; Wegert et al. 2009). Die Methode der Wahl war hierfür die qPCR, da sie sich vor allem bei der Analyse von Mikrodeletionen bewährt hat (Weksberg et al. 2005). Ebenfalls war an dieser Stelle die Verwendung bereits veröffentlichter Primer (Rivera et al. 2007) möglich. Mit diesen Primern hatten auch andere Forschergruppen Deletionen von *WTX* bei WT-Proben nachweisen können (Gadd et al. 2012; Ruteshouser et al. 2008). Die Primer unterliefen, wie empfohlen (Weksberg et al. 2005), einer Optimierung. Im Gegensatz zu der Publikation von Rivera et al. (2007) fiel die Entscheidung auf die bei Ruteshouser et al. (2008) beschriebenen Referenzgene *FAH* und *NDST1* (anstatt *Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase*, *GAPDH*). Diese beiden Gene lagen auf den Chromosomen 5 und 15, die in WT keine häufigen Deletionen aufwiesen. In den gleichen Untersuchungen wurde gezeigt, dass im Gegensatz dazu die Trisomie 12 die am häufigsten vorkommende Trisomie in WT ist (Kaneko et al. 1991; Wang-Wuu et al. 1990). *GAPDH*, das Rivera et al. (2007) als Referenzgen benutzt hatten, liegt auf diesem Chromosom 12. Wäre also *GAPDH* als Referenzgen verwendet worden, hätte das Vorliegen einer Trisomie 12 in einer der WT-Proben zu verfälschten Ergebnissen führen können.

Insgesamt gestaltete sich die qPCR-Analyse genomischer Tumor-DNA problemlos und sechs Proben (von 26 Patienten) zeigten eine *WTX*-Deletion. In der Mehrzahl der Fälle (fünf von sechs) befand sich die Deletion sowohl am 5'- als auch am 3'-Ende des *WTX*. Nur die Probe NJ wies lediglich eine *WTX* 5'-Deletion auf (bei kompletten

Vorliegen von *WTX* 3', s. 3.5.2, Tabelle 26). Rivera et al. (2007) hatten zunächst zufällig bei der Untersuchung von WT die *WTX*-Deletionen im *array comparative genomic hybridization* (array CGH) entdeckt. Array CGH ist eine molekularzytogenetische Methode, um Verluste oder Zugewinne von Genen zu analysieren. Mit den oben genannten Primern konnten Rivera et al. (2007) die *WTX*-Deletionen in einer qPCR bestätigen. In Übereinstimmung mit der vorliegenden Arbeit zeigten sie, dass in den meisten Proben (drei von fünf) Deletionen beider Regionen auftraten und somit vermutlich das gesamte Gen betroffen war. Die beiden übrigen waren bei Rivera et al. (2007) trotzdem mit den Primern am 5'- und 3'-Ende aufzufinden, da die Deletion mindestens je eine der Regionen umfasste. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass *WTX*-Deletionen mit den Primern gut nachzuweisen sind. Ein Nachteil ist allerdings, dass sich bei unauffälligen Proben keine Aussage über kleinere Deletionen innerhalb des Gens machen lässt.

Abschließend sollte differenziert werden, ob die Deletionen in *WTX* einen größeren Bereich als nur dieses Gen umfassten. In seltenen Fällen ließ sich beobachten, dass in WT das gesamte X-Chromosom fehlte (Wang-Wuu et al. 1990). In der vorliegenden Arbeit konnte bei keiner der fünf analysierten Proben eine zusätzliche Deletion in *PHEX* (auf Xp) oder *OCRL* (auf Xq) detektiert werden (s. 3.5.5). Dagegen stellte Ruteshouser et al. (2008) bei vier weiblichen Proben (von 16 *WTX*-deletierten) eine Deletion beider Gene (*OCRL* und *PHEX*) auf jeweils einem der beiden X-Chromosomen fest. Es fehlte also vermutlich ein komplettes X-Chromosom. Ruteshouser et al. bewiesen allerdings mittels *WTX*-Expressions-Analyse, dass in diesen Fällen die Zellen *WTX* sehr wohl exprimierten und somit die Deletionen nur das jeweils inaktive X-Chromosom betrafen. Dass dennoch häufig nicht nur *WTX* selbst, sondern auch Nebenregionen des *WTX* bei Deletionen betroffen waren, belegten Wegert et al. (2009). Sie suchten nach Deletionen in der direkt benachbarten Region zu *WTX* und fanden sie bei ca. der Hälfte der *WTX*-deletierten Proben (17 von 35, mindestens eine benachbarte Region zu *WTX* deletiert). Nur zwei Proben zeigten dabei eine Deletion aller der fünf untersuchten benachbarten Gene. Ob in diesen beiden Fällen das gesamte X-Chromosom deletiert war, wurde nicht weiter bestimmt. Die Ergebnisse von Wegert et al. (2009) belegen, dass es sich in fast der Hälfte der Fälle um eine größere Deletion als nur *WTX* handelt. Es wäre für weitere Untersuchungen empfehlenswert, die direkt benachbarten Regionen in die Deletionssuche mit einzubeziehen.

Ein weiteres Ziel der Arbeit war es zu bestimmen, ob *WTX*-Deletionen im gesamten oder nur in verschiedenen Teilen des WT vorliegen. Diesem Zweck dienten mikrodisektierte Proben. Es wurden zwei unterschiedliche Proben eingesetzt: Die eine Probe stammte von einem Patienten (DT), dessen Tumor-DNA in der qPCR eine Deletion von *WTX* 3' und 5' aufwies (s. 3.5.2). Die andere Probe (LR) war in der qPCR-Analyse unauffällig (Ergebnis nicht gezeigt). Dass eine qPCR aus mikrodisektiertem Material grundsätzlich möglich ist, bestätigten u.a. Lehmann et al. (2000). Die Qualität ist dabei aber abhängig von der Art der Färbung und dem zugrundeliegenden Gewebe. Vor allem Hämatoxylin-gefärbtes und per Hand mikrodisektiertes Gewebe hatte eine wesentlich geringere oder sogar gar keine Amplifikationsrate (Ehrig et al. 2001). Dies scheint auch für die in dieser Arbeit analysierten Proben zuzutreffen. Alle Proben waren von Hand mikrodisektierte Proben aus Paraffinschnitten, die mit Hämatoxylin gefärbt waren. Von diesen insgesamt zehn Proben waren lediglich zwei Proben überhaupt verwertbar (s. 3.5.4). Die anderen Proben wiesen entweder gar keine oder eine sehr niedrige Amplifikationsrate auf. Bei den niedrigen Amplifikationsraten zeigten sich gehäuft Primerdimere und die Bildung von falschen Produkten.

Da bei DT in der Tumor-DNA eine Deletion vorlag, war die fehlende Amplifikationsrate in *WTX* 3' und 5' nicht überraschend. Dass es sich trotzdem eher um ein Problem der Probe handelte, zeigte die ebenfalls überwiegend ausbleibende Amplifikationsrate bei dem Referenzgen *FAH*. Die in dem Versuch mitgeführten genomischen Kontrollen aus Blut-DNA wiesen diese Schwierigkeiten nicht auf, so dass ein Fehler im Versuch selbst auszuschließen ist.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass per Hand mikrodisektierte und Hämatoxylin-gefärbte Proben aus Paraffinschnitten eher nicht zur qPCR-Analyse geeignet sind. Die Frage der Verteilung von *WTX*-Deletionen im Tumorgewebe ließ sich somit nicht abschließend klären. Wegert et al. (2009) kontrollierten das Vorliegen von aufgetretenen Punktmutationen in unterschiedlichen Tumorregionen. Sie entnahmen verschiedene Zelltypen aus Gefrierschnitten mittels lasergestützter Mikrodisektion. Ein Unterschied zur vorliegenden Arbeit bestand darin, dass aus dem mikrodisektiertem Material keine qPCR, sondern eine Mutationsanalyse durchgeführt wurde. Die Punktmutationen in *WTX* waren sehr heterogen über die verschiedenen Zelltypen verteilt (Vorliegen des Wildtyps oder einer homozygoten Mutation) und nicht von der Zellhistologie abhängig. Wegert et al. (2009) schlossen eine Kontamination durch normales Zellgewebe durch den homogenen Nachweis einer tumorspezifischen Mutation aus.

