

Aus dem Institut für Pathologie
(Direktor: Prof. Dr. med. Christoph Röcken)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Die prognostische Bedeutung eines genetischen Zugewinns auf Chromosom 1q bei Wilms-Tumor

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Würde einer Doktorin der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
WIEBKE HARDE
aus Uelzen

Kiel 2018

1. Berichtstatter: Prof. Dr. Christoph Röcken

2. Berichtstatter: Priv.-Doz. Dr. Carsten Maik Naumann

Tag der mündlichen Prüfung: 17.09.2018

Zum Druck genehmigt,

Kiel, den 23.07.2018

Gezeichnet: Prof. Dr. Johann Roider

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	II
Tabellenverzeichnis	III
1 Einleitung.....	1
1.1 Der Wilms-Tumor	1
1.1.1 Grundlagen des Wilms-Tumors	1
1.1.2 Die Pathogenese des Wilms-Tumors.....	2
1.2 Chromosom 1q.....	3
1.2.1 Die molekularbiologischen Grundlagen von Chromosom 1q	3
1.2.2 Der Zugewinn von DNA auf Chromosom 1q.....	4
2 Fragestellung und Zielsetzung dieser Arbeit	6
3 Material und Methoden	8
3.1 Material.....	8
3.1.1 Herkunft des humanen Materials	8
3.1.2 Chemikalien	11
3.1.3 Kits.....	11
3.1.4 Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien.....	11
3.1.5 Software.....	11
3.2 Methoden	12
3.2.1 Die Isolierung der Desoxyribonukleinsäure (DNA).....	12
3.2.2 Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA)	13
3.2.2.1 Prinzip der MLPA	13
3.2.2.2 Durchführung der MLPA.....	17
3.2.3 Statistische Auswertung.....	22

4	Ergebnisse	23
4.1	Ergebnisse der MLPA.....	23
4.2	Statistische Ergebnisanalyse der Testgruppe	24
4.3	Statistische Ergebnisse der Validierungsgruppe	26
5	Diskussion	29
5.1	Methodik.....	29
5.2	Ergebnisse im wissenschaftlichen Kontext.....	30
5.3	Schlussfolgerungen	35
5.4	Ausblick.....	38
6	Zusammenfassung	41
7	Literaturverzeichnis	43
8	Danksagung	52

Abkürzungsverzeichnis

COG	Children`s Oncology Group
CGH	Vergleichende genomische Hybridisierung
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EFS	Ereignisfreies Überleben
FFPE	Formalin-fixiertes, Paraffin-gebettetes Gewebe
GPOH	Gesellschaft für pädiatrische Hämatologie und Onkologie
ILNR	Intralobäre nephrogene Reste
KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
LOH	Verlust der Heterozygotie
MIP	Molecular inversion probe
MLPA	Multiplex ligation-dependent probe amplification
NWTSG	National Wilms Tumor Study Group
OS	Gesamtüberleben
PCR	Polymerase Chain Reaction
PLNR	Perilobäre nephrogene Reste
RFU	Relative Fluorescent Units
ROX	X-Rhodamin (Farbstoff)
Rpm	Rounds per minute
SIOP	Société Internationale d'Oncologie Pédiatrique
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismus
WT1	Wilms-Tumor 1 Gen
WT2	Wilms-Tumor 2 Gen

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3-1: Ablauf der MLPA	14
Abbildung 3-2: Grafisches Beispiel eines MLPA-Ergebnisses.....	16
Abbildung 4-1: EFS der Testgruppe mit/ohne Zugewinn auf 1q	24
Abbildung 4-2: EFS der Testgruppe nach histologischem Malignitätsgrad.....	25
Abbildung 4-3: EFS der Validierungsgruppe mit/ohne Zugewinn auf 1q	26
Abbildung 4-4: EFS der Validierungsgruppe nach histologischem Malignitätsgrad ..	27
Abbildung 4-5: EFS der Tumore intermediärer Malignität mit weniger als 20ml Blastem mit/ohne Zugewinn auf 1q	28

Tabellenverzeichnis

Tabelle 3-1: Stadieneinteilung der Nephroblastome nach SIOP.....	8
Tabelle 3-2: Histologische Klassifizierung der Nephroblastome	9
Tabelle 3-3: Sequenzen der MLPA-Sonden	18
Tabelle 3-4: Sequenz der PCR Primer	19
Tabelle 3-5: Zusammensetzung der Mastermixlösungen für die MLPA	20
Tabelle 3-6: Thermocyclerprogramm für die MLPA	20
Tabelle 4-1: Häufigkeit des Zugewinns auf Chromosom 1q in Bezug auf den histologischen Typ.....	23

1 Einleitung

1.1 Der Wilms-Tumor

1.1.1 Grundlagen des Wilms-Tumors

Der Wilms-Tumor, auch Nephroblastom genannt, ist ein bösartiger, embryonaler Tumor der Niere. Mit ca. 100 Erkrankungsfällen pro Jahr in Deutschland (dies entspricht etwa 6% aller kindlichen Malignome) ist er der häufigste Nierentumor bei Kindern und betrifft vor allem Patienten zwischen dem zweiten und dem fünften Lebensjahr (Müller 2013).

In den meisten Fällen tritt die Erkrankung unilateral auf, aber ca. 5 % der Kinder haben einen bilateralen Befall. Dieser ist besonders häufig mit anderen genetischen Mutationen und Syndromen assoziiert (s. unten). Die Tatsache, dass bei der Diagnose bereits 10% der Patienten Metastasen (v.a. in der Lunge, aber auch in Lymphknoten, Leber, Knochen, Knochenmark oder Gehirn) haben, zeigt, dass die Erkrankung hochmaligne ist. Dennoch ist die Therapie mittlerweile so weit entwickelt und optimiert, dass die Überlebensrate ca. 90% beträgt (Kaste et al. 2008; Weirich et al. 2004).

Wilms-Tumore entstehen aus embryonalem Gewebe und sind sogenannte Mischtumoren aus verschiedenen Zellpopulationen. Histologisch können in der Regel drei verschiedene Zelltypen differenziert werden: Blastem, Stroma und epitheliale Anteile. Hierbei besteht das Blastem aus dichten Zellhaufen mit hyperchromatischen Kernen ohne distinkte Differenzierung. Der epitheliale Anteil ist durch das Vorhandensein von Tubuli bzw. primitiven glomeruloiden Formationen gekennzeichnet und das Stroma besteht aus rhabdomyomatösen, fibroblastären oder myxoiden Differenzierungen (Roessner 2008; Kaste et al. 2008). Je nach Anteil dieser drei Komponenten und nach dem Vorliegen von Anaplasie werden die Tumore in unterschiedliche, die Prognose und Therapie bestimmende, Risikogruppen unterteilt (s. Abschnitt 3.1.1 dieser Arbeit).

Es konnte bereits gezeigt werden, dass genetische Faktoren bei der Entstehung des Wilms-Tumors eine große Rolle spielen. So ist der Wilms-Tumor einerseits mit einigen Fehlbildungen, z. B. Hemihypertrophie oder urogenitale Fehlbildungen wie

Kryptorchismus oder Hypospadie, assoziiert. Andererseits tritt er oft im Zusammenhang mit syndromalen Erkrankungen, wie z. B. dem Wiedemann-Beckwith-Syndrom, auf (Bode und Gutjahr 2004). Es konnten bereits mehrere Gene identifiziert werden, die im Zusammenhang mit dem Wilms-Tumor stehen. Hierauf wird im folgenden Kapitel näher eingegangen.

1.1.2 Die Pathogenese des Wilms-Tumors

Wie bereits oben beschrieben, entstehen Wilms-Tumore aus embryonalem Gewebe. Es wird angenommen, dass Vorläufer-Läsionen bestehend aus nephrogenem Restgewebe der Ursprung der Erkrankung sind (Beckwith 1998; Md Zin et al. 2011). Dieses nephrogene Restgewebe konnte in einem Drittel aller vom Wilms-Tumor betroffenen Nieren nachgewiesen werden (Beckwith et al. 1990). Nephrogene Reste können in zwei Hauptarten unterteilt werden: perilobär (PLNR) und intralobär (ILNR). Perilobäre nephrogene Reste machen hierbei mit ca. 90 % die Mehrheit aus und sind am Rand des Nierenlappens unterhalb der Kapsel oft an multiplen Stellen zu finden. Intralobäre Reste hingegen finden sich meist als einzelne Herde zentral im Nierenlappen. Sie machen zwar nur etwa 10 % der Vorläufer-Läsionen aus, entarten aber deutlich häufiger (Al-Hussain et al. 2014; Beckwith et al. 1990). PLNR sind häufig mit bilateralen Wilms-Tumoren assoziiert, während ILNR eher mit metachronen Tumoren assoziiert sind (Perlman et al. 2006; Vicens et al. 2009).

Bereits 1990 gelang die Identifikation des Wilms-Tumor 1 Gens (WT1) als Tumorsuppressorgen auf Chromosom 11p13 (Bonetta et al. 1990; Call et al. 1990; Gessler et al. 1990). Dieses Gen codiert für ein Zinkfingerprotein. Es konnte nachgewiesen werden, dass ein Verlust der DNA-Bindungs-Aktivität und somit der Funktion dieses Proteins zu der Entstehung des Wilms-Tumors beiträgt (Mrowka und Schedl 2000; Rauscher et al. 1990). Bei ungefähr 20 % aller Patienten mit sporadisch auftretendem Wilms-Tumor finden sich Mutationen in WT1, welche nur den Tumor und die umgebenden nephrogenen Reste betreffen. Es findet sich jedoch auch ein Zusammenhang zwischen dem Wilms-Tumor und verschiedenen Syndromen, wenn eine Keimbahnmutation bei WT1 vorliegt. So ist WT1 bei Patienten mit Denys-Drash-Syndrom (Wilms-Tumor, Pseudohermaphroditismus und Nierenversagen) mutiert und bei Patienten mit WAGR-Syndrom (Wilms-Tumor, Aniridie, Abnormalitäten des

Urogenitaltraktes und mentale Retardierung) deletiert (Md Zin et al. 2011; Sebire und Vujanic 2009).

Ein weiteres mit dem Wilms-Tumor assoziiertes Gen ist das Wilms-Tumor 2 Gen (WT2), welches ebenfalls auf dem kurzen Arm von Chromosom 11 lokalisiert ist. Durch Mutationen scheint es hier zu einer Überexpression von Insulin-like growth factor II und einer reduzierten Expression von H 19 (eine nichtcodierende Ribonukleinsäure, die als Tumorsuppressor fungiert) zu kommen. Dies resultiert in einer vermehrten Entstehung von PLNR, in welchen genetische Anormalitäten von WT2 nachgewiesen werden konnten (Md Zin et al. 2011; Satoh et al. 2006; Segers et al. 2012). In sporadisch auftretenden Wilms-Tumoren sind Anormalitäten im WT2 der mit Abstand am häufigsten nachgewiesene genetische Defekt (Satoh et al. 2006).

Neben WT1 und WT2 konnten weitere Gene, welche die Pathogenese des Wilms-Tumors beeinflussen, identifiziert werden. Hierzu gehören das WTX-Gen, das Tumorsuppressorgen p53, CTNNB1, bestimmte Regionen auf den Chromosomen 16q und 1p sowie das MYCN Onkogen. Diese Gene scheinen jedoch eher bei dem Krankheitsprogress und für die Prognose als in der Entstehung des Wilms-Tumors eine Rolle zu spielen (Al-Hussain et al. 2014). So wurden z. B. bei bis zu 75 % von untersuchten anaplastischen Wilms-Tumoren Mutationen des Tumorsuppressorgens p53 nachgewiesen (Bardeesy et al. 1994; Jadali et al. 2011).

Für die Prognose und die Therapieentscheidung werden in Deutschland bislang noch keine genetischen Marker genutzt.

1.2 Chromosom 1q

1.2.1 Die molekularbiologischen Grundlagen von Chromosom 1q

Mit 3141 Genen ist Chromosom 1 das längste menschliche Chromosom und enthält ungefähr 8 % des gesamten genetischen Materials (Boujard et al. 2014). Aufgrund dieser hohen Gendichte besitzt Chromosom 1 eine große medizinische Relevanz. So konnte bereits für mehr als 350 Krankheiten ein Zusammenhang mit einer Unterbrechung der Sequenz gezeigt werden, wenn auch der genaue genetische Zusammenhang oft nicht bekannt ist (Gregory et al. 2006).

Die Bezeichnung Chromosom 1q beschreibt den langen Arm von Chromosom 1, auf welchem im Rahmen des humanen Genomprojektes im Jahre 2006 über 103 Millionen Basenpaare als Basis der obengenannten Gene gefunden wurden (Gregory et al. 2006). Mittlerweile konnten einige Gene auf Chromosom 1q identifiziert und ihre Funktion bzw. ihr Zusammenhang mit Krankheiten beschrieben werden. So ist z. B. das ZNF687 Gen auf Chromosom 1q lokalisiert, welches für ein Zinkfingerprotein codiert und eine wichtige Rolle in der Genese von Osteoklasten und Osteoblasten spielt. Hier konnte ein Zusammenhang mit Morbus Paget und Riesenzelltumoren des Knochens gezeigt werden (Divisato et al. 2016). Ein anderes Beispiel aus der Onkologie ist das NRK1 Gen, welches für eine Kinase codiert. Hier konnte u. a. ein Zusammenhang zwischen einer Mutation des Gens und dem medullären Schilddrüsenkarzinom bei Kindern und jungen Erwachsenen nachgewiesen werden (Vanden Borre et al. 2017). Weitere Beispiele für Krankheiten, bei denen explizit ein Zugewinn von DNA auf Chromosom 1q nachgewiesen werden konnte, finden sich im folgenden Kapitel.

1.2.2 Der Zugewinn von DNA auf Chromosom 1q

Ein Zugewinn von DNA ist grundsätzlich durch Translokation, Inversion, Insertion oder Duplikation möglich (Murken 2011). Mutationen im Genom können entweder folgenlos sein oder sie haben, nicht immer offensichtliche, Auswirkungen auf den Organismus. Seit den 1980er Jahren werden immer mehr genetische Analysen durchgeführt. Auch im Zusammenhang mit Tumoren konnten schon zahlreiche Genmutationen nachgewiesen werden, z.B. Mutationen an den für das KRAS-Onkogen oder das p53-Tumorsuppressorgen kodierenden Genorten beim Kolonkarzinom (Cho und Vogelstein 1992).