Ein weiterer Unterschied zwischen Wegert et al. und der vorliegenden Arbeit lag in dem verwendeten Material. Wegert et al. benutzten Gefrierschnitte, in dieser Arbeit standen dagegen Paraffinschnitte zur Verfügung. Es ist bekannt, dass die DNA, die aus gefrorenem Tumormaterial isoliert wird, sich besser für molekulargenetische Analysen eignet als DNA aus Formalin fixiertem und in Paraffin eingebetteten Gewebe. Um die Relevanz der Abwesenheit des Proteins WTX durch *WTX*-Deletion für die Zellen einschätzen zu können, wurde getestet, ob die Zellen WTX überhaupt exprimieren. Zu diesem Zweck sollte eine Überprüfung unterschiedlicher Tumorproben mittels Western Blot stattfinden.

Der dafür eingesetzte Antikörper gegen WTX wurde uns freundlicherweise von K. Tanneberger, Universität Erlangen, zur Verfügung gestellt. Es handelte sich um einen selbst hergestellten Kaninchen-Antikörper. Allerdings zeigte sich, dass dieser keine klaren Ergebnisse brachte und das WTX-Protein nicht eindeutig nachgewiesen werden konnte. Deshalb wurden keine weiteren Analysen damit durchgeführt und die Ergebnisse hier nicht dargestellt.

Eine weitere Untersuchung zur WTX-Expression und zur Überprüfung, ob bei den Patientinnen mit *WTX*-Deletion das aktive X-Chromosom betroffen war, war die qPCR aus cDNA. Das Ergebnis des Versuchs ließ keine Auswertung zu, da auch die –RT-Proben eine Amplifikation aufwiesen (s. 3.6). Ursache hierfür war vermutlich eine Verunreinigung der RNA-Probe mit DNA. Eine Behandlung der RNA-Proben mit DNase war aufgrund der geringen Mengen an Tumor-RNA aber nicht möglich. Die mitgeführte negative Wasserprobe schließt eine Verunreinigung der kompletten qPCR aus.

4.2 Diskussion der gefundenen *WTX*-Mutationen

In dieser Arbeit war *WTX* bei 22,9% der untersuchten Proben mutiert. Dieses Ergebnis liegt unterhalb des Prozentsatzes der Erstpublikation von Rivera et al. (2007), aber ungefähr gleich hoch wie bei späteren Veröffentlichungen (18,4 – 22%, Ruteshouser et al. 2008; Fukuzawa et al. 2009).

Prozentual gesehen waren in der vorliegenden Arbeit 33,3% der weiblichen Proben von einer *WTX*-Mutationen betroffen (5 von 15 untersuchten Proben) und nur 18,2% der männlichen Proben (6 von 33). Die bisherigen Publikationen zeigen hier unterschiedliche Ergebnisse: zum Teil gleich viele Mutationen bei beiden Geschlechtern (Rivera et al. 2007), mehr Mutationen bei den männlichen Proben (20,9

vs. 15,5%, Ruteshouser et al. 2008) oder mehr bei den weiblichen (22 vs. 16%, Cardoso et al. 2012). Die Ergebnisse dieser Arbeit bestärken zwar die Ergebnisse von Cardoso et al. (2012), allerdings können sie aufgrund der geringen Probenanzahl nicht als eindeutiger Beleg gewertet werden. Bis zum jetzigen Zeitpunkt bleibt somit die Verteilung der *WTX*-Aberrationen zwischen den Geschlechtern unklar. Es macht deutlich, dass größere Fallstudien zur genaueren Bestimmung nötig sind.

Bei den gefundenen Aberrationen in *WTX* handelte es sich zum einen um Deletionen, zum anderen um Punktmutationen. Die Anzahl der Deletionen überwog: Es fanden sich bei sechs von 26 untersuchten Patientenproben (23,1%) eine Deletion. Dagegen zeigten sich nur bei fünf von 48 untersuchten Patientenproben Punktmutationen (10,4%). Dies ist in der Tendenz übereinstimmend mit anderen Publikationen: Bei Rivera et al. (2007) waren es 21,6% Deletionen (11 von 51) und 12,2% Punktmutationen (10 von 82), bei Wegert et al. (2009) 17,0% Deletionen (68 von 399) und 6,7% Punktmutationen (7 von 104).

Initial wurde postuliert, dass Mutationen in *WTX* nicht zusammen mit Mutationen in *CTNNB1* oder *WT1* auftreten (Rivera et al. 2007). Dies zeigten die ersten Untersuchungen und wurde dadurch erklärt, dass beide Gene (*WTX* und *WT1*) den WNT-Signalweg beeinflussten (Perotti et al. 2008). Ergebnisse von Ruteshouser (2008) und Cardoso et al. (2012) widerlegten dies, da hier Mutationen in allen drei Genen zusammen auftraten. Auch die Resultate dieser Arbeit stimmen damit überein und bestätigen diese Beobachtungen: Bei den elf gefundenen *WTX*-Mutationen existierten bei vier Proben gleichzeitig eine *WT1*- und *CTNNB1*-Mutation. Eine der Proben ist nicht auf Mutationen in den beiden anderen Genen getestet worden, da es sich um eine gesunde Kontrollprobe handelte. Somit lag bei 40% (4 von 10) der analysierten Proben mit *WTX*-Mutationen auch eine *WT1*- und *CTNNB1*-Mutation vor. Dies entspricht der Anzahl bei Ruteshouser (39,1%, 2008), ist aber höher als bei Cardoso et al. (25%, 2012). Allerdings gibt es bei Ruteshouser et al. (2008) wie auch in dieser Arbeit ein ausgesuchtes und kein zufälliges Patientenkollektiv. Ruteshouser et al. (2008) untersuchten vermehrt WT mit *WT1*-Mutation. Ihr Ziel war die Klärung der Frage, ob die drei Mutationen zusammen auftreten (*WTX*, *CTNNB1*, *WT1*). In der vorliegenden Arbeit wurden zu Beginn nur WT ohne weitere entdeckten Mutationen ausgesucht, da man zunächst davon ausging, dass die Mutationen nicht zusammen auftreten könnten. Erst nach den oben genannten Publikationen, die während der Durchführung dieser Arbeit entstanden, wurde die Analyse auf Tumore mit *WT1*-/*CTNNB1*-Mutationen ausgeweitet. Cardoso et al. (2012) gaben keine Erklärung zur

Selektion ihrer Patientengruppe an. Um die Häufigkeit des gleichzeitigen Auftretens der verschiedenen Mutationen in *WTX*, *WT1* und *CTNNB1* zu klären, wäre eine prospektive Studie mit großem Patientenkollektiv notwendig.

Die Tumorproben dieser Arbeit waren zuvor nur auf *CTNNB1*-Mutationen im Exon 3 untersucht worden. Vorherige Publikationen fanden eine höhere Assoziation zwischen *WTX*-Mutationen und *CTNNB1*-Mutationen im Exon 7, bzw. 8 als im Exon 3 (Fukuzawa et al. 2009; Gadd et al. 2012). Fukuzawa et al. (2009) vermuteten, dass *CTNNB1*-Mutationen im Exon 7 oder 8 das β -Catenin nicht ausreichend stabilisieren könnten (im Gegensatz zu Mutationen im Exon 3) und zur Tumorbildung zusätzlich den Verlust von *WTX* benötigen. Unterstützend zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ist die Publikation von Ruteshouser et al. (2008) zu nennen. Wie bereits oben erwähnt, untersuchten sie WT auf *WTX*-, *WT1*- und *CTNNB1*-Mutationen. Bei *CTNNB1* wurden nur die Exone 3, 7 und 8 analysiert. Die *WTX*-Mutanten, die auch eine *CTNNB1*-Mutation aufwiesen, zeigten diese zu gleichen Teilen in den Exonen 3 und 8. Zu einer genaueren Aussagefähigkeit der Assoziationen zwischen *WTX*- und *CTNNB1*-Mutationen sind also auch hier noch weitere Untersuchungen notwendig.

Werden die Ergebnisse nach den Mutationen in *WT1/CTNNB1* sortiert, fällt auf, dass in dieser Mutationsgruppe prozentual mehr *WTX*-Mutationen vorhanden sind (30,8 vs. 20%, Tabelle 30, Spalte 4).

Tabelle 30. Ergebnisse sortiert nach *WT1/CTNNB1*-Mutationen.

Probe	WT ohne <i>WTX</i> -Mut.	WT mit <i>WTX</i> -Mut.	<i>WTX</i> -Anteil
Wildtyp	35	7	20%
männlich	21	3	14,3%
weiblich	14	4	28,6%
<i>WT1/CTNNB1</i> -Mut.	13	4	30,8%
männlich	12	3	25%
weiblich	1	1	100%

Zeile 2: totale Anzahl der WT mit Wildtyp (ohne Mutation in *WT1* oder *CTNNB1*) . Zeile 3 und 4: Wildtyp-Proben nach Geschlecht aufgeteilt. Zeile 5: totale Anzahl der WT mit *WT1/CTNNB1*-Mutation. Zeile 6 und 7: *WT1/CTNNB1*-Mutationsproben nach Geschlecht aufgeteilt. Spalte 4 = Anteil der *WTX*-Mutanten in dem jeweiligen Kollektiv. Mut. = Mutation.

Bei der Geschlechterverteilung überwogen wie auch insgesamt die *WTX*-Mutationen bei den weiblichen Proben. Kontrovers dazu stehen die Ergebnisse von Ruteshouser et al. (2008), die in der Wildtypgruppe (WT ohne Mutation in *WT1* oder *CTNNB1*)

signifikant mehr *WTX*-Mutationen bei den männlichen Proben fanden. Jedoch ist bei den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit zu beachten, dass es sich um eine geringe Fallzahl handelt. Bei den weiblichen Proben lag nur eine einzige Probe mit einer Mutation in *WT1* und *CTNNB1* vor. Bei der generellen Verteilung von *WTX*-Mutationen in den beiden Gruppen kamen Ruteshouser et al. (2008) zu einem ähnlichen Ergebnis wie bei dieser Arbeit: Auch hier überwog die Rate der *WTX*-Mutationen in der *WT1*-/*CTNNB1*-Mutationsgruppe (20 vs. 17,5% *WTX*-Mutationen in der Wildtypgruppe).

Die Gruppe der Patientenproben, in denen Mutationen in *WTX* zu finden waren, war sehr unterschiedlich im Hinblick auf Tumorstadium, Lateralität und Histologie (s. 3.1, Tabelle 22). Zwei der WT mit *WTX*-Mutation waren bilateral, der Rest lag unilateral vor. Die Anzahl der stromareichen Tumore dominierte (fünf). Triphasische kamen nur zweimal und blastemreiche Tumore nur einmal vor. Zwei zeigten nach einer chemotherapeutischen Vorbehandlung einen regressiven Tumor. Die Stadien reichten von I (drei WT) bis V (zwei WT). Stadium III war allerdings überhaupt nicht zu finden, welches bei Ruteshouser et al. (2008) bei *WTX*-Mutanten leicht gehäuft vorlag. Statistische Analysen konnten jedoch keine Signifikanz nachweisen. Das Diagnosealter (DA) der Patienten in der vorliegenden Arbeit reichte von drei bis 155 Monaten und lag im Mittel bei 40,1 Monaten (entsprechend 3,34 Jahren). Das liegt nur ca. zwei Monate oberhalb des mittleren Diagnosealters für WT laut Kinderkrebsregister 2013/14 in Deutschland (Kaatsch und Spix 2014) und entspricht genau dem von Ruteshouser et al. (2008, mittleres DA bei *WTX*-Mutanten = 40 Monate). Sie konnten aber auch hier keine statistisch signifikante Korrelation zwischen *WTX*-Mutation und DA feststellen. Genauso konnten Wegert et al. (2009) und Wang et al. (2012) keine Korrelation zwischen klinischen Daten und *WTX*-Mutanten belegen. Somit bleibt die klinische Relevanz der *WTX*-Mutationen bisher unklar.

In der Mutationsanalyse der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt sechs Punktmutationen entdeckt (s. 3.4, Tabelle 25). Davon waren vier bereits beschrieben und zwei bisher nicht veröffentlicht. Keine dieser Mutationen lag innerhalb der Region des alternativen Spleißens. Das bedeutet, dass diese Mutationen bei beiden Isoformen des *WTX* vorkommen und theoretisch einen Einfluss auf die Funktion haben könnten.

Zu den bereits häufiger beschriebenen Mutationen gehört die stille Mutation Gln1019Gln (Rivera et al. 2007; Cardoso et al. 2012; Fukuzawa et al. 2009). Der Basenaustausch hat keine Auswirkung auf die codierende Aminosäure, so dass die

Zelle das Protein WTX ohne Abweichung synthetisieren kann. Es handelt sich bei dieser Mutation um einen bekannten *single nucleotide polymorphism* (SNP). Das ist eine Genvariation, wobei ein einzelnes Basenpaar in der DNA verändert ist. Dieses neue Basenpaar im Triplet codiert aber weiterhin für die gleiche Aminosäure und ist somit auf Proteinbasis nicht als Mutation zu erkennen. SNP's treten typischerweise bei mehreren Personen in einer Population auf. Die Mutation Gln1019Gln ist im 1000-Genome-Projekt als SNP enthalten (*reference SNP identification number* (ref SNP ID): rs61730681). Das 1000-Genome-Projekt ist ein Projekt, das mittlerweile bis zu 2500 humane Genome analysiert hat, unter anderem um zu untersuchen, wie häufig SNP vorkommen (Durbin et al. 2010). Die oben beschriebene Mutation kommt laut dieser Studie bei 23% der Menschen in den untersuchten Bevölkerungsgruppen vor.

Die Patientin mit der oben genannten stillen Mutation hatte noch eine weitere Mutation: Phe159Leu. Diese *missense*-Mutation wurde mehrmals von verschiedenen Arbeitsgruppen entdeckt (Owen et al. 2008; Rivera et al. 2007; Pode-Shakked et al. 2011; Wegert et al. 2009) und gleichermaßen im 1000-Genome-Projekt als SNP beschrieben (ref SNP ID: rs34677493). Hier ist die Allel-Häufigkeit in den untersuchten Bevölkerungen mit 11,67% angegeben. Am höchsten ist sie in einer kenianischen Bevölkerungsgruppe, wo sogar der Anteil des varianten Allels überwiegt (52,08%). Auch in den Publikationen zeigte die Mutation eher keine Pathogenität. Bei Rivera et al. (2007) wiesen neun von 82 untersuchten Tumorproben die Mutation auf (10,98%). Außerdem konnte diese Mutation bei anderen onkologischen Erkrankungen gefunden werden. Zum einen bei der akuten myeloischen Leukämie (2 Patienten, Owen et al. 2008) und zum anderen bei einem Hepatoblastom (Akhavanfard et al. 2014).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass beide Mutationen, Gln1019Gln und Phe159Leu, eher nicht ursächlich für die Entstehung des WT sind. Die weibliche Tumorprobe mit diesen beiden Mutationen stammte von einem bilateralen, stromareichen WT (s. 3.1, Tabelle 22). Die Bilateralität, das frühe Diagnosealter der Patientin (12 Monate; mittleres DA = 3 Jahre und 2 Monate, s.o.) und das Auftreten eines Rezidivs lässt auf eine erbliche Form der Tumorentstehung schließen. Neben den nachgewiesenen *WTX*-Mutationen hatte die Patientin zudem noch je eine Mutation in *WT1* (Ser50X) und *CTNNB1* (Ser45Pro). Bei der *WT1*-Mutation handelte es sich um eine Keimbahnmutation, die in diesem Fall vermutlich entscheidend für die Entstehung des WT ist. Inwieweit die beiden anderen Mutationen (*WTX* und *CTNNB1*) eine Rolle spielen, lässt sich nicht abschließend sagen.