Die Bezeichnung Chromosom 1q beschreibt den langen Arm von Chromosom 1. Ein Zugewinn von DNA auf diesem wurde bereits von mehreren Autoren im Zusammenhang mit verschiedenen Tumoren oder einer besonders schlechten Prognose bei Tumoren beschrieben (siehe auch Kapitel 1.2). So wurde ein Zugewinn auf Chromosom 1q z.B. bei Myelofibrose mit polyploidem Karyotyp und bei diffusen intrinsischen Hirnstammgliomen gefunden (Reyes-Botero et al. 2014; Singh et al. 2013). Beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom konnte ein signifikanter

Zusammenhang zwischen einer Mutation im KRAS-Gen und einem Zugewinn auf Chromosom 1q nachgewiesen werden (Tan, Daniel S W et al. 2014). In einer Arbeit von Xu et al. ist der Zugewinn auf Chromosom 1q sogar Teil eines Punktesystems zur frühzeitigen Diagnose eines hepatozellulären Karzinoms in Abgrenzung zur chronischen Hepatitis oder Leberzirrhose (Xu et al. 2015).

Im Zusammenhang mit einer schlechteren Prognose bei der jeweiligen Tumorerkrankung wurde ein Zugewinn auf Chromosom 1q bei Erwachsenen z.B. beim atypischen Meningeom und beim nicht-hyperdiploiden Multiplen Myelom beschrieben (Gabeau-Lacet et al. 2009; Kamada et al. 2012). Im Bereich der Pädiatrie konnte ein Zugewinn auf Chromosom 1q in Verbindung mit einer schlechteren Prognose z. B. beim intrakraniellen Ependymom und beim Ewing Sarkom beobachtet werden (Kilday et al. 2012; Mackintosh et al. 2011).

Die Tatsache, dass dies nur einige Beispiele für beschriebene Zusammenhänge zwischen einem Zugewinn von DNA auf Chromosom 1q und einer Tumorerkrankung bzw. einer schlechten Prognose bei Tumorerkrankung sind, lässt darauf schließen, dass es hier noch sehr viele weitere, unbekannte Interaktionen geben könnte. Dafür spricht auch, dass die untersuchten Tumore sehr heterogen sind und ihren Ursprung in verschiedenen Organsystemen haben.

2 Fragestellung und Zielsetzung dieser Arbeit

Dank verbesserter Therapiemöglichkeiten im Rahmen der Chemotherapie und Chirurgie des Wilms-Tumors beträgt die Langzeitüberlebensrate mittlerweile ca. 90% (vgl. Abschnitt 1.1.1 dieser Arbeit). Einerseits gibt es trotz dieser an sich guten Prognose jedoch immer noch einige Patienten, bei denen die Erkrankung einen schnelleren Progress zeigt und auf die Chemotherapie schlechter anspricht, sodass die Betroffenen trotz Therapie sterben oder ein Rezidiv erleiden. Andererseits ist es möglich, dass es auch Patienten gibt, die wegen der Angst vor einer zu geringen Therapieintensität übertherapiert werden und so eventuell mehr Nebenwirkungen und Spätfolgen der Chemotherapie erleiden als sie es müssten, um die Krankheit zu besiegen. Die Tatsache, dass 24 % der überlebenden Patienten in den 25 Jahren nach der Diagnose schwere chronische Gesundheitsprobleme haben, verdeutlicht, dass die Therapie trotz guter Überlebenschancen viele Spätfolgen für die Betroffenen hat (Termuhlen et al. 2011). Zudem erkranken laut einer Studie von Breslow et al. 6,7 % der Überlebenden bis zu ihrem vollendeten 40. Lebensjahr an einem zweiten, malignen soliden Tumor (Breslow et al. 2010). Diese Zahlen zeigen einmal mehr, dass trotz der guten Überlebensraten eine verbesserte, schonendere, gezieltere und individuellere Therapie das nächste Ziel der Forschung sein muss.

Bisher wird die Risikoeinteilung des jeweiligen Wilms-Tumors in Deutschland allein anhand klinischer Kriterien (lokale Ausbreitung, Metastasierung) und der postoperativen Histologie des entnommenen Gewebes beurteilt. Auf der Grundlage dieser Beurteilung wird dann die Entscheidung über die weitere Therapie getroffen (vgl. Abschnitt 3.1.1). Dieses Vorgehen unterscheidet sich von dem in den Vereinigten Staaten von Amerika üblichen Vorgehen, wo im Rahmen der Children's Oncology Group (COG) bereits heute für einige Wilms-Tumore mit dem Verlust der Heterozygotie (LOH) auf Chromosom 1p und 16q ein zusätzlicher molekulargenetischer Parameter mit Assoziation zu einer ungünstigen Prognose genutzt wird (Dome et al. 2014; Grundy et al. 2005). Da sich jedoch die Therapiestrategie von Wilms-Tumoren in den USA von dem in Deutschland angewendeten Konzept deutlich unterscheidet, lassen sich die prognostischen Marker nicht ohne Weiteres auf die Patienten in Deutschland übertragen (vgl. Abschnitt 3.1.1).

Mehrere, aktuelle Publikationen deuten auf einen Zusammenhang zwischen einem Zugewinn auf Chromosom 1q und einem schlechteren Verlauf der Erkrankung hin. So konnten Segers et al. sowohl einen Zusammenhang zwischen einer niedrigeren Rate für das ereignisfreie Überleben (EFS) als auch für das Gesamtüberleben (OS) und einem Zugewinn auf Chromosom 1q nachweisen (Segers et al. 2013). In einer weiteren Studie gelang Gratias et al. ebenfalls der Nachweis dieses Zusammenhangs bei Wilms-Tumoren mit günstiger Histologie (Gratias et al. 2013). Die Patientengruppen, die in diesen beiden Studien untersucht wurden, sind jedoch anders behandelt worden als Patienten in Deutschland. In der Studie von Segers et al. stammte das untersuchte Gewebe ca. zur Hälfte von Patienten, die primär operiert worden waren, während das Gewebe der anderen Hälfte von Tumoren nach einer präoperativen Chemotherapie gewonnen wurde. Das Untersuchungsgut der Studie von Gratias et al. stammte komplett von primär operierten Tumoren.

Da die Behandlung in Deutschland aus einer präoperativen Chemotherapie mit anschließender Operation besteht (vgl. Abschnitt 3.1.1), soll im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, ob die bei überwiegend primär operierten Gewebeproben gefundenen Zugewinne auf dem Chromosom 1q auch bei Tumoren nach einer Chemotherapie noch nachweisbar sind und ob auch hier ein Zusammenhang zwischen einer ungünstigeren Prognose und einem Zugewinn auf Chromosom 1q gezeigt werden kann.

Die Fragestellung dieser Arbeit lautet:

- Lässt sich bei Tumoren mit hoher Malignität und somit schlechter Prognose vermehrt ein Zugewinn auf Chromosom 1q nachweisen?
- Gibt es Möglichkeiten, den Zugewinn auf Chromosom 1q für die Prognose und die weitere Therapieentscheidung zu nutzen?

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Herkunft des humanen Materials

Das untersuchte Material stammt aus dem Kindertumorregister Kiel der Gesellschaft für pädiatrische Hämatologie und Onkologie (GPOH) von Patienten mit Wilms-Tumor, die in Deutschland innerhalb der SIOP-2001/GPOH-Studie behandelt wurden. Dies ist eine Studie der GPOH, die Teil der internationalen Nephroblastomstudie der Société Internationale d’Oncologie Pédiatrique (SIOP) ist. Für die Verwendung aller Gewebeproben für Forschungsprojekte wurde im Rahmen der Aufnahme der Patienten in die SIOP-2001/GPOH ein “informed consent” eingeholt. Die Vorgaben der Helsinki-Deklaration wurden beachtet. Entsprechende Ethik-Voten wurden durch die Leitung der SIOP-2001/GPOH-Studie eingeholt.

In dieser Studie werden die Patienten bei initialer Diagnosestellung anhand rein klinischer Befunde (nicht-metastasiert/metastasiert) in ein vorläufiges Stadium eingeteilt und entsprechend dieser Einteilung mit einer präoperativen Chemotherapie behandelt. Das lokale Tumorstadium wird dann anhand des Resektates nach Chemotherapie seitens der Pathologen festgelegt. Die verschiedenen histopathologischen Stadien sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

Stadium	Beschreibung
I	Tumor auf die Niere beschränkt und komplett entfernt
II	Ausdehnung über die Nierenkapsel hinaus, aber vollständig entfernt
III	Lymphknotenmetastasen lokal, Tumorruptur, Tumorbiopsie, unvollständige Resektion
IV	Hämatogene Fernmetastasen oder Lymphknotenmetastasen außerhalb der Bauch-Becken-Region
V	Bilaterales Nephroblastom

Tabelle 3-1: Stadieneinteilung der Nephroblastome nach SIOP

Modifiziert nach (Kaste et al. 2008; Jocham und Bähre 2007).

Da die Patienten in Deutschland normalerweise primär mit Chemotherapie behandelt und erst sekundär operiert werden, spielt das lokale Tumorstadium bei der anfänglichen Stadieneinteilung keine Rolle. Dies unterscheidet sich zu der Behandlung der amerikanischen Children`s Oncology Group (COG)-Studie, ehemals National Wilms Tumor Study Group (NWTSG), in der die Kinder primär operiert und erst anschließend chemotherapeutisch behandelt werden (Kaste et al. 2008; Green et al. 2014). Das lokale Tumorstadium wird in dieser Studie bereits zu Beginn der Therapie an dem Resektat festgelegt.

In der SIOP-2001/GPOH-Studie erhalten die Patienten mit einem Nephroblastom Stadium I-III eine präoperative Chemotherapie mit Vincristin und Actinomycin D für vier Wochen. Bei Stadium IV dauert die Chemotherapie sechs Wochen und die Patienten erhalten zusätzlich Doxorubicin. Bei einem bilateralen Nephroblastom, Stadium V, wird die Chemotherapie mit den genannten Zytostatika individuell festgelegt und auch die Therapiedauer kann in Abhängigkeit von der Möglichkeit der nierenerhaltenden Operation Wochen bis Monate umfassen (Bode und Gutjahr 2004; Dome et al. 2014).

Nach der Operation werden die resezierten Tumore anhand der Histologie in die Risikogruppen niedrigmaligne, intermediärmaligne oder hochmaligne eingeteilt. Diese Einteilung ist in der folgenden Tabelle dargestellt.

Niedriger Malignitätsgrad	Komplett nekrotisches Nephroblastom
Intermediärer Malignitätsgrad	Epithelreiches Nephroblastom
	Stromareiches Nephroblastom
	Mischtyp des Nephroblastoms
	Regressives Nephroblastom
	Nephroblastom mit fokaler Anaplasie
Hoher Malignitätsgrad	Blastemreiches Nephroblastom
	Nephroblastom mit diffuser Anaplasie

Tabelle 3-2: Histologische Klassifizierung der Nephroblastome

Modifiziert nach (Vujančić et al. 2002; Warmann et al. 2011).

Die weitere Chemotherapie wird anhand des Malignitätsgrades des Tumors und dem Tumorstadium festgelegt. Ab Stadium III bei intermediärer bzw. Stadium II bei hoher

Malignität des Tumors wird die Chemotherapie um eine zusätzliche Bestrahlung ergänzt (GPOH et al. 2016).

Bei dem Material, das im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurde, handelt es sich um Gewebeproben aus den operativ entnommenen Tumoren, welche chemotherapeutisch vorbehandelt wurden. Das Gewebe wurde in der Pathologie der behandelnden Klinik in Paraffin eingebettet, geschnitten und anschließend an die Referenzpathologie in Kiel verschickt. Hier erfolgte die histopathologische Stadieneinteilung anhand eines Querschnitts durch den Tumor. Dabei wird die Histologie, z. B. der Blastemanteil, visuell quantitativ bestimmt und der Tumor so einer Risikogruppe zugeordnet. Anhand dieser Einteilung lässt sich auch das Therapieansprechen des jeweiligen Tumors bewerten. Tumore mit einem hohen Anteil an nekrotischem oder regressivem Gewebe sind niedrigmaligne und haben entsprechend gut auf die Chemotherapie angesprochen. Dem entgegen zu setzen sind Tumore mit einem hohen Anteil an vitalem Gewebe (z. B. blastemreiche oder anaplastische Tumore) als Folge des schlechten Therapieansprechens.

Die erste Gruppe, die untersucht wurde, umfasste 98 Fälle mit hohem Malignitätsgrad aus den Jahren 2002 – 2012. Der jüngste eingeschlossene Patient war 4 Monate alt, der älteste 46 Jahre, wobei das Durchschnittsalter 7 Jahre und 9 Monate betrug. 48 Patienten waren männlich und 50 weiblich, was einem Prozentsatz von 49 % bzw. 51 % entspricht.

Um einen Vergleich mit dem repräsentativen Patientengut aller Risikogruppen zu ermöglichen, wurden anschließend die Gewebeproben aller im Jahr 2007 in die SIOP-2001/GPOH-Studie aufgenommenen Patienten untersucht. Dies entsprach noch einmal 81 Fällen, wobei der jüngste Patient hier 6 Monate und der älteste 39 Jahre alt waren. Das Durchschnittsalter in der Vergleichsgruppe betrug 5 Jahre und 3 Monate. 50 Patienten waren männlich und 31 weiblich, entsprechend 62 % und 38 %.