Eine weitere entdeckte *missense*-Mutation in einer Tumorprobe war Pro884Leu. In Zusammenhang mit WT wurde sie, soweit bekannt, bisher nur noch von Perotti et al. (2008) beschrieben. Sie fanden diese als heterozygote Keimbahnmutation bei einer WT-Patientin, aber auch bei einer gesunden Kontrolle (eine von insgesamt 250 untersuchten Kontrollen). Bei der näheren Analyse zur Pathogenität der Mutation konnte im WT der betroffenen Patientin nur das Wildtyp-Allel nachgewiesen werden. Dies ließ die Autoren schlussfolgern, dass die Mutation Pro884Leu eher nicht ursächlich an der Entstehung des WT beteiligt sei. Ob es sich bei der Mutation in der vorliegenden Arbeit ebenfalls um eine Keimbahnmutation handelt, konnte bei fehlender Blutprobe leider nicht überprüft werden.

Die Mutation Pro884Leu findet sich auch im 1000-Genome-Projekt (rs201092215). Im Gegensatz zu der oben beschriebenen Mutation liegt sie allerdings nur bei einer von 1654 untersuchten Personen vor (0,06%). Diese untersuchte Person ist weiblich und gehört zur afroamerikanischen Population aus dem Südwesten der USA. Die Mutation bei der betroffenen Person ist heterozygot. In dem 1000-Genome-Projekt liegen die Proben anonymisiert vor und es gibt keine dazugehörigen medizinischen oder phänotypischen Daten. Somit ist unbekannt, ob es bei der betroffenen Person einen Bezug zu WT gibt. Allerdings ist die Inzidenz der WT in der afroamerikanischen und afrikanischen Bevölkerungsgruppe am höchsten (Grovas et al. 1997; Stiller und Parkin 1996).

Insgesamt liegt die Mutation also, soweit bekannt, bei vier verschiedenen Personen vor: einer gesunden Kontrollperson, zwei an WT erkrankten Personen und einer Person, die aus einer Bevölkerungsgruppe stammt, in der die Inzidenz von WT erhöht ist. Bei den zwei an WT erkrankten Personen war die Mutation allerdings bei einer Person als Keimbahnmutation und nicht im Tumor, und nur bei einer einzigen Person in der Tumorprobe nachweisbar. Eine alleinige Pathogenität der Mutation scheint also eher unwahrscheinlich. Ein Zusammenhang zwischen dieser Mutation und dem Auftreten von WT ist allerdings nicht auszuschließen. Hier sind noch weitere Untersuchungen zu möglichen Kofaktoren, bzw. zur Bestimmung einer vorliegenden Prädisposition dieser Mutation zur Bildung eines WT notwendig.

Ebenfalls bereits häufiger beschrieben ist die Stoppmutation Arg358X (Rivera et al. 2007; Corbin et al. 2009; Fukuzawa et al. 2009; Wang et al. 2012; Scott et al. 2012). Durch den Translationsabbruch kann WTX nicht vollständig synthetisiert werden,

wodurch es vermutlich zu einem Funktionsverlust kommt. Die Pathogenität dieser Mutation erscheint daher wahrscheinlich.

Diese Stoppmutation kommt aber nicht nur bei WT, sondern auch gehäuft als Keimbahnmutation bei Patienten mit Osteopathia striata mit kranialer Sklerose (OSCS) vor (Jenkins et al. 2008; Perdu et al. 2010). Perdu et al. (2010) werteten sie in dieser Patientengruppe als *Hotspot*-Mutation. Ob diese Keimbahnmutation in Zusammenhang mit WT steht, bleibt bis zum jetzigen Zeitpunkt unklar. Bei keinem der betroffenen OSCS-Patienten konnte bisher ein WT nachgewiesen werden. Eine mögliche Erklärung dafür wäre eine bevorzugte X-Inaktivierung des mutierten Allels, was allerdings in einer Untersuchung von Jenkins et al. ausgeschlossen werden konnte. Dahingegen entdeckten Fukuzawa et al. (2010) bei einer obduzierten Niere eines früh verstorbenen Jungen mit OSCS multiple Foci von perilobären nephrogenen Resten (PLNR). In der Familie des Jungen gab es mehrere Fälle von OSCS und es wurde eine *WTX*-Keimbahnmutation (Gly290fs+33X) gefunden, die zu einer Stoppmutation führt. Da aus PLNR selbst nur selten WT entstehen, postulieren Fukuzawa et al. (2010), dass *WTX*-Keimbahnmutationen eher zur Entwicklung von PLNR prädisponieren und nicht automatisch zur Entwicklung eines WT.

Eine, soweit bekannt, noch nicht im Zusammenhang mit WT publizierte *missense*-Mutation ist Arg491His. Beschrieben wird sie allerdings im 1000-Genome-Projekt (rs370645786). Die Daten zu dieser Mutation stammen aus einem weiteren Projekt, dem GO-ESP (NHLBI GO Exome Sequencing Project (ESP)). Hier wurde die Mutation nur bei einer Person aus einer europäisch-amerikanischen Bevölkerungsgruppe gefunden (0,00947%). Auch hier liegen die Daten wieder anonymisiert vor, so dass nicht bekannt ist, ob es in der Familien- oder Eigenanamnese der Testperson WT gibt. Die Mutation führt zu einem Aminosäureaustausch von Arginin zu Histidin an Position 491 und liegt in einer Adenomatous-polyposis-coli (APC)-bindenden Region (Grohmann et al. 2007). APC selbst ist ein negativer Regulator des Wnt-Signalwegs (Polakis 2000). Aufgrund dieser Funktion ist APC ein bekannter Tumorsuppressor, der v.a. bei kolorektalen Karzinomen (Friedrich und Kullman 2003), aber auch bei weiteren Karzinomen (Hamilton et al. 1995) Mutationen aufweist. Es ist wahrscheinlich, dass eine gestörte Bindung zwischen den Proteinen APC und *WTX* aufgrund einer Mutation den β -Catenin-Destruktionskomplex (Major et al. 2007) beeinflusst. Bei der ausbleibenden Degradation von β -Catenin kann dieses im Zellkern

Transkriptionsfaktoren aktivieren (Nusse 2007) und damit die Entstehung von Tumoren beeinflussen (Behrens und Lustig 2004).

Ob die Bindung zwischen APC und WTX tatsächlich durch die Mutation von Arginin zu Histidin so gestört ist, dass es zu einem Ausbleiben der Bildung des β -Catenin-Destruktionskomplexes kommt, bleibt offen. Arginin und Histidin gehören zur gleichen Aminosäuregruppe. Sie sind beide basisch und haben einen positiv geladenen Seitenrest. Aufgrund der ähnlichen chemischen Eigenschaften könnte es sein, dass sie sich in der Bindung zwischen WTX und APC ähnlich verhalten und somit wenig Einfluss hätten.

Die Patientin mit der oben genannten *WTX*-Mutation weist keine weiteren Mutationen in *WT1* oder *CTNNB1* auf (s. 3.1, Tabelle 22). Mit 155 Monaten (13. Lebensjahr) liegt das Diagnosealter der Patientin wesentlich höher als das mittlere Diagnosealter von drei Jahren und einem Monat (Kaatsch und Spix 2014). Trotzdem ist auch in dieser Altersgruppe der WT der am häufigsten auftretende Nierentumor (Furtwängler et al. 2005). Abschließend lässt sich sagen, dass bei unserer Patientin die Mutation Arg491His eher pathogen zu sein scheint. Der genaue Einfluss der Mutation bedarf jedoch weiterer Untersuchungen.

Ebenfalls, soweit bekannt, bisher nicht beschrieben, ist die gefundene *missense*-Mutation Ala264Thr. In der vorliegenden Arbeit ist dies der einzige Mutationsnachweis aus einer Blutprobe. Daher handelt es sich um eine Keimbahnmutation.

Auch diese Mutation ist unter rs150929706 im 1000-Genome-Projekt aufgelistet. Die Mutation wurde bei einer weiblichen Person einer japanischen Bevölkerungsgruppe aus Tokyo festgestellt (0,06%) und es handelt sich um eine heterozygote Mutation. Auch die Person in dieser Arbeit mit dieser Mutation ist weiblich und die Mutation ist heterozygot. Es handelte sich um eine Kontrollperson, bei der die Mutation zufällig festgestellt wurde. In der Eigen- sowie Familienanamnese liegen keine WT vor. Auch wenn für die japanische Person keine weiteren Daten existieren und somit ein Bezug zu WT nicht auszuschließen ist, konnte im Umkehrschluss diese Mutation bisher noch nicht bei einem WT-Patienten nachgewiesen werden (soweit bekannt und publiziert). Ein Zusammenhang zwischen dieser Mutation und der Entstehung von WT ist somit fraglich.

Einer der auf *WTX*-Deletionen untersuchten Patienten wies initial rechts einen WT und links einen ILNR sowie nach zwei Jahren bilaterale Rezidive auf (MLO, s. 3.5.3,

Tabelle 27). Es konnte auf vorbereitete sowie bereits auf *WT1*- und *CTNNB1*-Mutationen kontrollierte DNA (Uschkereit 2008) aus den verschiedenen Tumorstadien zurückgegriffen werden. Anhand dieses Patienten sollte überprüft werden, ob sich *WTX*-Mutationen im Tumor in den verschiedenen Stadien verändern. Das Ergebnis zeigte nur bei einer Probe eine etwa halbierte Kopienzahl in *WTX* 5' und 3'. Diese Probe stammte aus dem rechten Initialtumor. Histologisch lag ein stromareicher Tumor vor. Bei dem Patienten handelte es sich um einen männlichen Patienten und die Tumor-DNA wurde in der qPCR mit zwei verschiedenen männlichen Kontrollproben verglichen. Die halbierte Kopienzahl kann also entweder auf ein Gemisch aus Tumor- und normalen Zellen oder auf ein Gemisch aus unterschiedlichen Tumorzellen hindeuten.

Wegert et al. (2009) präsentierten einen Patienten, bei dem in einer Tumorregion *WTX* deletiert, in einer anderen Region dagegen vorhanden war. Die Gruppe schloss auf einen inkompletten *WTX*-Verlust innerhalb des Tumors, allerdings war eine Kontamination der Tumorregion mit normalen Gewebezellen nicht auszuschließen.

Bei MLO war weder im linken Initialtumor (also die kontralaterale Seite) noch im Rezidivtumor eine Deletion nachweisbar. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen wäre der Verlust der Zellen mit *WTX*-Deletion in der Weiterentwicklung des Tumors. Dass der Tumor heterogen ist, konnte bereits durch die unterschiedlichen *CTNNB1*-Mutationen gezeigt werden. Im bilateralen Initialtumor war weder links im ILNR noch rechts im Stromaanteil eine *CTNNB1*-Mutation zu finden. Im ebenfalls bilateralen Rezidiv liegen links und rechts zwei unterschiedliche *CTNNB1*-missense-Mutationen vor (rechts: Ser45Phe, links: Thr41Ala). Im Gegensatz dazu war die Keimbahn-frameshift-Mutation in *WT1* (Ala10fs) überall gleich.

Das *Two-Hit*-Modell von Knudson und Strong (1972) kann hier eine mögliche Erklärung zur Tumorentstehung in diesem Patienten liefern: Die *WT1*-Mutation ist sowohl beim Initialtumor wie auch beim Rezidiv die Mutation, die als Keimbahnmutation in allen Nierenzellen vorliegt. Dem Modell zufolge entspricht dies dem ersten *Hit*. Als zweiter *Hit* folgt nun eine somatische Mutation in einer der Nierenzellen. In diesem Fall ist es im rechten Initialtumor die *WTX*-Deletion, die dann nach der Theorie von Knudson und Strong zur WT-Entstehung führt. Im Rezidiv sind die zweiten *Hits* die beiden *CTNNB1*-Mutationen.

Es wurde bereits beschrieben, dass *WTX*-Mutationen sowohl früh als auch spät in der Pathogenese von WT auftreten kann (Fukuzawa et al. 2010). In diesem Fall konnte

die *WTX*-Mutation nicht früh (linke Tumorprobe: histologisch ILNR), sondern nur spät (rechte Tumorprobe: histologisch stromareicher WT) nachgewiesen werden.

Der Patient erhielt bei Auftreten des Initialtumors eine zwölfwöchige Chemotherapie. Diese Chemotherapie könnte eine weitere mögliche Erklärung sein, warum die *WTX*-Deletion im Rezidiv nicht mehr nachweisbar war. Wenn es sich ursprünglich um ein Zellgemisch aus Tumorzellen mit und ohne *WTX*-Deletion handelte, könnte dies darauf hinweisen, dass die Tumorzellen mit *WTX*-Deletion sensibler oder die anderen Tumorzellen resistenter auf die Chemotherapie reagierten.

Insgesamt lässt sich sagen, dass es zum jetzigen Forschungszeitpunkt schwierig ist, die gefundenen *WTX*-Mutationen einzuordnen. Bei vielen Ergebnissen sind noch weitere Untersuchungen notwendig. Die Entstehung der WT erweist sich als sehr komplex und *WTX*-Aberrationen als alleinige Ursache eher unwahrscheinlich. Es ist auch klar, dass eine Keimbahnmutation in *WT1* das Risiko für einen WT erhöht, aber sehr wahrscheinlich nicht alleine ausreicht. Deshalb könnten die zusätzlichen Mutationen in *CTNNB1* oder *WTX* einen Einfluss auf die Tumorentstehung haben.

Die Zusammenhänge sind so vielschichtig, dass gewiss auch in Zukunft noch weitere Kofaktoren gefunden werden und es noch ein langer Weg bis zum Verständnis der WT-Entwicklung bleibt.

5 Literaturverzeichnis

Akhavanfard, S.; Vargas, S. O.; Han, M.; Nitta, M.; Chang, C. B.; Le, L. P. et al. (2014): Inactivation of the Tumor Suppressor *WTX* in a Subset of Pediatric Tumors. In: *Genes Chromosomes Cancer* 53 (1), S. 67–77. DOI: 10.1002/gcc.22118.

Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF) - Leitlinie der Gesellschaft für pädiatrische Onkologie und Hämatologie (Autor: Graf, N.) (2008): Nephroblastom. AWMF-Register Nr. 025/004, Klasse S1, zuletzt geprüft am 17.05.2015.

Beckwith, J. B.; Kiviat, N. B.; Bonadio, J. F. (2009): Nephrogenic Rests, Nephroblastomatosis, and the Pathogenesis of Wilms' Tumor. In: *Pediatric Pathology* 10 (1-2), S. 1–36. DOI: 10.3109/15513819009067094.

Behrens, J.; Lustig, B. (2004): The Wnt connection to tumorigenesis. In: *Int. J. Dev. Biol.* 48, S. 477–487, zuletzt geprüft am 03.10.2015.

Bienz, M. (2005): β -Catenin: A Pivot between Cell Adhesion and Wnt Signalling. In: *Current Biology* 15 (2), S. R64–R67. Online verfügbar unter 10.1016/j.cub.2004.12.058, zuletzt geprüft am 11.10.2016.

Bikandi, J.; San Millán, R.; Rementeria, A.; Garaizar, J. (2004): In silico analysis of complete bacterial genomes: PCR, AFLP-PCR and endonuclease restriction. In: *Bioinformatics (Oxford, England)* 20 (5), S. 798–799. DOI: 10.1093/bioinformatics/btg491.