3.1.2 Chemikalien

Ethanol	Merck AG, Darmstadt, D
Hi-Di™ Formamide	Life Technologies™, Carlsbad, USA
UltraPure™ DNase/RNase-free distilled water	Life Technologies™, Carlsbad, USA
X-Rhodamin (ROX)	Life Technologies™, Carlsbad, USA
Xylol	J T Baker®, Deventer, NL

3.1.3 Kits

DNeasy® Blood and Tissue Kit	Qiagen GmbH, Hilden, D
SALSA MLPA P303 Kit	MRC-Holland b.v., Amsterdam, NL

3.1.4 Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien

ABI Prism 3500	Life Technologies™, Carlsbad, USA
Axioskop 40	Carl Zeiss AG, Oberkochen, D
Brutschrank	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach, D
Biosphere® Filtertips 0,5-10µl	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, D
Biosphere® Filtertips 10-100µl	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, D
Biosphere® Filtertips 100-1000µl	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, D
Biosphere® Safe Seal Tube 1,5 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, D
Biophotometer	Eppendorf AG, Hamburg, D
PTC 200 Thermal Cycler	MJ Research Inc., St. Bruno, CDN
Qubit 3.0 Fluorometer	Thermo Scientific, Waltham, USA
Reference® Pipette 0,5-10µl	Eppendorf AG, Hamburg, D
Reference® Pipette 10-100µl	Eppendorf AG, Hamburg, D
Reference® Pipette 100-1000µl	Eppendorf AG, Hamburg, D
TMix	Analytik Jena AG, Jena, D
VV3 Vortex Shaker	VWR International Inc., Radnor, USA

3.1.5 Software

Coffalyser	MRC-Holland b.v., Amsterdam, NL
------------	---------------------------------

3.2 Methoden

3.2.1 Die Isolierung der Desoxyribonukleinsäure (DNA)

Die Desoxyribonukleinsäure (DNA), welche für die weitere Analyse dieser Arbeit benötigt wurde, wurde aus in Paraffin fixierten Gewebeblöcken gewonnen. Hierbei musste vor der eigentlichen DNA-Isolierung geprüft werden, wie hoch der eigentliche vitale Tumoranteil in dem untersuchten Gewebe war. Dazu wurden Schnitte angefertigt und unter dem Lichtmikroskop analysiert. Stellte der Tumor mindestens 90% des fixierten Gewebes dar, konnte die DNA aus dem gesamten Block analysiert werden. Anderenfalls wurden ungefärbte Schnitte hergestellt, von denen mithilfe eines Skalpell die Tumoranteile vorsichtig makrodisseziert wurden, um eine Verfälschung der Ergebnisse durch eine Analyse von zuviel Normalgewebe zu vermeiden.

Für die Isolierung der DNA wurde das DNeasy Blood & Tissue Kit der Firma Qiagen GmbH, Hilden, D, genutzt. Alle benutzten Puffer, Filter und Säulen waren Teil dieses Kits.

Um die DNA isolieren zu können, musste zuerst das Paraffin von dem zu untersuchenden Gewebe gelöst werden. Hierzu wurden 1000 µl Xylol zu dem Gewebe in den Mikroreaktionsgefäßen pipettiert, das Ganze für zehn Minuten inkubiert und anschließend für zwei Minuten bei 13.000 rounds per minute (rpm) zentrifugiert. Nachdem diese beiden Schritte einmal wiederholt wurden, wurden anschließend 1000 µl Ethanol dazugegeben. Nach einer erneuten Inkubation für zehn Minuten folgte wieder eine Zentrifugation mit 13.000 rpm für zwei Minuten. Dann wurde der Überstand abpipettiert und verworfen und das Prozedere ab der Zugabe des Ethanols wiederholt. Anschließend wurde das Material im geöffneten Gefäß für 30 Minuten bei 60°C im Brutschrank getrocknet.

Um das Gewebe zu lysieren wurden dann 180 µl DNA-Isolierungspuffer (ATL Puffer) und 20 µl Proteinase K Konzentrat für den Abbau von Proteinen und die Freisetzung der Nukleinsäuren hinzugegeben. Anschließend wurde das Material über Nacht bei 56°C und 850 rpm auf dem Thermomixer inkubiert.

Am darauffolgenden Tag musste die gewonnene DNA noch von dem restlichen enthaltenen Material separiert werden. Hierzu wurden zuerst 200 µl AL-Puffer

hinzugefügt und das Material für zehn Minuten bei 70°C auf dem Thermomixer inkubiert. Danach folgte eine Zugabe von 200 µl Ethanol und eine Inkubation bei Raumtemperatur für fünf Minuten. Anschließend wurde das Material auf einen Filter mit Säule aus dem DNeasy Kit pipettiert und für zwei Minuten bei 10.000 rpm zentrifugiert. Nun war die DNA auf dem Filter und das restliche Gewebe in der Säule, die verworfen wurde. Nachdem der Filter auf eine neue Säule gesetzt wurde, musste die DNA weiter gereinigt werden. Hierzu wurden zuerst 500 µl AW1-Wasch-Puffer hinzugegeben und das Material für zwei Minuten bei 10.000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde erneut die Säule verworfen und der Filter auf eine neue Säule gesetzt. Nun wurden 500 µl AW2-Wasch-Puffer hinzugefügt und es erfolgte eine dreiminütige Zentrifugation bei 13.000 rpm. Die Säule wurde wieder verworfen und der Filter auf ein frisches Mikroreaktionsgefäß gesetzt.

Um die DNA aus dem Filter zu lösen, wurden jetzt 50 µl AE-Puffer auf den Filter gegeben, das Material für mindestens zwei Minuten inkubiert und anschließend für zwei Minuten bei 10.000 rpm zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde einmal wiederholt und der Filter anschließend verworfen.

Um die erhaltene DNA quantifizieren zu können, erfolgte daraufhin eine quantitative Messung mithilfe des Qubit Fluorometers.

3.2.2 Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA)

3.2.2.1 Prinzip der MLPA

Das Prinzip der Multiplex ligation-dependent probe amplification wurde erstmals 2002 beschrieben (Schouten et al. 2002).

Die MLPA ermöglicht die simultane Untersuchung von bis zu 40 verschiedenen Genabschnitten mittels eines universellen Polymerase Chain Reaction (PCR) Primers und wird vor allem zur Detektion von Exondeletionen und –duplikationen genutzt. Folgende Abbildung stellt den Ablauf der MLPA dar.

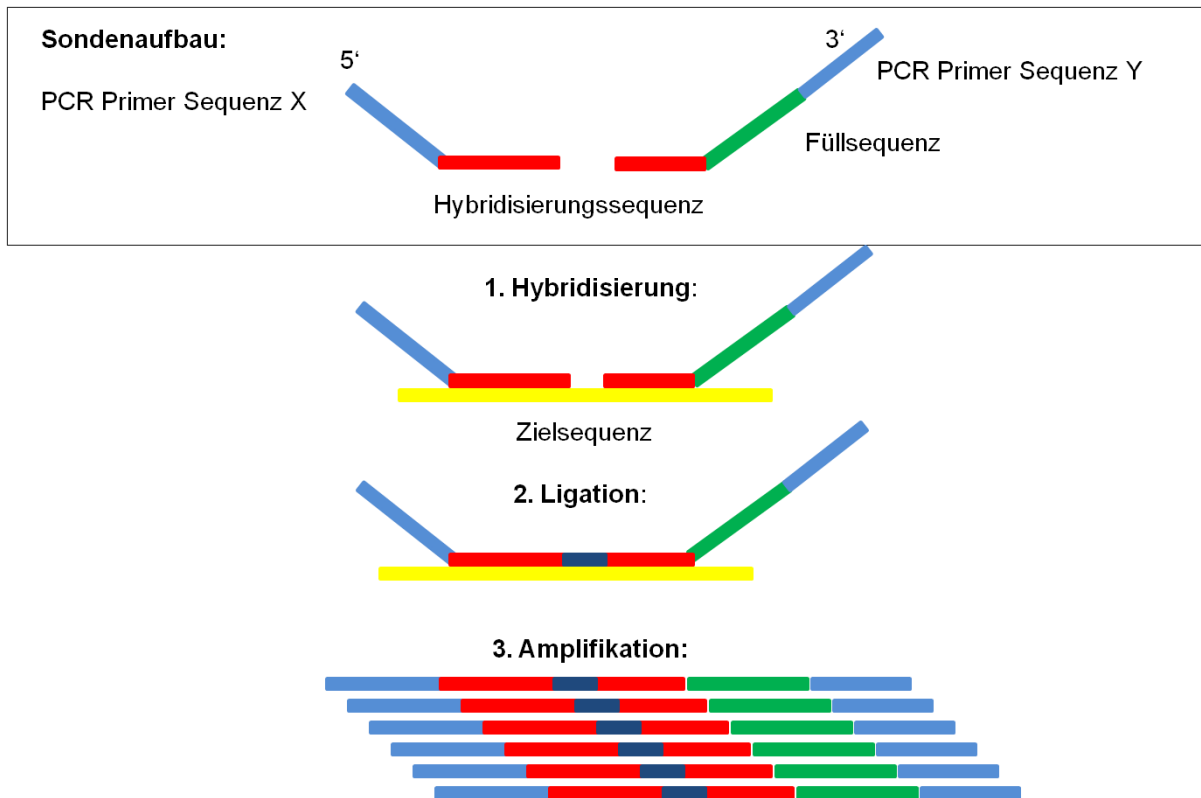


Abbildung 3-1: Ablauf der MLPA

Modifiziert nach (Schouten et al. 2002).

Die mitgelieferten MLPA-Sonden bestehen aus unterschiedlichen Teilsequenzen. Zusätzlich zu dem sequenzspezifischen Abschnitt enthält jede Sonde die universelle PCR Primersequenz. Um ein späteres Auftrennen der Amplifikationsprodukte mittels Kapillarelektrophorese zu ermöglichen, ist außerdem eine verschieden lange Füllsequenz enthalten.

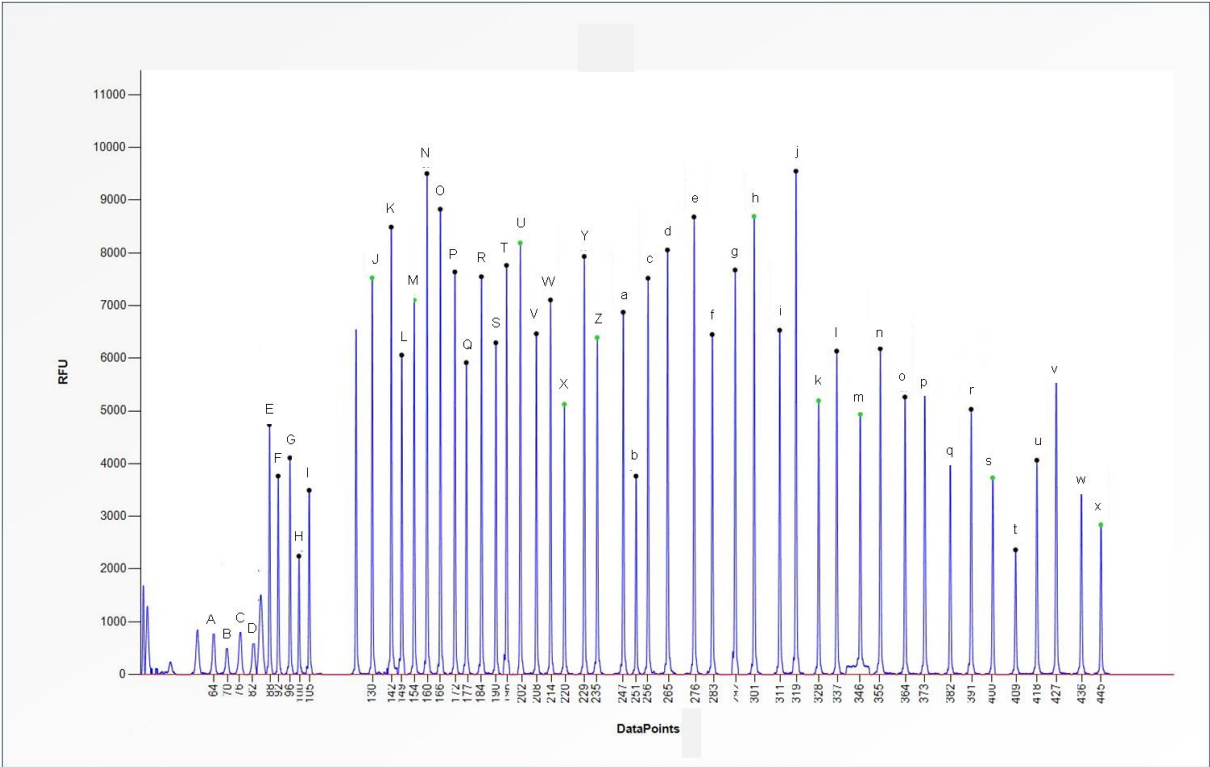
Das Verfahren der MLPA besteht aus drei verschiedenen Teilreaktionen:

1. Hybridisierung der sequenzspezifischen Sondenabschnitte mit der DNA,
2. Ligation der beiden Sondenabschnitte durch die enthaltene Ligase,
3. Amplifikation des entstandenen Nukleotids auf Basis der PCR.

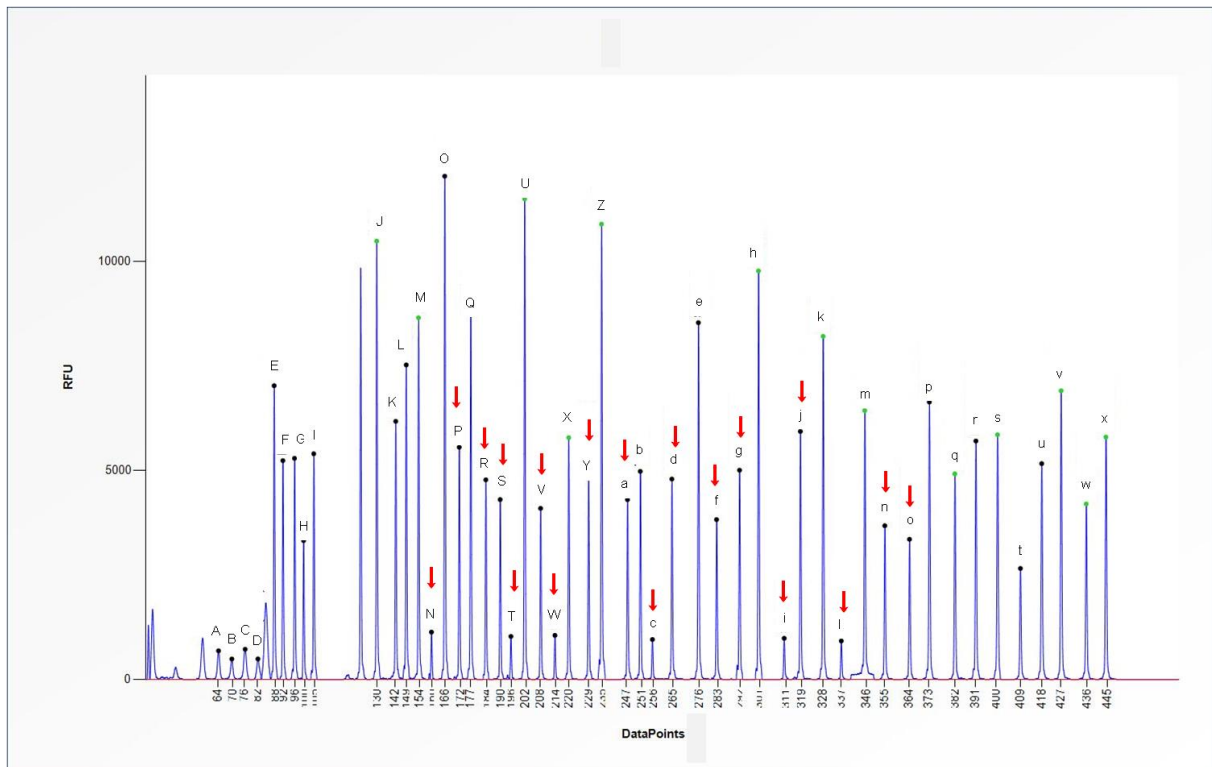
Durch die Hybridisierung und die anschließende Amplifikation ist es möglich, Deletionen oder Duplikationen einzelner Exone darzustellen. Fehlt ein DNA-Abschnitt, so erfolgt auch keine Amplifikation. Ist er jedoch häufiger vorhanden, entstehen mehr Amplifikationsprodukte.