Breslow, N. E.; Olson, J.; Moksness, J.; Beckwith JB; Grundy, P. (1996): Familial Wilms' tumor: A descriptive study. In: *Medical and Pediatric Oncology* 27, S. 398–403, zuletzt geprüft am 03.10.2015.

Busch, M. (2010): Biologische, molekulargenetische und biochemische Charakterisierung von mesenchymalen Wilms Tumorzelllinien mit WT1-Mutation. Dissertation. Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf. Humangenetik. Online verfügbar unter <https://portal.dnb.de/opac.htm?method=simpleSearch&cqlMode=true&query=idn%3D1008221635>.

Call, K. M.; Glaser, T.; Ito, C. Y.; Buckler, A. J.; Pelletier, J.; Haber, D. A. et al. (1990): Isolation and Characterization of Zing Finger Polypeptide Gene at the Human Chromosome 11 Wilms' Tumor Locus. In: *Cell* 60, S. 509–520.

Cardoso, L.; Souza, K. de; De O. Reis, A; Coelho Andrade, R.; Britto, A.; Lima, M. de et al. (2012): *WT1*, *WTX* and *CTNNB1* mutation analysis in 43 patients with sporadic Wilms' tumor. In: *Oncol Rep* 29, S. 315–320. DOI: 10.3892/or.2012.2096.

Corbin, M.; Reyniès, A. de; Rickman, D. S.; Berrebi, D.; Boccon-Gibod, L.; Cohen-Gogo, S. et al. (2009): WNT/ β -catenin pathway activation in Wilms tumors: A unifying mechanism with multiple entries? In: *Genes Chromosom. Cancer* 48 (9), S. 816–827. DOI: 10.1002/gcc.20686.

D'Angio, G. J.; Breslow, N. E.; Beckwith, J. B.; Evans, A.; Baum, E.; Lorimier, A. de et al. (1989): Treatment of Wilms' Tumor. Results of the Third National Wilms' Tumor Study. In: *Cancer* 64 (2), S. 349–360. Online verfügbar unter 10.1002/1097-0142(19890715)64:2<349::AID-CNCR2820640202>3.0.CO;2-Q, zuletzt geprüft am 10.11.2016.

Davies, J. A.; Lodomery, M.; Hohenstein, P.; Michael, L.; Schafe, A.; Spraggon, L.; Hastie, N. (2003): Development of an siRNA-based method for repressing specific genes in renal organ culture and its use to show that the *Wt1* tumour suppressor is required for nephron differentiation. In: *Human Molecular Genetics* 13 (2), S. 235–246. DOI: 10.1093/hmg/ddh015.

Don, R. H.; Cox, P. T.; Wainwright, B. J.; Baker, K.; Mattick, J. S. (1991): 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. In: *Nucleic Acids Research* 19 (14), S. 4008, zuletzt geprüft am 03.10.2015.

Durbin, R. M.; Altshuler, D. L.; Abecasis, G. R.; Bentley, D. R.; Chakravarti, A.; Clark, A. G. et al. (2010): A map of human genome variation from population-scale sequencing. In: *Nature* 467 (7319), S. 1061–1073. DOI: 10.1038/nature09534.

Ehrig, T.; Abdulkadir, S. A.; Dintzis, S. M.; Milbrandt, J.; Watson, M. A. (2001): Quantitative Amplification of Genomic DNA from Histological Tissue Sections after Staining with Nuclear Dyes and Laser Capture Microdissection. In: *Journal of Molecular Diagnostics* 3 (1), S. 22–25, zuletzt geprüft am 21.09.2015.

Fischbach, B. V.; Trout, K. L.; Lewis, J.; Luis C.A.; Sika, M. (2005): WAGR Syndrome: A Clinical Review of 54 Cases. In: *Pediatrics* (116), S. 984–988, zuletzt geprüft am 03.11.2016.

- Friedrich, A.; Kullman, F. (2003): Das familiäre adenomatöse Polyposis-Syndrom (FAP). Pathogenese und molekulare Mechanismen. In: *Med Klin* 98 (12), S. 776–782. DOI: 10.1007/s00063-003-1325-2.
- Fukuzawa, R.; Anaka, M. R.; Weeks, R. J.; Morison, I. M.; Reeve, A. E. (2009): Canonical WNT signalling determines lineage specificity in Wilms tumour. In: *Oncogene* 28 (8), S. 1063–1075. DOI: 10.1038/onc.2008.455.
- Fukuzawa, R.; Holman, S. K.; Chow, C. W.; Savarirayan, R.; Reeve, A. E.; Robertson, S. P. (2010): *WTX* mutations can occur both early and late in the pathogenesis of Wilms tumour. In: *Journal of Medical Genetics* 47 (11), S. 791–794. DOI: 10.1136/jmg.2010.080663.
- Furtwängler, R.; Schenk, J.-P.; Reinhard, H.; Leuschner, I.; Rübe, C.; Schweinitz, D.; Graf, N. (2005): Nephroblastom — Wilms-Tumor. Genetik, radiologische Diagnostik und Therapiekonzept - eine Übersicht. In: *Onkologe* 11 (10), S. 1077–1089. DOI: 10.1007/s00761-005-0934-1.
- Gadd, S.; Huff, V.; Huang, C.; Ruteshouser, E. C.; Dome, J. S.; Grundy, P. E. et al. (2012): Clinically Relevant Subsets Identified by Gene Expression Patterns Support a Revised Ontogenic Model of Wilms tumor: A Children's Oncology Group Study. In: *Neoplasia* 14 (8), S. 742–756. DOI: 10.1593/neo.12714.
- Gessler, M.; Poustka, A.; Cavenee, W.; Neve, R. L.; Orkin, S. H.; Bruns, G.A.P. (1990): Homozygous deletion in Wilms tumours of zinc-finger gene identified by chromosome jumping. In: *Nature* 343 (6260), S. 774–778.
- Graf, N.; Reinhard, H. (2003): Wilms-Tumoren. Diagnostik und Therapie. In: *Der Onkologe* 9 (4), S. 416–433. DOI: 10.1007/s00761-003-0511-4.
- Grohmann, A.; Tanneberger, K.; Alzner, A.; Schneikert, J.; Behrens, J. (2007): AMER1 regulates the distribution of the tumor suppressor APC between microtubules and the plasma membrane. In: *Journal of Cell Science* 120 (21), S. 3738–3747.
- Grovas, A.; Fremgen, A.; Rauck, A.; Ruymann, F. B.; Hutchinson, C. L.; Winchester, D. P.; Menck, H. R. (1997): The national cancer data base report on patterns of childhood cancers in the United States. In: *Cancer* 80 (12), S. 2321–2332, zuletzt geprüft am 21.02.2015.
- Grundy, P.; Breslow, N. E.; Green, D. M.; Sharples, K.; Evans, A.; D'Angio, G. J. (1989): Prognostic factors for children with recurrent Wilms' tumor: results from the

Second and Third National Wilms' Tumor Study. In: *J Clin Oncol* 7 (5), S. 638–647, zuletzt geprüft am 11.10.2016.

Hamilton, S. R.; Liu, B.; Parsons, R. E.; Papadopoulos, N.; Jen, J.; Powell, S. M. et al. (1995): The Molecular Basis of Turcot's Syndrome. In: *N Engl J Med* 332 (13), S. 839–847.

Hohenstein, P.; Hastie, N. D. (2006): The many facets of the Wilms' tumour gene, *WT1*. In: *Human Molecular Genetics* 15 (Review Issue 2), S. R196–R201. DOI: 10.1093/hmg/ddl196.

International Society of Paediatric Oncology: Therapieoptimierungsstudie zur Behandlung von Kindern und Jugendlichen mit einem Nephroblastom - SIOP 2001 / GPOH. Version 3.0: Januar 2007, S. 1–125.

Jeanpierre, C.; Denamur, I. H.; Cabanis, M.-O.; Luce, S.; Cécille, A.; Elion, J. 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, S. 824–833, zuletzt geprüft am 10.11.2016.

Jenkins, Z. A.; van Kogelenberg, M.; Morgan, T.; Jeffs, A.; Fukuzawa, R.; Pearl, E. et al. (2008): 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.

Kaatsch, P. (2010): Epidemiology of childhood cancer. In: *Cancer Treatment Reviews* 36 (4), S. 277–285. DOI: 10.1016/j.ctrv.2010.02.003.

Kaatsch, P.; Spix, C. (2014): German Childhood Cancer Registry - Report 2013/14 (1980-2013). Institute of Medical Biostatistics, Epidemiology and Informatics (IMBEI) at the University Medical Center of the Johannes Gutenberg University Mainz, zuletzt geprüft am 16.08.2015.

Kaneko, Y.; Homma, C.; Maseki, N.; Masaharu, S.; Hata, J. (1991): Correlation of Chromosome Abnormalities with Histological and Clinical Features in Wilms' and Other Childhood Renal Tumors. In: *Cancer Res* 51, S. 5937–5942, zuletzt geprüft am 10.09.2015.

- Kent, W. J.; Sugnet, C. W.; Furey, T. S.; Roskin, K. M.; Pringle, T. H.; Zahler, A. M.; Haussler, a. D. (2002): The Human Genome Browser at UCSC. In: *Genome Research* 12 (6), S. 996–1006. DOI: 10.1101/gr.229102.
- Kim, M. K-H; Min, D. J.; Rabin, M.; Licht, J. D. (2010): Functional characterization of Wilms tumor-suppressor WTX and tumor-associated mutants. In: *Oncogene* 30 (7), S. 832–842. DOI: 10.1038/onc.2010.452.
- Knudson, A. G.; Strong, L. C. (1972): Mutation and cancer: a model for Wilms' tumour of the kidney. In: *J Natl Cancer Inst* (48), S. 313–324. DOI: 10.1093/jnci/48.2.313.
- Koesters, R.; Ridder, R.; Kopp-Schneider, A.; Betts, D.; Adams, V.; Niggli, F. et al. (1999): Mutational Activation of the β -Catenin Proto-Oncogene Is a Common Event in the Development of Wilms' Tumors. In: *Cancer Res* 59, S. 3880–3882, zuletzt geprüft am 11.10.2016.
- Korbie, D. J.; Mattick, J. S. (2008): Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. In: *Nature protocols* 3 (9), S. 1452–1456. DOI: 10.1038/nprot.2008.133.
- 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. Online verfügbar unter 10.1016/0092-8674(93)90515-R, zuletzt geprüft am 13.11.2016.
- Lehmann, U.; Glöckner, S.; Kleeberger, W.; Feisst, H.; Wasielewski von, R.; Kreipe, H. (2000): Detection of Gene Amplification in Archival Breast Cancer Specimens by Laser-Assisted Microdissection and Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction. In: *American Journal of Pathology* 156 (6), S. 1855–1864, zuletzt geprüft am 21.09.2015.
- Maiti, S.; Alam, R.; Amos, C. I.; Huff, V. (2000): Frequent Association of β -Catenin and WT1 Mutations in Wilms Tumors. In: *Cancer Res* 60, S. 6288–6292.
- Major, M. B.; Camp, N. D.; Berndt, J. D.; Yi, X.; Goldenberg, S. J.; Hubbert, C. et al. (2007): Wilms Tumor Suppressor WTX Negatively Regulates WNT/ β -Catenin Signaling. In: *Science* 316 (5827), S. 1043–1046. DOI: 10.1126/science/1141515.
- Merks, J.H.M.; Caron, H. N.; Hennekam, R.C.M. (2005): High incidence of malformation syndromes in a series of 1,073 children with cancer. In: *Am. J. Med. Genet.* 134A (2), S. 132–143. DOI: 10.1002/ajmg.a.30603.

- Moisan, A.; Rivera, M. N.; Lotinun, S.; Akhavanfard, S.; Coffman, E. J.; Cook, E. B. et al. (2011): The *WTX* Tumor Suppressor Regulates Mesenchymal Progenitor Cell Fate Specification. In: *Developmental Cell* 20 (5), S. 583–596. DOI: 10.1016/j.devcel.2011.03.013.
- Mueller, R. F. (1994): The Denys-Drash syndrome. In: *J Med Genet* 31 (6), S. 471–477, zuletzt geprüft am 11.10.2016.
- Muto, R.; Yamamori, S.; Ohashi, H.; Osawa, M. (2002): Prediction by FISH Analysis of the Occurrence of Wilms Tumor in Aniridia Patients. In: *Am. J. Med. Genet.* 108 (4), S. 285–289. DOI: 10.1002/ajmg.10094.
- Narod, S. A.; Hawkins, M. M.; Robertson, C. M.; Stiller, C. A. (1997): Congenital Anomalies and Childhood Cancer in Great Britain. In: *Am. J. Hum. Genet.* 60, S. 474–485, zuletzt geprüft am 28.10.2016.
- Ness, K. K.; Krull, K. R.; Jones, K. E.; Mulrooney, D. A.; Armstrong, G. T.; Green, D. M. et al. (2013): Physiologic Frailty As a Sign of Accelerated Aging Among Adult Survivors of Childhood Cancer: A Report From the St Jude Lifetime Cohort Study. In: *Journal of Clinical Oncology* 31 (36), S. 4496–4503. DOI: 10.1200/JCO.2013.52.2268.
- NHLBI GO Exome Sequencing Project (ESP): Exome Variant Server. Seattle, WA. Online verfügbar unter <http://evs.gs.washington.edu/EVS/>, zuletzt geprüft am 11.09.2015.
- Nusse, R. (2007): Converging on β -Catenin in Wilms Tumor. In: *Science* 316 (5827), S. 988–989. DOI: 10.1126/science.1143337.
- Owen, C.; Virappane, P.; Alikian, M.; Stasevich, I.; Summers, K.; Lillington, D. et al. (2008): *WTX* is rarely mutated in acute myeloid leukemia. In: *Haematologica* 93 (6), S. 947–948. DOI: 10.3324/haematol.12509.
- Pastore, G.; Znoar, A.; Spreafico, F.; Graf, N.; Pritchard-Jones, K.; Steliarova-Foucher, E. (2006): Malignant renal tumours incidence and survival in European children (1978–1997): Report from the Automated Childhood Cancer Information System project. In: *European Journal of Cancer* 42 (13), S. 2103–2114. DOI: 10.1016/j.ejca.2006.05.010.
- Perdu, B.; Freitas, F. de; Frints, S.G.M.; Schouten, M.; Schrandt-Stumpel, C.; Barbosa, M. et al. (2010): Osteopathia striata with cranial sclerosis owing to *WTX* gene defect. In: *J Bone Miner Res* 25 (1), S. 82–90. DOI: 10.1359/jbmr.090707.