Nach der Amplifikation erfolgt eine Kapillarelektrophorese, um die Produkte nach ihrer spezifischen Länge aufzutrennen. Mithilfe eines Computerprogramms wird das Ergebnis anschließend grafisch dargestellt.

Folgende Abbildung zeigt exemplarisch solch eine grafische Darstellung.



a: Ergebnis des Kontrollmaterials



b: Ergebnis des Probenmaterials

Abbildung 3-2: Grafisches Beispiel eines MLPA-Ergebnisses
RFU=Relative fluorescent units

Zum Vergleich der Ergebnisse der MLPA ist bei jeder Analyse der Einschluss einer Kontrolle notwendig. Diese Kontrolle sollte möglichst keine Veränderungen in der DNA-Menge aufweisen.

Der obere Graph zeigt das Ergebnis der Kapillarelektrophorese einer solchen Kontrolle. Jeder Peak stellt einen Genort dar. Da die genauen Genorte für diese allgemeine Darstellung der MLPA nicht relevant sind, sind sie hier mit Buchstaben beschriftet. Die Einheit, in der die DNA-Menge angegeben wird, sind Relative Fluorescent Units (RFU).

Im unteren Teil der Abbildung ist das Ergebnis des Probenmaterials dargestellt. Hier fällt auf, dass einige Peaks deutlich niedriger als bei der Kontrolle sind. Diese Stellen sind in dem Graph mithilfe der roten Pfeile markiert. Aus dem Ergebnis lässt sich schließen, dass weniger Amplifikationsprodukte entstanden sind, weil auch weniger DNA als in der Kontrolle vorlag. Es kann also vermutet werden, dass es an diesen Genorten zu einem Verlust von DNA, z.B. durch Deletionen, gekommen ist.

3.2.2.2 Durchführung der MLPA

Für die MLPA wurde das SALSA MLPA P303 Kit der Firma MRC-Holland, Amsterdam, NL, genutzt. Dieses enthält 31 verschiedene MLPA-Sonden, von denen vier einen Genort auf Chromosom 1q als Zielsequenz haben. Des Weiteren enthält das Kit 15 verschiedene Referenzsonden. Die Sequenzen der 31 MLPA-Sonden sind in folgender Tabelle aufgelistet.

Gen	Chr. Pos.	5' Ende	3' Ende
MYC	08q24.21	GTGCTAAAGGAGTGATTTCATTTCTTTCTTAAAGAGGA	GGAACAAGAAGATGAGGAAGAAATCGATGTTGTTTCTGGGGATC
PDE4DIP	01q21.1	TTCGGGAGAAACAACAACCTGCTACATCTGTT	GGAGGAGCCAACCTAGCATGGAAGTGCAGGTAAGG
PDGFRA	04q12	TCTCTGAGATGCTTTGGGGAGAGTGAAGT	GAGCTGGCAGTACCCCATGTCTGAAGAAGAGAGCTCCGATG
NNAT	20q11.23	CTATACCCGCCGCCACCTAAGTGCACA	TGCGCGCCTTGGGGGTGTTTATGAGGAGGGGTG
AURKA	20q13.2	TGTTTATCCTTTGTTGCAGGCATCCTAAT	ATTCTTAGACTGTATGGTTATTTCCATGATGCTACCAGAGTCTA
PTEN	10q23.31	TGCACAGATTCATGTTACTTGATCTGCTTT	AAATGACTTGGCATCTAGCCCATATTTGAGCCCATAAACCGTGTGGT
GPR98	05q14.3	GTGCTGGTCTCAGTGTCAGTGATAATG	AATCTGGTCAAGGCAGCCAGGAGGGGGGCAC
TP73	01p36.32	CGGCCAGGAGAGACCCGGGTG	TCAGGAAAGATGGCCGTCTGGGGACAGCAGGG
DMBT1	10q26.13	TGCAATGCCCTTTATGTGGCTTCTT	TCTACAGGTGTCTGGCTTGATGGCTAATATTTGCCGAGCAAAATC
CHD7	08q12.2	GTGTTGCAGAAGGAATCTGGAGAGGA	GGTAGAAATTGAGGAATTCTATGTGAAATACAAAACCTGTAA
PTAFR	01p35.3	CCAGTCTCATCATCCACATCTTCATCGT	GTTTCTTCTTCTGGTCTTCTCATCATCCTTCTTCTGCA
MX11	10q25.2	GAAAGCACAGAGTTCTCCATGGAGAA	GTGGACAATATAAGTACCACCAGCATCAGTGACATTGATGACC
SH3BP5L	01q44	GCTGCACAACGCTGCTCGAGAAATGGTGT	TTGTGGCTGAGCAGGGCGTCATGGCTGACAAGAACCAGCTGGA
JAG1	20p12.2	CTTGTGCCTTTGGAGCGACCTGT	GTGGATGAGATCAATGGCTACCGGTGTGTCTGCCCTCC
LIN9	01q42.12	CCTTTGGACAAAACAGCGCCTTCTCGAT	TTTTATGACCCACCACGGTTACATTATACTCCTCCTCT
PINX1	08p23.1	CACCTGGGACTCGGAGCTACCATCAAT	AATGAAGTGAGCAGCAGTGTGTGCCTCCTGGGTGTCTTTG
RPE65	01p31.2	CTTCTCCTTTCAACCTCTTCCATCACA	TCAACACCTATGAAGACAATGGGTTTCTGATTGTGGATCTCTG
FGFR1	08p11.23	GCTGACTCCAGTGATCCATGAACTCT	GGGGTTCTTCTGGTTCGGCCATCACGGCTCT
APC	05q22.2	CCTGCTGTAAGTCTTCACTTTAGATTTAGTT	GGGCCACAAGTGCTCTCATGCAGCCTTTTATAGAGCATAG
ZNF25	10p11.1	CGATGAGTTGGGAAATCTCTTACTGAAAT	AATCCTTCAAAACAATCAGATAATTCACACAAGAGGTACACCTT
KIF14	01q32.1	CTATGAGAAGCTAGCAGCACCCTCTAGTA	AAGAGCCTTCAAGGCTTCAATACCTGTCTTTTGTCTATGGTCAG
KLF6	10p15.1	CATTGCCCTCCCTGAATGCATCAA	ATACTTCTTCCAAGGACTGACAAAACAACCCCCGGCT
NTNG1	01p13.3	CCTCTCCAGTTAACATCACTCTGTCT	TGGAGCAAAACCATTGAGCTAACAGACAACATAGTTATTACCT
PYGB	20p11.21	CGACTTGGAGGAACTCGAGGAGATAGAAGAA	GATGCTGGCCTTGGGAATGGAGGCCTGGGAGGCTGG
MYOT	05q31.2	CTCCAGGAGAAATTTTACCCACCACGTT	TCATTCAAGTGCCAGAGAACATGTGATTGATGAAGGAAGATTG
SUFU	10q24.32	CCAAAGAGTACAGCTGGCCTGAAAAGA	AGCTGAAGGTCTCCATCTGCCTGACGTGGTGTTCGACAG
GNRH1	08p21.2	CTGAAGAGGAACTGGGCAGAAGAAGATTTAAA	TCCATTGGGCCAGAAGGAATGACCATTACTAACATGACTT
PTP4A3	08q24.3	CGTTCAAAGACCCACACACGCACA	AGACCCGGTGTGCGTTATGTAGCTCAGGACCTTGGCTGGG
GNRHR	04q13.2	CGAGCACGGCTGAAGACTCTAAAAATGAC	GGTTGCATTTGCCACTTCATTTACTGTCTGCTGGACTC
PTCH2	01p34.1	CCTGAGAACGCTTCCCAGCAGATCCA	TGCCTTCTCCTCCACCACCTGGATGACATCCTGCATG
NEBL	10p12.31	CCTGGTAGACCTCTGGGATCCTTT	TCTGTTCACTCACACACCCTGAGATAAGGAGTGAAGTGTGGGCTA

Tabelle 3-3: Sequenzen der MLPA-Sonden
Chr. Pos. = Chromosomenposition

Das SALSA MLPA P303 Kit wird eigentlich zur genetischen Diagnostik bei Medulloblastomen genutzt. Da das MLPA Kit, welches für die Analyse von Wilms-Tumoren erhältlich ist, jedoch so viele verschiedene Primer hat, dass es für die Anwendung an Formalin-fixiertem, Paraffin-gebettetem Gewebe (FFPE) zu umfangreich ist, wurde für diese Arbeit das oben genannte Kit genutzt. Dies ist möglich, da in beiden Kits jeweils vier Sonden mit Zielsequenzen auf Chromosom 1q enthalten sind, sodass die Auswahl für die Fragestellung dieser Arbeit nicht relevant ist. Die vier Sonden, deren Zielsequenzen auf Chromosom 1q liegen, sind in der obenstehenden Tabelle farblich hervorgehoben.

Die PCR Primersequenz ist in allen Sonden gleich und ist in folgender Tabelle dargestellt.

Name	Sequenz
Forward Primer X	GGGTTCCCTAAGGGTTGGA
Backward Primer Y	TCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC

Tabelle 3-4: Sequenz der PCR Primer

Name und Sequenz des universellen Primerpaares, Angabe in 5'-3'-Richtung.

Um die MLPA durchführen zu können, mussten drei verschiedene, so genannte Mastermixlösungen hergestellt werden. Die Zusammensetzung dieser Lösungen pro Probe ist in der folgenden Tabelle dargestellt.

Mastermix 1 (für die DNA Hybridisierung)	1,5 µl MLPA Puffer
	1,5 µl MLPA Sonden
Mastermix 2 (für die Ligation)	25 µl dH ₂ O
	3 µl Ligase Puffer A
	3 µl Ligase Puffer B
	1 µl Ligase-65 Enzym
Mastermix 3 (für die Polymerase Chain Reaktion (PCR))	7,5 µl dH ₂ O
	2 µl SALSA PCR Primer Mix
	0,5 µl SALSA Polymerase

Tabelle 3-5: Zusammensetzung der Mastermixlösungen für die MLPA
Mengenangaben je Probe

Des Weiteren gibt es ein Programm für den Thermocycler, nach dem bei der MLPA vorgegangen wird. Dieses ist in der folgenden Tabelle zu finden.

DNA Denaturierung	1. 98°C	5 Minuten
	2. 25°C	Pause
Hybridisierungsreaktion	3. 95°C	1 Minute
	4. 60°C	Pause
Ligationsreaktion	5. 54°C	Pause
	6. 54°C	15 Minuten
	7. 98°C	5 Minuten
	8. 20°C	Pause
PCR Reaktion	9. 35 Zyklen von:	95°C 30 Sekunden 60°C 30 Sekunden 72°C 60 Sekunden
	10. 72°C	20 Minuten
	11. 15°C	Pause

Tabelle 3-6: Thermocyclerprogramm für die MLPA

Für die MLPA wurden jeweils 5 µl Probenlösung mit 100 ng DNA verwendet. Um die DNA zu denaturieren, wurde das Mikroreaktionsgefäß bei 98°C für 5 Minuten in den

Thermocycler gegeben und dort anschließend wieder auf 25°C herunter gekühlt. Anschließend wurden für die Hybridisierung der MLPA Sonden mit der Probe 3 µl des Mastermix 1 hinzugegeben und das Thermocyclerprogramm mit einer einminütigen Inkubation bei 95°C fortgesetzt. Darauf folgten 16-20 Stunden bei 60°C, um das Annealing zu ermöglichen.

Am nächsten Tag wurde die Probe im Thermocycler auf 54°C herunter gekühlt und dann 32 µl des Mastermix 2 hinzugegeben. Danach wurde das Programm mit einer 15-minütigen Inkubation bei 54°C für die Ligation fortgesetzt. Um anschließend das Ligase-65 Enzym zu inaktivieren, folgten fünf Minuten bei 98°C, nach welchen die Probe auf 20°C herunter gekühlt wurde.

Um daraufhin die PCR zu starten, wurden 10 µl des Mastermix 3 zu der Probe hinzugegeben. Danach wurde das Thermocyclerprogramm mit 30 Sekunden bei 95°C für eine erneute Denaturierung fortgesetzt. Anschließend folgten 30 Sekunden bei 60°C, um das Binden der Primer an die DNA zu ermöglichen und 60 Sekunden bei 72°C für die Elongation der entsprechenden Sequenzen. Diese drei Schritte wurden 35 Mal wiederholt, um ausreichend Material zu amplifizieren. Abschließend folgten eine 20-minütige Inkubation bei 72°C und das Herunterkühlen der Probe auf 15°C.

Zur Analyse der Ergebnisse erfolgte danach eine Kapillarelektrophorese mithilfe des ABI Prism 3500 der Firma Life Technologies™, Carlsbad, USA. Hierfür wurden jeweils 0,7 µl des Probenmaterials mit 0,3 µl des Farbstoffes ROX und 9 µl HiDi Formamide gemischt. Dann wurde die Platte versiegelt, die Probe für drei Minuten bei 86°C inkubiert und anschließend für zwei Minuten bei 4°C gekühlt. Das für die Kapillarelektrophorese verwendete Modul war die FragmentAnalysis. Hierbei wurde erst eine Injektionsspannung von 1,6 kV für 15 Sekunden angelegt. Anschließend erfolgte der Durchlauf mit einer Spannung von 15 kV für 1800 Sekunden bei 60°C Ofentemperatur.

Mithilfe der Software Coffalyser wurden anschließend die Ergebnisse der Kapillarelektrophorese analysiert.

Die Durchführung der MLPA erfolgte als Auftragsarbeit im neuropathologischen Institut der Universität Bonn. Die dabei entstandenen Rohdaten werteten wir anschließend aus und korrelierten die Ergebnisse mit der Histologie der Gewebeproben.

3.2.3 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung im Rahmen dieser Arbeit wurde der Kaplan-Meier Schätzer genutzt. Dieses Vorgehen ermöglicht es, das Überleben mehrerer Patientengruppen in Bezug auf ein bestimmtes Ereignis im Verlauf der Zeit zu vergleichen und grafisch darzustellen (Kaplan und Meier 1958; Rich et al. 2010).

Um die statistische Relevanz der Ergebnisse bewerten zu können, wurde außerdem ein Log-rank Test durchgeführt. Hierbei wurde ein p-Wert $< 0,05$ als signifikant gewertet.

Die statistische Auswertung erfolgte in Zusammenarbeit mit der SIOP-2001/GPOH-Studienzentrale in Homburg/Saar.

4 Ergebnisse

4.1 Ergebnisse der MLPA

Wie bereits in Abschnitt 3.1.1 beschrieben, wurden im Rahmen dieser Arbeit zuerst 98 Fälle mit hohem Malignitätsgrad aus den Jahren 2002 – 2012 als Testgruppe analysiert. Um eine Vergleichsmöglichkeit zur Gesamtheit der Wilms-Tumoren zu haben, wurden anschließend zusätzlich alle Fälle, die im Jahr 2007 in die SIOP-2001/GPOH-Studie aufgenommen wurden, als Validierungsgruppe analysiert. Dies entsprach noch einmal 81 Fällen.

Folgende Tabelle stellt die Anzahl der Fälle, bei denen im Rahmen der MLPA ein Zugewinn auf Chromosom 1q nachgewiesen werden konnte, dar.

Histologischer Typ	Testgruppe mit 1q Zugewinn (n=98)	Validierungsgruppe mit 1q Zugewinn (n=81)
Alle	45 % (44/98)	58 % (47/81)
Blastemreich	53 % (17/32)	64 % (7/11)
Diffuse Anaplasie	67 % (14/21)	60 % (6/10)
Mischtyp	33 % (12/36)	70 % (16/23)
Epithelreich	0 % (0/4)	60 % (3/5)
Stromareich	0 % (0/2)	38 % (5/13)
Regressiv	0 % (0/1)	53 % (10/19)
Erwachsener Patient	50 % (1/2)	-

Tabelle 4-1: Häufigkeit des Zugewinns auf Chromosom 1q in Bezug auf den histologischen Typ

Wie aus der Tabelle ersichtlich wird, konnte in der Testgruppe in 45 % der Fälle ein Zugewinn auf Chromosom 1q nachgewiesen werden. Vor allem bei den blastemreichen Tumoren (53 %) und bei denen mit diffuser Anaplasie (67 %) konnte ein Zugewinn gefunden werden.

In der Validierungsgruppe konnte bei 58 % der Fälle ein Zugewinn auf Chromosom 1q nachgewiesen werden. Dieser Zugewinn war im Gegensatz zur Testgruppe jedoch

nicht hauptsächlich bei den blastemreichen und den Tumoren mit diffuser Anaplasie nachweisbar, sondern auch bei allen anderen histologischen Typen zu finden.

4.2 Statistische Ergebnisanalyse der Testgruppe

Um die Ergebnisse der MLPA in Relation zu dem Krankheitsverlauf des jeweiligen Patienten setzen zu können, wurden Kaplan-Meier Kurven erstellt (vgl. Abschnitt 3.2.4). Hierbei wurde jeweils das ereignisfreie Überleben (EFS) betrachtet. Als Ereignis zählten ein Rezidiv der Erkrankung oder der Tod des Patienten.

In folgender Abbildung sind die Kaplan-Meier Kurven der Testgruppe mit und ohne Zugewinn auf Chromosom 1q dargestellt.

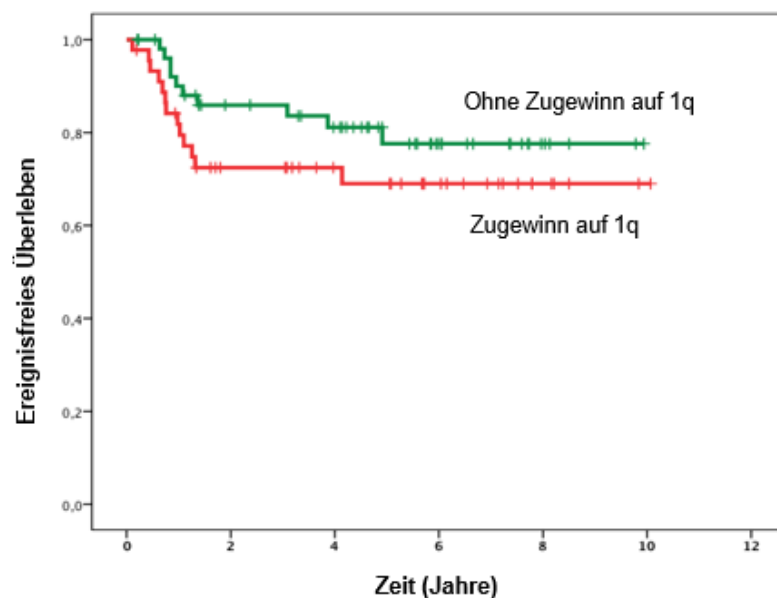


Abbildung 4-1: EFS der Testgruppe mit/ohne Zugewinn auf 1q

Das 5-Jahres-EFS betrug 71 % bei der Gruppe mit einem Zugewinn auf 1q und 81 % bei der ohne. Dieser Unterschied ist statistisch nicht signifikant ($p=0,214$).

Damit diese Ergebnisse mit der bisher genutzten Methode der histologischen Bewertung der Tumore verglichen werden können, zeigt folgende Abbildung das EFS für die Testgruppe, unterteilt in intermediären und hohen Malignitätsgrad anhand der Histologie.

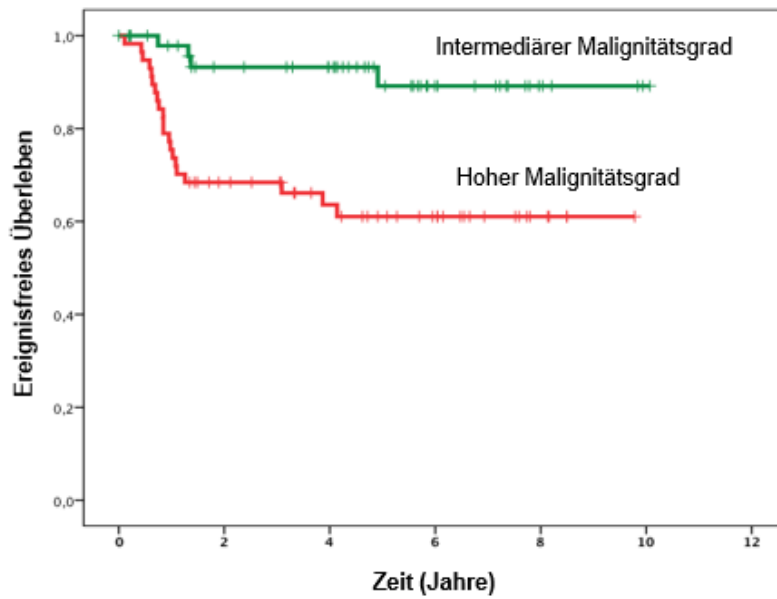


Abbildung 4-2: EFS der Testgruppe nach histologischem Malignitätsgrad

Bei dieser Einteilung zeigt sich ein deutlicher Unterschied im EFS. Während dieses in der Gruppe mit intermediärem Malignitätsgrad 92 % beträgt, liegt es bei den Tumoren mit hohem Malignitätsgrad nur bei 63 %. Dieser Unterschied ist statistisch signifikant ($p=0,001$).

4.3 Statistische Ergebnisse der Validierungsgruppe

Auch die Ergebnisse der MLPA der Validierungsgruppe (alle im Jahr 2007 in die Studie aufgenommene Patienten) wurden mithilfe des Kaplan-Meier Schätzers analysiert.

Folgende Abbildung zeigt die entstandenen Kurven für das EFS der Validierungsgruppe mit und ohne Zugewinn auf Chromosom 1q.

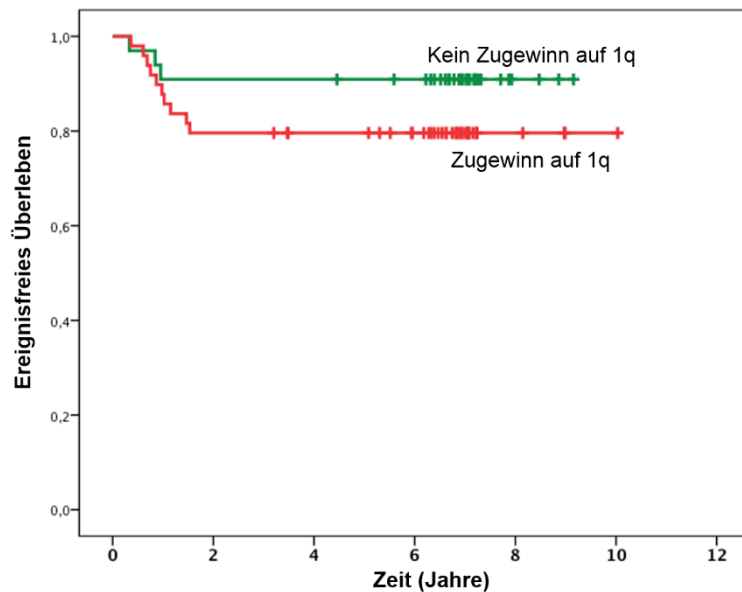


Abbildung 4-3: EFS der Validierungsgruppe mit/ohne Zugewinn auf 1q

Das EFS betrug bei Tumoren mit Zugewinn auf 1q 80 % und bei denen ohne 91 %. Dies ergibt lediglich einen statistisch insignifikanten Unterschied ($p=0,188$).

Auch in der Validierungsgruppe wurden die Tumore noch einmal anhand der histologischen Kriterien in intermediären und hohen Malignitätsgrad eingeteilt. Das Ergebnis der Analyse ist in der folgenden Abbildung zu sehen.

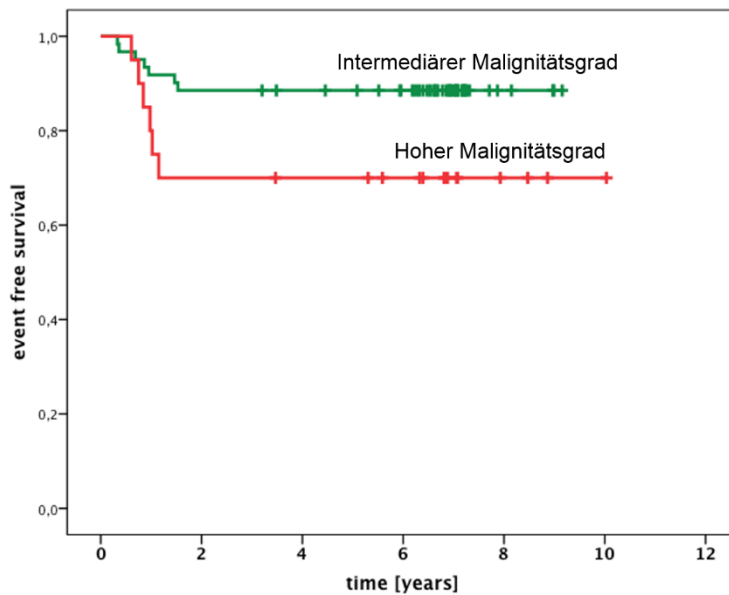


Abbildung 4-4: EFS der Validierungsgruppe nach histologischem Malignitätsgrad

Mit einer EFS von 88 % bei den Tumoren mit intermediärem Malignitätsgrad und 70 % bei denen mit hohem, konnte hier ein signifikanter Unterschied im Überleben der Patienten nachgewiesen werden ($p=0,048$).

Da in der Testgruppe vor allem in den blastemreichen Tumoren ein hoher Anteil an Tumoren mit einem Zugewinn auf 1q nachgewiesen wurde, wurden auch die Tumore der Validierungsgruppe in Hinsicht auf die Menge an Blastem analysiert. Hierbei fiel vor allem bei den Tumoren mit intermediärem Malignitätsgrad und einer geringen Menge an Blastem (weniger als 20ml) ein Unterschied hinsichtlich der Überlebensraten auf. Diese Gruppe ist in der folgenden Abbildung dargestellt.

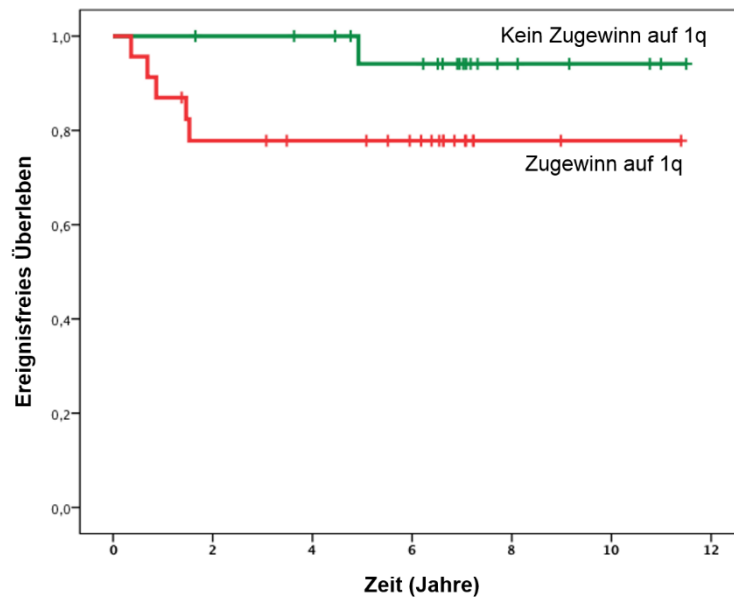


Abbildung 4-5: EFS der Tumore intermediärer Malignität mit weniger als 20ml Blastem mit/ohne Zugewinn auf 1q

Es zeigte sich, dass in dieser Gruppe das EFS bei den Tumoren ohne Zugewinn auf 1q 95 % betrug. Bei den Tumoren mit einem Zugewinn betrug das EFS lediglich 78 %. Dieser Unterschied erwies sich jedoch nicht als signifikant ($p=0,347$).