- Perotti, D.; Gamba, B.; Sardella, M.; Spreafico, F.; Terenziani, M.; Collini, P. et al. (2008): Functional inactivation of the *WTX* gene is not a frequent event in Wilms' tumors. In: *Oncogene* 27 (33), S. 4625–4632. DOI: 10.1038/onc.2008.93.
- Pode-Shakked, N.; Harari-Steinberg, O.; Haberman-Ziv, Y.; Rom-Gross, E.; Bahar, S.; Omer, D. et al. (2011): Resistance or sensitivity of Wilms' tumor to anti-FZD7 antibody highlights the Wnt pathway as a possible therapeutic target. In: *Oncogene* 30 (14), S. 1664–1680. DOI: 10.1038/onc.2010.549.
- Polakis, P. (2000): Wnt signaling and cancer. In: *Genes Dev* 14, S. 1837–1851. Online verfügbar unter 10.1101/gad.14.15.1837, zuletzt geprüft am 11.11.2016.
- Rainier, S.; Johnson, L. A.; Dobry, C. J.; Ping, A. J.; Grundy, P. E.; Feinberg, A. P. (1993): Relaxation Of Imprinted Genes In Human Cancer. In: *Nature* 362 (6422), S. 747–749. DOI: 10.1038/362747a0.
- Regimbald-Dumas, Y.; He, X. (2011): Wnt signalling: What The X@# is WTX? In: *EMBO J* 30 (8), S. 1415–1417. DOI: 10.1038/emboj.2011.101.
- Rivera, M.; Kim, W.; Wells, J.; Stone, A.; Burger, A.; Coffman, E. et al. (2009): The tumor suppressor WTX shuttles to the nucleus and modulates WT1 activity. In: *PNAS Early Edition* (20). Online verfügbar unter www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0811349106.
- Rivera, M. N.; Haber, D. A. (2005): Wilms' tumour: connecting tumorigenesis and organ development in the kidney. In: *Nat Rev Cancer* 5 (9), S. 699–712. DOI: 10.1038/nrc1696.
- Rivera, M. N.; Kim, W. J.; Wells, J.; Driscoll, D. R.; Brannigan, B. W.; Han, M. 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.; Weirich, A.; Schumacher, V.; Uschkereit, C.; Beier, M.; Leuschner, I. et al. (2008): Clinical Relevance of Mutations in the Wilms Tumor Suppressor 1 gene *WT1* and the Cadherin-associated Protein β 1 Gene *CTNNB1* for Patients with Wilms Tumors. In: *Cancer* 113 (5), S. 1080–1089. DOI: 10.1002/cncr.23672.
- Ruteshouser, E. C.; Robinson, S. M.; Huff, V. (2008): Wilms tumor genetics: Mutations in *WT1*, *WTX*, and *CTNNB1* account for only about one-third of tumors. In: *Genes Chromosom. Cancer* 47 (6), S. 461–470. DOI: 10.1002/gcc.20553.

- Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A. R. (1977): DNA-sequencing with chain-terminating inhibitors. In: *Proc. Nat. Acad. Sci.* 74 (12), S. 5463–5467, zuletzt geprüft am 05.09.2015.
- Schimpl, G. (2010): Tumoren im Kindesalter: Nephroblastom. In: *J Gastroenterol Hepatol Erkr* 8 (4), S. 45–50.
- 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., USA* 94, S. 3972–3977.
- Scott, R.; Murray, A.; Baskcomb, L.; Turnbull, c.; Loveday, C.; Al-Saadi, R. et al. (2012): Stratification of Wilms tumor by genetic and epigenetic analysis. In: *Oncotarget* 3 (3), S. 327–335, zuletzt geprüft am 12.09.2015.
- Stillier, C. A.; Parkin, D. M. (1996): Geographic and ethnic variations in the incidence of childhood cancer. In: *Britisch Medical Bulletin* 52 (2), S. 682–703, zuletzt geprüft am 21.09.2015.
- Tanneberger, K.; Pfister, A. S.; Brauburger, K.; Schneikert, J.; Hadjihannas, M. V.; Kriz, V. et al. (2011a): Amer1/WTX couples Wnt-induced formation of PtdIns(4,5)P₂ to LRP6 phosphorylation. In: *EMBO J* 30 (8), S. 1433–1443. DOI: 10.1038/emboj.2011.28.
- Tanneberger, K.; Pfister, A. S.; Kriz, V.; Bryja, V.; Schambony, A.; Behrens, J. (2011b): Structural and Functional Characterization of the Wnt Inhibitor APC Membrane Recruitment 1 (Amer1). In: *Journal of Biological Chemistry* 286 (22), S. 19204–19214. DOI: 10.1074/jbc.M111.224881.
- Untergasser, A.; Cutcutache, I.; Koressaar, T.; Ye, J.; Faircloth, B. C.; Remm, M.; Rozen, S. G. (2012): Primer3 - new capabilities and interfaces. In: *Nucleic Acids Research* 40 (15), S. e115. DOI: 10.1093/nar/gks596.
- Uschkereit, C. (2008): Molekulare Charakterisierung der Rolle von CTNNB1-Mutationen bei der Entstehung von stromareichen Wilms-Tumoren. Dissertation. Universität zu Köln, Köln. Online verfügbar unter <http://kups.ub.uni-koeln.de/2545/>.
- Vujančić, G. M.; Sandstedt, B.; Harms, D.; Kelsey, A.; Leuschner, I.; Kraker, J. de; SIOP Nephroblastoma Scientific Committee (2002): Revised International Society of Paediatric Oncology (SIOP) working classification of renal tumors of childhood. In: *Med Pediatr Oncol* 38 (2), S. 79–82. DOI: 10.1002/mpo.1276.

- Wang, H.; Shen Y; Sun N; Jiang Y; Li M; Sun L (2012): Identification and analysis of mutations in *WTX* and *WT1* genes in peripheral blood and tumor tissue of children with Wilms' tumor. In: *Chinese Medical Journal* 125 (10), S. 1733–1739, zuletzt geprüft am 17.09.2015.
- Wang-Wuu, S.; Soukup, S.; Bove, K.; Gotwals, B.; Lampkin, B. (1990): Chromosome Analysis of 31 Wilms' Tumors. In: *Cancer Res* 50, S. 2786–2793, zuletzt geprüft am 10.09.2015.
- Wegert, J.; Wittmann, S.; Leuschner, I.; Geissinger, E.; Graf, N.; Gessler, M. (2009): *WTX* inactivation is a frequent, but late event in Wilms tumors without apparent clinical impact. In: *Genes, chromosomes & cancer* 48 (12), S. 1102–1111. DOI: 10.1002/gcc.20712.
- Weksberg, R.; Hughes, S.; Moldovan, L.; Bassett, A.S; Chow, E.W.C; Squire, J. A. (2005): A method for accurate detection of genomic microdeletions using real-time quantitative PCR. In: *BMC Genomics* 6 (1), S. 180. DOI: 10.1186/1471-2164-6-180.
- Wilms, M. (1899): Die Mischgeschwülste der Niere. Leipzig: Verlag von Arthur Georgi, 1899.
- Xiao, W.; Oefner, P. J. (2001): Denaturing high-performance liquid chromatography: A review. In: *Hum Mutat* 17, S. 439–474, zuletzt geprüft am 18.09.2015.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Frau Prof. Royer-Pokora für die Bereitstellung des Themas und für die Möglichkeit, diese Arbeit am Institut für Humangenetik und Anthropologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchführen zu können, bedanken.

Die exzellente Betreuung zeichnete sich von der Einführung in das Arbeitsthema bis zum Abschluss dieser Arbeit durch zahl- und hilfreiche Anregungen aus. Diese Unterstützung über die gesamte Zeit und eine stete Diskussionsbereitschaft haben sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Des Weiteren geht mein Dank an die Mitarbeiter und Kollegen des humangenetischen Instituts für eine produktive Zusammenarbeit und ein angenehmes Arbeitsklima. Ich danke Frau Dr. Betz für die Einführung in die DHPLC und die Beantwortung vieler Fragen. Danken möchte ich ebenfalls Frau Edith Höricht-Lieb für die labortechnische Unterstützung.

Ein besonderer Dank gilt Maike Busch, Constanze Duhme, Anne Thiel und Birte Möhlendick für die Einführung und stete Hilfestellung bei Fragen des alltäglichen Laborlebens. Ohne euch hätte die Zeit im Labor lange nicht so viel Spaß gemacht!

Frau Dr. Tanneberger danke ich für die Bereitstellung des WTX-Antikörpers.

Zu besonderem Dank verpflichtet bin ich den Patienten und Eltern für ihre Einwilligung, sowie allen Mitarbeitern, die an diesem Prozess und der Materialasservierung beteiligt waren.

Zu guter Letzt bleibt natürlich der Dank an meine Familie und Freunde: Ohne die Unterstützung meiner Eltern und meines Bruders sowie meines Freundes wäre ich sicherlich nicht zum Ziel gekommen! Danke!

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.