In den anderen histologischen Untergruppen konnte ein solcher Unterschied gar nicht nachgewiesen werden. Dies kann jedoch durch die geringe Zahl der untersuchten Tumore pro Untergruppe bedingt sein.

5 Diskussion

5.1 Methodik

Da im Rahmen dieser Arbeit präoperativ chemotherapiertes Tumorgewebe untersucht wurde und die Ergebnisse mit Arbeiten, in denen primär operiertes Gewebe analysiert wurde, verglichen werden sollen, stellt sich als Erstes die Frage, ob die Chemotherapie eine Auswirkung auf die untersuchte DNA haben kann und es dadurch zu Verfälschungen der Ergebnisse gekommen sein könnte. Hierzu ist es notwendig, die Wirkweise der verwendeten Chemotherapeutika und ihren möglichen Einfluss auf die DNA des Gewebes zu kennen.

Wie in Abschnitt 3.1 beschrieben kommen bei der Chemotherapie des Wilms-Tumors in Deutschland Vincristin, Actinomycin D und Doxorubicin zum Einsatz.

Vincristin hemmt die Zellteilung durch eine Anheftung an Tubulin und eine Verhinderung der Ausbildung von Mikrotubuli (Burdach, Stefan E. G et al. 2007). Bei diesem Mechanismus ist somit keine Alteration der Zell-DNA zu erwarten.

Actinomycin D (oder Dactinomycin) ist ein zytostatisches Antibiotikum, welches durch eine Interkalierung mit der DNA dafür sorgt, dass die RNA-Synthese durch die RNA-Polymerase verhindert wird. Zudem kann es zu Einzelstrangbrüchen der DNA kommen (Lüllmann et al. 2010). Durch diese Wirkweise kann zwar die Zell-DNA in mehrere Teile zerfallen, es kommt jedoch zu keinen Alterationen im Sinne eines Zugewinns oder einer Deletion.

Auch Doxorubicin (oder Adriamycin) gehört zu den zytostatischen Antibiotika und bewirkt eine Interkalierung der DNA und eine Hemmung der DNA-Synthese (Lüllmann et al. 2010). Eine Alteration der DNA und somit eine Verfälschung der Ergebnisse dieser Arbeit ist jedoch auch durch Doxorubicin nicht zu erwarten.

Insgesamt kann gesagt werden, dass die präoperativ erfolgte Chemotherapie die Ergebnisse der DNA-Analyse nicht beeinflusst haben sollte, da geschädigte Zellen in der Regel durch Apoptose zugrunde gehen und die dadurch zerstörte DNA von den Primern der MLPA nicht miterfasst werden kann.

Segers et al. konnten im Rahmen ihrer Arbeit aus dem Jahr 2013, bei welcher sowohl primär operierte als auch primär chemotherapierte Gewebeproben untersucht wurden (vgl. Abschnitt 5.2), ebenso keinen Unterschied in der Häufigkeit eines Zugewinns auf Chromosom 1q zwischen den beiden untersuchten Gruppen finden (Segers et al. 2013). Dies unterstützt die Aussage, dass eine präoperativ erfolgte Chemotherapie den Karyotyp des Tumors nicht verändert.

Im Gegensatz zum Karyotyp wird jedoch die Histologie des Tumors durch die präoperativ erfolgte Chemotherapie sehr wohl verändert (Gadner et al. 2006). Dies ist dadurch zu erklären, dass die Therapie zu einem Untergang des auf Vincristin, Actinomycin D und Doxorubicin sensiblen Gewebes führt und somit nur die resistenten Tumoranteile anschließend vitale Zellen enthalten. Bei der Auswertung dieser Arbeit muss also beachtet werden, dass vor allem die Gewebeanteile, die gegenüber der Chemotherapie resistent waren, anhand der erfolgten Analyse erfasst wurden. Diese Resistenz korreliert jedoch nicht unbedingt mit der Malignität des Gewebes, da vor allem differenziertes Gewebe, also stromale und epitheliale Tumoranteile, welche mit einer guten Prognose für den Patienten einhergehen, auch nach der Chemotherapie noch vital sein kann (Verschuur et al. 2010; Weirich et al. 2001).

5.2 Ergebnisse im wissenschaftlichen Kontext

Um die Ergebnisse dieser Arbeit bewerten zu können, ist es wichtig, sie in einen Zusammenhang mit anderen wissenschaftlichen Arbeiten zu dem untersuchten Thema zu stellen.

Bereits 2001 gelang Hing et al. der Nachweis eines Zusammenhangs zwischen einem negativen Verlauf der Erkrankung am Wilms-Tumor und einem Zugewinn auf Chromosom 1q (Hing et al. 2001). Im Rahmen ihrer Arbeit wurden 58 Tumorproben von Patienten mit Rezidiv und 21 Proben von rezidivfreien Patienten analysiert, wobei das untersuchte Material aus primär entnommenem und somit nicht chemotherapiertem Gewebe stammte. Dabei zeigte sich bei über 70 % aller Proben eine Veränderung des genomischen Materials, unabhängig ob die Probe aus einem Tumor mit oder ohne Rezidiv war. Bei diesen Veränderungen handelte es sich in der Mehrzahl der Fälle um einen Zugewinn an genetischem Material. Die häufigste Veränderung war ein Zugewinn auf Chromosom 1q in der Gruppe der Patienten, die

ein Rezidiv erlitten hatten (Nachweis eines Zugewinns in 59% der Fälle im Vergleich zu 24% bei den Patienten ohne Rezidiv). Dies war mit $p=0,019$ ein signifikanter Unterschied zu der rezidivfreien Gruppe. Die meisten untersuchten Tumore zeigten einen Zugewinn des gesamten Chromosom 1q, aber in sechs Tumoren konnte auch ein Zugewinn einer isolierten Region auf 1q, nämlich 1q21-25, beobachtet werden. Ein entscheidender Unterschied zu der hier vorliegenden Arbeit besteht darin, dass Hing et al. nur Tumormaterial mit günstiger Histologie, das heißt ohne Anaplasie, in ihre Untersuchung eingeschlossen haben. Zudem wurde, wie bereits oben beschrieben, nur primär entnommenes Gewebe, das heißt ohne vorherige Chemotherapie, untersucht. Aufgrund dieser Unterschiede und der alleinigen Konzentration auf das Auftreten eines Rezidivs bei der Bewertung eines negativen Verlaufs der Erkrankung, fällt es schwer, die Arbeit von Hing et al. mit der hier vorliegenden Arbeit zu vergleichen. Die Tatsache, dass bereits 2001 ein Zusammenhang zwischen einem Zugewinn auf Chromosom 1q und einer negativen Prognose bei Tumoren mit günstiger Histologie vermutet wurde, ist jedoch bemerkenswert und könnte auf eine Relevanz dieser genetischen Alteration für die Prognose der Erkrankung hindeuten.

In den darauf folgenden Jahren konnte in einigen Arbeiten kein Zusammenhang zwischen einem Zugewinn auf Chromosom 1q und einer schlechten Prognose nachgewiesen werden (Bown et al. 2002; Kullendorff et al. 2003). Im Rahmen der Arbeit von Bown et al. wurden die genetischen Eigenschaften von Gewebeproben der letzten zwölf Jahre rückblickend mit den Daten der U.K. Children's Cancer Study Group verglichen. Dabei zeigte sich, dass von 127 abnormen Karyotypen, 78 wiederholt Eigenschaften für eine schlechte Prognose aufwiesen. Ein signifikanter Zusammenhang zwischen einer schlechten Prognose und einer genetischen Veränderung konnte lediglich für den Verlust von Chromosom 22 gezeigt werden. Der Zusammenhang zwischen dem Risiko für ein Rezidiv und einem Zugewinn auf Chromosom 1q stellte sich als nicht signifikant dar (Bown et al. 2002). Kullendorff et al. untersuchten 2003 43 Gewebeproben von 39 verschiedenen Patienten, die primär chemotherapiert worden waren. Hierbei gelang der Nachweis eines signifikanten Zusammenhangs zwischen Rezidiven und einem abnormen Karyotyp ($p<0,01$). In acht Gewebeproben konnte ein Zugewinn auf Chromosom 1q nachgewiesen werden, dieser zeigte jedoch keinen signifikanten Zusammenhang mit der Prognose des jeweiligen Patienten (Kullendorff et al. 2003).

Anderen Autoren gelang der Nachweis einer Assoziation zwischen einem Zugewinn auf Chromosom 1q und einer erhöhten Rezidivhäufigkeit bei Wilms-Tumoren ohne Anaplasie (Natrajan et al. 2006). Natrajan et al. analysierten 76 Gewebeproben aus primär operierten Tumoren, wobei 37 hiervon aus Rezidivtumoren stammten. Es wurden lediglich Tumore mit günstiger Histologie in die Untersuchung eingeschlossen. Es gelang der Nachweis eines signifikanten Zusammenhangs zwischen einem Zugewinn auf Chromosom 1q und einer negativen Prognose, wobei in den betroffenen Tumoren häufig weitere genetische Mutationen gefunden wurden, vor allem ein Verlust auf Chromosom 1p und/oder 16q zeigte sich ebenfalls (Natrajan et al. 2006).

Perotti et al. analysierten im Rahmen einer 2012 veröffentlichten Arbeit die Gewebeproben von 77 Patienten mit Wilms-Tumor mithilfe einer Einzelnukleotid-Polymorphismus (SNP) Analyse des gesamten Genoms (Perotti et al. 2012). In dieser Arbeit wurden auch Tumore mit ungünstiger Histologie eingeschlossen, sodass 7 % der untersuchten Gewebeproben eine Anaplasie aufwiesen. Die Entnahme des Materials erfolgte bei Diagnose, das heißt vor Chemotherapie. Ein Zugewinn auf Chromosom 1q konnte als unabhängiger prognostischer Faktor für einen negativen klinischen Verlauf nachgewiesen werden ($p=0,006$).

Im Jahr 2013 wurden zwei Arbeiten veröffentlicht, in denen ebenfalls die Methode der MLPA für die Analyse genutzt wurde und die sich mit dem Thema des Zugewinns auf 1q im Hinblick auf die Prognose des Wilms-Tumors befassen haben.

Die erste dieser Arbeiten ist von Gratijs et al. im Rahmen der Untersuchungen der National Wilms Tumor Study Group (NWTSG) veröffentlicht worden (Gratijs et al. 2013). Analysiert wurden dabei die Proben von 212 Tumoren mit günstiger Histologie, das heißt wieder ohne Anaplasie. Zudem waren die Tumoren primär operiert und somit nicht vorher chemotherapiert worden. Bei 27 % der Proben konnte ein Zugewinn auf Chromosom 1q nachgewiesen werden. Das EFS nach acht Jahren betrug für die Patienten mit einem Zugewinn auf 1q 76 % im Gegensatz zu 93 % bei den Patienten ohne Zugewinn auf 1q ($p=0,0024$). Dieser Unterschied ist somit statistisch signifikant. Auch beim Gesamtüberleben zeigte sich mit 89 % bzw. 98 % ein Unterschied zwischen den beiden analysierten Gruppen, welcher mit $p=0,067$ jedoch nicht statistisch signifikant war. Insgesamt kann also gesagt werden, dass im Rahmen der Arbeit von Gratijs et al. erneut der Nachweis eines Zusammenhangs zwischen einem Zugewinn

auf Chromosom 1q und einer schlechteren Krankheitsprognose gelungen ist. Da jedoch wieder nur Tumore mit günstiger Histologie in die Untersuchung eingeschlossen wurden, kann dieser Nachweis nicht auf alle Wilms-Tumore übertragen werden. Zudem wurden auch hier wieder primär operierte Proben analysiert, sodass die Ergebnisse nicht direkt auf die in Deutschland behandelten Patienten übertragbar sind (vgl. Abschnitt 3.1.1).

In einer weiteren Arbeit konnten Segers et al. 2013 ebenfalls einen Zusammenhang zwischen einer schlechten Prognose und einem Zugewinn auf Chromosom 1q beim Wilms-Tumor zeigen (Segers et al. 2013). Die Autoren analysierten Gewebeproben von 331 Patienten, von denen ca. eine Hälfte primär operiert und die andere präoperativ chemotherapiert worden waren. Im Gegensatz zu den vorhergehenden Arbeiten wurden dabei zudem nicht nur Wilms-Tumore mit günstiger Histologie untersucht, sondern auch 22 Gewebeproben mit Anaplasie. Mittels MLPA konnte bei 19 % der untersuchten Proben ein Zugewinn auf Chromosom 1q nachgewiesen werden. Unabhängig von anderen klinischen Parametern gelang den Autoren dabei der Nachweis, dass dieser Zugewinn sowohl für das EFS als auch für das Gesamtüberleben (OS) ein signifikanter negativer prognostischer Faktor war ($p=0,02$ bzw. $p=0,004$). Um diese Arbeit mit der hier vorliegenden zu vergleichen, ist es außerdem wichtig, die verschiedenen, untersuchten Untergruppen hinsichtlich des Nachweises eines Zugewinns auf Chromosom 1q zu betrachten. Von den 331 untersuchten Gewebeproben war bei 303 Proben bekannt, ob sie primär operiert wurden oder erst eine Chemotherapie erhalten haben. Bei den insgesamt 119 Gewebeproben aus primär operierten Tumoren konnte bei 26 ein Zugewinn auf Chromosom 1q nachgewiesen werden, entsprechend einer Quote von 22%. Bei den 184 präoperativ chemotherapierten Tumoren stellte sich dies mit 35 Gewebeproben mit Zugewinn auf 1q, welches 19% entspricht, sehr ähnlich dar. Eine weitere Untergruppe, deren Betrachtung zum Vergleich mit dem Ergebnis der vorliegenden Arbeit interessant erscheint, ist die Gruppe der Tumore mit Anaplasie. Diese umfasste in der Untersuchung von Segers et al. 22 verschiedene Gewebeproben, was 7% entsprach. Von diesen 22 Proben konnte bei 5 ein Zugewinn auf Chromosom 1q nachgewiesen werden, entsprechend 23% (Segers et al. 2013).

2016 wurde im Rahmen der Arbeit der SIOP von Chagtai et al. eine weitere Studie veröffentlicht, in welcher ein Zusammenhang zwischen einem Zugewinn auf Chromosom 1q und einer schlechten Prognose nachgewiesen werden konnte (Chagtai et al. 2016). Für diese Studie wurden die Gewebsproben von 586 präoperativ chemotherapierten Patienten mittels MLPA auf einen Zugewinn auf Chromosom 1q sowie weitere genetische Aberrationen (z. B. Verlust auf Chromosom 1p oder 16q) untersucht. Analysiert wurden Gewebsproben von Patienten mit lokal begrenzten Tumoren (Stadium I-IV, vgl. Abschnitt 3.1.1), wenn der Tumoranteil mindestens 50 % an der Probe betrug. Hierbei wurde keine Vorselektion getroffen, sodass die klinischen Charakteristika der Patienten in der Studie der Gesamtheit der registrierten Patienten mit präoperativer Chemotherapie und unilateralem Tumor entsprach. Dies stellt einen deutlichen Unterschied zur vorliegenden Arbeit dar, in welcher in der Testgruppe vor allem Gewebsproben von blastemreichen Tumoren untersucht wurden. Allerdings untersuchten Chagtai et al. auch das Gewebe von local oder diffus anaplastischen Tumoren, welche einen Anteil von knapp 18 % an der Gesamtzahl der untersuchten Gewebsproben ausmachten. Bei 28,5 % aller untersuchten Proben konnte ein Zugewinn auf Chromosom 1q nachgewiesen werden, der größte Anteil hiervon bei blastemreichen Tumoren (Unterschied statistisch nicht signifikant). Unabhängig von weiteren Parametern konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen einem Zugewinn auf Chromosom 1q und dem EFS bzw. dem OS nachgewiesen werden ($p < 0,001$ bzw. $p = 0,01$). Wurden weitere Parameter in die Analyse einbezogen, zeigte sich ein Zugewinn auf Chromosom 1q jedoch nur noch als negativer prognostischer Faktor für das EFS ($p = 0,002$) während für das OS kein signifikanter Zusammenhang nachgewiesen werden konnte. Auch bei der Analyse wichtiger Untergruppen (Patienten mit lokalisierten Tumoren der Stadien I-III bzw. mit lokalisierten, nicht-anaplastischen Tumoren) konnte nur ein signifikanter Zusammenhang zwischen einem Zugewinn auf Chromosom 1q und dem EFS, nicht aber dem OS nachgewiesen werden (Chagtai et al. 2016).

5.3 Schlussfolgerungen

Im Gegensatz zu den im Abschnitt 5.2 erwähnten Publikationen konnte im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit kein signifikanter Zusammenhang zwischen einer negativen Prognose des Wilms-Tumors und einem Zugewinn auf Chromosom 1q nachgewiesen werden. Die eingangs in Abschnitt 2 gestellte erste Frage kann im Hinblick auf die Ergebnisse dieser Arbeit somit verneint werden.

Ein Grund hierfür kann darin liegen, dass die beschriebenen Arbeiten größtenteils auf die Analyse von Tumoren mit günstiger Histologie beschränkt waren und daher keine Gewebeproben mit Anaplasie untersucht wurden. Wenn man davon ausgeht, dass in anaplastischem Gewebe besonders häufig ein Zugewinn auf Chromosom 1q vorliegt, wie es im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte, verändert sich durch den Einschluss von anaplastischen Gewebeproben in die Untersuchung sowohl der Anteil der Gewebeproben mit Zugewinn auf 1q bei der Validierungs- als auch bei der Testgruppe. Dies könnte dazu führen, dass ein zuvor beschriebener Zusammenhang in der vorliegenden Arbeit nicht mehr als statistisch signifikant gezeigt werden kann. Bei zwei der Arbeiten, in denen auch anaplastisches Gewebe untersucht wurde, lag der Anteil der Tumoren mit Anaplasie im Vergleich zu den insgesamt untersuchten Tumoren jeweils bei 7 % (Segers et al. 2013; Perotti et al. 2012). In der Arbeit von Chagtai et al. machten die Tumore mit Anaplasie knapp 18 % der insgesamt untersuchten Tumore aus (Chagtai et al. 2016). Damit stellten die Gewebeproben mit Anaplasie in den Arbeiten von Segers et al. und Perotti et al. einen deutlich geringeren Anteil an den Gesamtproben dar als in der vorliegenden Arbeit, bei welcher 21 % der Testgruppe bzw. 12 % der Validierungsgruppe Tumore mit diffuser Anaplasie waren (vgl. Abschnitt 4.1). Dieser Unterschied ist einerseits dadurch begründet, dass in der Testgruppe Tumore mit einem hohen Malignitätsgrad untersucht wurden, zu welchen auch solche mit einer diffusen Anaplasie als negativem prognostischem Faktor gehören. Die Tatsache, dass der prozentuale Anteil der Tumoren mit diffuser Anaplasie jedoch auch in der Validierungsgruppe höher als in den anderen Arbeiten (ausgenommen der von Chagtai et al.) war, lässt sich andererseits am ehesten dadurch erklären, dass im Rahmen der vorliegenden Arbeit nur präoperativ chemotherapierte Tumore untersucht wurden (vgl. Abschnitt 3.1). Diese These wird dadurch unterstützt, dass der Anteil anaplastischer Tumore an der Gesamtzahl der

untersuchten Gewebeproben in der Arbeit von Chagtai et al., in welcher auch nur präoperativ chemotherapierte Patienten untersucht wurden, zwischen den Zahlen der Test- und Validierungsgruppe dieser Arbeit liegt. Im Vergleich zu den beiden erstgenannten Arbeiten, welche nur primär operierte Tumore bzw. zu 50 % primär operierte Tumore untersucht haben, ist daher mit einer veränderten Histologie des untersuchten Gewebes zu rechnen (vgl. Abschnitt 5.1).

Ein weiterer Unterschied, der im Vergleich zu den Arbeiten anderer Autoren auffällt, ist, dass der Anteil an Gewebeproben mit einem Zugewinn auf Chromosom 1q im Vergleich zu solchen ohne in der vorliegenden Arbeit sehr viel höher ist als in anderen. Während im Rahmen dieser Arbeit bei 45 % der Testgruppe und bei 58 % der Validierungsgruppe ein Zugewinn auf Chromosom 1q nachgewiesen wurde, zeigten z.B. bei Segers et al. nur 19 % und bei Gratias et al. 27 % der untersuchten Proben diese Aberration (Segers et al. 2013; Gratias et al. 2013). Wenn man annimmt, dass ein Zugewinn auf Chromosom 1q einen negativen Prognosefaktor darstellt, könnte dieser Unterschied darauf hinweisen, dass vor allem Tumore mit einer solchen genetischen Aberration vermehrt resistent gegenüber Chemotherapie sind. Dies würde dann dazu führen, dass im Rahmen dieser Arbeit der Anteil an Proben mit einem Zugewinn auf Chromosom 1q höher war, weil besonders dieses Gewebe auch nach der Chemotherapie vital ist. Hiergegen spricht jedoch, dass in der Gruppe der präoperativ chemotherapierten Gewebeproben bei Segers et al. nur bei 19% und in der Arbeit von Chagtai et al. bei 28,5 % ein Zugewinn auf Chromosom 1q nachgewiesen werden konnte (vgl. Abschnitt 5.2). Es muss also weitere Gründe geben, die diese sehr unterschiedlichen Zahlen bedingen. Eine Möglichkeit ist, dass bei den Untersuchungen für die vorliegende Arbeit der Anteil von vitalem Tumorgewebe an der Gesamtprobe höher war als in den vorher publizierten Arbeiten. Dies ließe sich dadurch erklären, dass nur Gewebeblöcke mit mindestens 90% vitalem Tumorgewebe direkt analysiert wurden und alle Proben mit kleinerem Tumoranteil vorher makrodisseziert wurden (vgl. Abschnitt 3.2.1). Hierdurch wurde erreicht, dass ein möglichst großer Teil der analysierten DNA aus dem Tumor stammte, sodass die Sensitivität für die Detektion eines Zugewinns auf 1q höher als in den vorherigen Arbeiten war, bei welchen ein solches Vorgehen nicht beschrieben wurde. Zudem wurde, wenn Blastem vorhanden war, primär dieses makrodisseziert, um das Gewebe weiter zu untersuchen. Da besonders blastemreiche Tumoren zu einem hohen

Prozentsatz einen Zugewinn auf Chromosom 1q aufweisen (vgl. Abschnitt 4.1), kann dieses Vorgehen dazu geführt haben, dass der Anteil an Tumoren mit einem Zugewinn in dieser Arbeit sowohl in der Validierungs- als auch in der Testgruppe besonders hoch ist.

Zusätzlich zu den genannten Gründen muss außerdem der Aspekt der Tumorheterogenität bei der Interpretation der Daten berücksichtigt werden. Die bisher publizierten Arbeiten zu dem Thema der prognostischen Bedeutung eines Zugewinns auf Chromosom 1q haben vor allem die interindividuelle Tumorheterogenität betrachtet ohne dabei auf Unterschiede innerhalb der einzelnen Tumore einzugehen. Diese intraindividuelle Tumorheterogenität wurde jedoch bereits in vielen verschiedenen Tumoren nachgewiesen und kann weiter sogar in eine räumliche und eine zeitliche (die sogenannte Tumorevolution) Tumorheterogenität unterschieden werden (Song et al. 2015). So konnte z.B. in nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen, klarzelligen Nierenkarzinomen und Brustkarzinomen mithilfe der genetischen Analyse einzelner Regionen oder sogar einzelner Zellen sowohl eine räumliche als auch eine zeitliche Tumorheterogenität gezeigt werden (Bruin et al. 2014; Gerlinger et al. 2014; Wang et al. 2014). Da in den bisherigen Arbeiten bezüglich des Zugewinns auf 1q immer nur eine Probe des jeweils zu untersuchenden Tumors zu einem bestimmten Zeitpunkt analysiert wurde, ist es durchaus möglich, dass die intraindividuelle Tumorheterogenität ein Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse der Publikationen ist. Wenn man bei der analysierten Probe aus einem Tumor z.B. eine Region untersucht hat, in welcher die Mehrzahl der Zellen keinen Zugewinn auf Chromosom 1q aufweist, muss dies nicht zwangsläufig bedeuten, dass ein solcher Zugewinn nicht woanders in dem Tumor nachzuweisen wäre. Zudem kann es sein, dass der Tumor sich durch genetische Mutationen im zeitlichen Verlauf verändert und die genetische Analyse zu zwei verschiedenen Zeitpunkten unterschiedliche Ergebnisse ergeben könnte. Dies würde, wenn man den Zugewinn auf Chromosom 1q als prognostischen Faktor nutzen sollte, jeweils zu einer anderen Aussage bezüglich des Risikos für den Patienten und der Therapieentscheidung führen. Zudem kann es ein Grund dafür sein, dass der Anteil an Tumoren mit Zugewinn auf Chromosom 1q an der Gesamtzahl der untersuchten Gewebeproben in dieser Arbeit höher war als in den bisher erschienenen Publikationen.

Die zweite Frage, die im Rahmen dieser Arbeit beleuchtet werden sollte, war, ob es Möglichkeiten geben könnte, den Zugewinn auf Chromosom 1q für die individuelle Prognose und somit weitere Therapieentscheidung eines Patienten zu nutzen. Da kein signifikanter Zusammenhang zwischen einem Zugewinn auf Chromosom 1q und einem verringerten EFS nachgewiesen werden konnte, muss diese Frage auf Basis der vorliegenden Arbeit momentan erst einmal verneint werden. Wie in Abschnitt 4.3 beschrieben wurde, ist der Zusammenhang zwischen dem EFS und dem Malignitätsgrad der untersuchten Tumore jedoch signifikant, sodass die Histologie des entnommenen Gewebes zumindest auch vorerst ein verlässliches Prognoseinstrument zu sein scheint. Berücksichtigt man jedoch die Ergebnisse anderer Arbeiten, so scheint es in jedem Fall notwendig, weitere Untersuchungen im Bereich der Molekulardiagnostik durchzuführen, um so zukünftig eventuell weitere, verlässlichere Prognoseparameter zu entwickeln.

5.4 Ausblick

Da diese Arbeit bisher eine von lediglich zwei Untersuchungen ist, bei der ausschließlich Gewebeproben von primär chemotherapierten Patienten untersucht worden sind, scheint es sinnvoll, in diesem Bereich weiter zu forschen, um die Aussage einer nicht ausreichenden Signifikanz zu validieren oder zu widerlegen. Besonders im Bereich der Wilms-Tumore mit intermediärer Malignität und kleinem Blastemanteil, bei denen im Rahmen dieser Arbeit eine Tendenz zu einer schlechteren Prognose bei Zugewinn auf Chromosom 1q aufgefallen ist, könnte eine weitere Untersuchung sinnvoll sein, da es sich hier nur um eine Untergruppe mit sehr kleiner Fallzahl handelte. Genauso sollten die anderen Untergruppen separat mit größeren Fallzahlen analysiert werden, um eventuell übersehene Zusammenhänge mithilfe aussagekräftigerer Testgruppen aufdecken zu können.

In Bezug auf die in Abschnitt 5.3 erwähnte Tumorerogenität scheint es außerdem notwendig, weitere Untersuchungen mit mehreren Gewebeproben desselben Tumors sowie im zeitlichen Verlauf der Erkrankung durchzuführen. Dies würde eine Aussage über die intraindividuelle genetische Heterogenität der Wilms-Tumore ermöglichen und könnte zudem zeigen, wie viele Proben eines einzelnen Tumors benötigt werden, um ein zuverlässiges Ergebnis hinsichtlich eines Zugewinns auf Chromosom 1q zu

erhalten. Besonders vor dem Hintergrund, dass diese Eigenschaft des Tumors zur Krankheitsprognose und Therapieentscheidung genutzt werden könnte, ist es dringend notwendig, eine zuverlässige Aussage treffen zu können.

Eine weitere Frage, die man sich stellen kann, ist, ob die Genexpression im Rahmen des Wilms-Tumors nicht vielleicht noch bedeutender ist als der Genstatus des jeweiligen Gewebes. So gelang Lu et al. bereits 2002 in einer Untersuchung mit einer kleinen Fallzahl von 18 Tumorproben der Nachweis, dass unabhängig vom chromosomalen Status alle untersuchten Tumore mit Rezidiv die Gene auf Chromosom 1q überexprimierten (Lu et al. 2002). Auch Huang et al. konnten nachweisen, dass einige Gene auf Chromosom 1q bei Tumorrezidiven im Vergleich zur gesamten Gruppe hochreguliert sind (Huang et al. 2009). Im Rahmen ihrer Arbeit wurde jedoch das gesamte Genom untersucht und die Prognosefaktoren waren nicht für alle Tumorstadien anwendbar. Außerdem wurden bei beiden Studien erneut nur Tumore mit günstiger Histologie, die primär operiert wurden, inkludiert. Insgesamt wird aber deutlich, dass viele weitere Untersuchungen und die Identifikation verantwortlicher Gene notwendig sind, um zuverlässige Prognosefaktoren für die Therapie des Wilms-Tumors zu entwickeln.

Obwohl der Zusammenhang zwischen einem Zugewinn auf Chromosom 1q und einer negativen Prognose des Wilms-Tumors in dieser Arbeit nicht als signifikant gezeigt werden konnte und das Erkrankungsstadium bei Diagnose sowie die postoperative Histologie des Tumors weiterhin die verlässlichsten Prognoseparameter zu sein scheinen, ist es notwendig, weiter auf dem Gebiet der Molekulargenetik zu forschen, um die Zuverlässigkeit der Prognose und somit das Therapieergebnis für die Patienten zu verbessern. Hierbei sollte einerseits der Einfluss eines Zugewinns auf Chromosom 1q auf die Prognose der Erkrankung weiter beleuchtet werden, andererseits aber auch der Effekt von Mutationen auf anderen Genorten beachtet werden. Da die Forschung auf Molekularebene immer weiter voranschreitet, scheint es auf diesem Gebiet noch sehr viele unerkannte Zusammenhänge zu geben, welche zukünftig eventuell für die Therapie- und Prognoseverbesserung im Sinne der Patienten genutzt werden können.

Nach der Identifikation zuverlässiger Prognoseparameter auf molekulargenetischer Ebene bestünde zudem eine weitere Aufgabe darin, klinisch praktikable

Analysemöglichkeiten zu entwickeln, welche es ermöglichen, die Gewebeproben jedes Patienten möglichst kostengünstig, schnell und zuverlässig zu untersuchen.

6 Zusammenfassung

Der Wilms-Tumor ist der häufigste Nierentumor bei Kindern, an dem ungefähr eins von 10.000 Kindern erkrankt. Das durchschnittliche Erkrankungsalter liegt dabei zwischen 2 und 5 Jahren. Durch die Arbeit internationaler Studienzentralen und die Verbesserung der Therapiemöglichkeiten beträgt die Langzeitüberlebensrate des Wilms-Tumors heute 90 %. Trotz dieser guten Zahlen muss es das nächste Ziel sein, Rezidive und Todesfälle zu verhindern und die Spätfolgen der Therapie so gering wie möglich zu halten. Daher ist es wichtig, zuverlässige Prognoseparameter zu finden, mit denen die Therapie individuell festgelegt werden kann.

Bisher besteht die Therapie in Deutschland in einer neoadjuvanten Chemotherapie mit anschließender operativer Tumorsektion, der wiederum eine Chemotherapie folgt. Der Umfang und die Dauer der ersten Chemotherapie werden dabei durch die Tumorausbreitung festgelegt. Nach der chirurgischen Intervention erfolgt dann eine histologische Befundung des Gewebes, welche über die abschließende Therapie entscheidet. Es werden bisher also noch keine molekulargenetischen Parameter genutzt, um das Risiko bzw. die Prognose des jeweiligen Patienten zu bestimmen.

In den letzten Jahren sind mehrere Veröffentlichungen erschienen, in denen ein Zusammenhang zwischen einem Zugewinn auf dem langen Arm von Chromosom 1 und einer schlechteren Prognose des Wilms-Tumors nachgewiesen werden konnte. Diese Veröffentlichungen wurden größtenteils an Tumoren mit günstiger Histologie, welche primär operativ entfernt wurden, durchgeführt. Zu dieser primären Operation kommt es dadurch, dass es weltweit zwei verschiedene Therapieansätze gibt. Im Rahmen der COG behandelte Kinder werden primär operiert und anschließend chemotherapiert. Kinder, die in Deutschland im Rahmen der SIOP-2001/GPOH-Studie behandelt werden, erhalten jedoch wie vorbeschrieben erst eine Chemotherapie und werden anschließend operiert.

Das Ziel dieser Arbeit bestand daher darin, zu prüfen, ob auch bei präoperativ chemotherapierten Tumoren, welche eine prognostisch eher ungünstige Histologie aufweisen, ein Zusammenhang zwischen einem Zugewinn auf Chromosom 1q und einem verringerten EFS besteht. Hierzu wurde eine Testgruppe aus 98 Fällen mit einem hohen Malignitätsgrad aus den Jahren 2002 – 2012 untersucht. Um die

Ergebnisse anschließend mit dem Gesamtkollektiv der Wilms-Tumore vergleichen zu können, erfolgte außerdem die Analyse einer Validierungsgruppe, die aus 81 Gewebeproben von aller im Jahr 2007 in die SIOP-2001/GPOH-Studie aufgenommenen Patienten bestand.

In einem ersten Schritt erfolgte die DNA-Isolierung aus den in Paraffin eingebetteten Gewebeproben. Anschließend wurde das gewonnene Material mithilfe der Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) analysiert und auf einen genetischen Zugewinn auf Chromosom 1q hin untersucht. Die Auswertung und der Vergleich der Ergebnisse mit den klinischen Patientendaten erfolgte mithilfe von Kaplan-Meier-Kurven.

Im Gegensatz zu den vorherigen Veröffentlichungen konnte im Rahmen dieser Arbeit kein signifikanter Zusammenhang zwischen einem Zugewinn auf Chromosom 1q und einer schlechteren Prognose des Wilms-Tumors gefunden werden. Um diese Ergebnisse zu validieren oder zu widerlegen bzw. um vielleicht eine Relevanz des genetischen Zugewinns für einzelne Untergruppen der Erkrankung zu beweisen, wird es in Zukunft notwendig sein, weitere Untersuchungen mit größeren Fallzahlen in diesem Bereich durchzuführen. Nach dem jetzigen Wissensstand scheint jedoch vorerst weiterhin die Histologie des Gewebes der zuverlässigste Prognosefaktor zu sein.

7 Literaturverzeichnis

- Al-Hussain, Turki; Ali, Afshan; Akhtar, Mohammed (2014): Wilms tumor. An update. In: *Advances in anatomic pathology* 21 (3), S. 166–173. DOI: 10.1097/PAP.000000000000017.
- Bardeesy, N.; Falkoff, D.; Petruzzi, M. J.; Nowak, N.; Zabel, B.; Adam, M. et al. (1994): Anaplastic Wilms' tumour, a subtype displaying poor prognosis, harbours p53 gene mutations. In: *Nature genetics* 7 (1), S. 91–97. DOI: 10.1038/ng0594-91.
- Beckwith, J. B. (1998): Nephrogenic rests and the pathogenesis of Wilms tumor. Developmental and clinical considerations. In: *American journal of medical genetics* 79 (4), S. 268–273.
- Beckwith, J. B.; Kiviat, N. B.; Bonadio, J. F. (1990): Nephrogenic rests, nephroblastomatosis, and the pathogenesis of Wilms' tumor. In: *Pediatric pathology* 10 (1-2), S. 1–36.
- Bode, Udo; Gutjahr, Peter (2004): Krebs bei Kindern und Jugendlichen. Klinik und Praxis der pädiatrischen Onkologie. 5., überarb. und erw. Aufl. Köln: Dt. Ärzte-Verl.
- Bonetta, L.; Kuehn, S. E.; Huang, A.; Law, D. J.; Kalikin, L. M.; Koi, M. et al. (1990): Wilms tumor locus on 11p13 defined by multiple CpG island-associated transcripts. In: *Science (New York, N.Y.)* 250 (4983), S. 994–997.
- Boujard, Daniel; Anselme, Bruno; Cullin, Christophe; Raguénès-Nicol, Céline; Lechowski, Sandra (2014): Zell- und Molekularbiologie im Überblick. Berlin: Springer Spektrum. Online verfügbar unter <http://link.springer.com/book/10.1007/978-3-642-41761-0>.
- Bown, Nick; Cotterill, Simon J.; Roberts, Paul; Griffiths, Mike; Larkins, Simon; Hibbert, Steve et al. (2002): Cytogenetic abnormalities and clinical outcome in Wilms tumor: a study by the U.K. cancer cytogenetics group and the U.K. Children's Cancer Study Group. In: *Medical and pediatric oncology* 38 (1), S. 11–21.

- Breslow, Norman E.; Lange, Jane M.; Friedman, Debra L.; Green, Daniel M.; Hawkins, Mike M.; Murphy, Michael F. G. et al. (2010): Secondary malignant neoplasms after Wilms tumor: an international collaborative study. In: *International journal of cancer. Journal international du cancer* 127 (3), S. 657–666. DOI: 10.1002/ijc.25067.
- Bruin, Elza C. de; McGranahan, Nicholas; Mitter, Richard; Salm, Max; Wedge, David C.; Yates, Lucy et al. (2014): Spatial and temporal diversity in genomic instability processes defines lung cancer evolution. In: *Science (New York, N.Y.)* 346 (6206), S. 251–256. DOI: 10.1126/science.1253462.
- Burdach, Stefan E. G; Drexler, Helmut; Hallek, Michael; Hiddemann, Wolfgang; Hörl, Walter H.; Klein, Helfried E. et al. (2007): *Medizinische Therapie 2007*. 3rd ed. Dordrecht: Springer.
- Call, K. M.; Glaser, T.; Ito, C. Y.; Buckler, A. J.; Pelletier, J.; Haber, D. A. et al. (1990): Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus. In: *Cell* 60 (3), S. 509–520.
- Chagtai, Tasnim; Zill, Christina; Dainese, Linda; Wegert, Jenny; Savola, Suvi; Popov, Sergey et al. (2016): Gain of 1q As a Prognostic Biomarker in Wilms Tumors (WTs) Treated With Preoperative Chemotherapy in the International Society of Paediatric Oncology (SIOP) WT 2001 Trial: A SIOP Renal Tumours Biology Consortium Study. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 34 (26), S. 3195–3203. DOI: 10.1200/JCO.2015.66.0001.
- Cho, K. R.; Vogelstein, B. (1992): Genetic alterations in the adenoma--carcinoma sequence. In: *Cancer* 70 (6 Suppl), S. 1727–1731.
- Divisato, Giuseppina; Formicola, Daniela; Esposito, Teresa; Merlotti, Daniela; Pazzaglia, Laura; Del Fattore, Andrea et al. (2016): ZNF687 Mutations in Severe Paget Disease of Bone Associated with Giant Cell Tumor. In: *American journal of human genetics* 98 (2), S. 275–286. DOI: 10.1016/j.ajhg.2015.12.016.
- Dome, Jeffrey S.; Perlman, Elizabeth J.; Graf, Norbert (2014): Risk stratification for wilms tumor: current approach and future directions. In: *American Society of*

Clinical Oncology educational book / ASCO. American Society of Clinical Oncology. Meeting, S. 215–223. DOI: 10.14694/EdBook_AM.2014.34.215.

- Gabeau-Lacet, Darlene; Engler, David; Gupta, Sumeet; Scangas, George A.; Betensky, Rebecca A.; Barker, Fred G. et al. (2009): Genomic profiling of atypical meningiomas associates gain of 1q with poor clinical outcome. In: *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 68 (10), S. 1155–1165. DOI: 10.1097/NEN.0b013e3181ba3952.
- Gadner, Helmut; Gaedicke, Gerhard; Niemeyer, Charlotte; Ritter, Jörg (Hg.) (2006): Pädiatrische Hämatologie und Onkologie. Berlin, Heidelberg: Springer Medizin Verlag Heidelberg. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1007/3-540-29036-2>.
- Gerlinger, Marco; Horswell, Stuart; Larkin, James; Rowan, Andrew J.; Salm, Max P.; Varela, Ignacio et al. (2014): Genomic architecture and evolution of clear cell renal cell carcinomas defined by multiregion sequencing. In: *Nature genetics* 46 (3), S. 225–233. DOI: 10.1038/ng.2891.
- Gessler, M.; Poustka, A.; Cavenee, W.; Neve, R. L.; Orkin, S. H.; Bruns, G. A. (1990): Homozygous deletion in Wilms tumours of a zinc-finger gene identified by chromosome jumping. In: *Nature* 343 (6260), S. 774–778. DOI: 10.1038/343774a0.
- GPOH et al. (2016): S1-Leitlinie Nephroblastom (Wilms-Tumor). Hg. v. AWMF. Hannover.
- Gratias, Eric J.; Jennings, Lawrence J.; Anderson, James R.; Dome, Jeffrey S.; Grundy, Paul; Perlman, Elizabeth J. (2013): Gain of 1q is associated with inferior event-free and overall survival in patients with favorable histology Wilms tumor: a report from the Children's Oncology Group. In: *Cancer* 119 (21), S. 3887–3894. DOI: 10.1002/cncr.28239.
- Green, Daniel M.; Breslow, Norman E.; D'Angio, Giulio J.; Malogolowkin, Marcio H.; Ritchey, Michael L.; Evans, Audrey E. et al. (2014): Outcome of patients with Stage II/favorable histology Wilms tumor with and without local tumor spill: a report from the National Wilms Tumor Study Group. In: *Pediatr Blood Cancer* 61 (1), S. 134–139. DOI: 10.1002/pbc.24658.

- Gregory, S. G.; Barlow, K. F.; McLay, K. E.; Kaul, R.; Swarbreck, D.; Dunham, A. et al. (2006): The DNA sequence and biological annotation of human chromosome 1. In: *Nature* 441 (7091), S. 315–321. DOI: 10.1038/nature04727.
- Grundy, Paul E.; Breslow, Norman E.; Li, Sierra; Perlman, Elizabeth; Beckwith, J. Bruce; Ritchey, Michael L. et al. (2005): Loss of heterozygosity for chromosomes 1p and 16q is an adverse prognostic factor in favorable-histology Wilms tumor: a report from the National Wilms Tumor Study Group. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 23 (29), S. 7312–7321. DOI: 10.1200/JCO.2005.01.2799.
- Hing, S.; Lu, Y. J.; Summersgill, B.; King-Underwood, L.; Nicholson, J.; Grundy, P. et al. (2001): Gain of 1q is associated with adverse outcome in favorable histology Wilms' tumors. In: *Am. J. Pathol.* 158 (2), S. 393–398. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)63982-X.
- Huang, Chiang-Ching; Gadd, Samantha; Breslow, Norman; Cutcliffe, Colleen; Sredni, Simone T.; Helenowski, Irene B. et al. (2009): Predicting relapse in favorable histology Wilms tumor using gene expression analysis: a report from the Renal Tumor Committee of the Children's Oncology Group. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 15 (5), S. 1770–1778. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-08-1030.
- Jadali, Farzaneh; Sayadpour, Delaram; Rakhshan, Mohammad; Karimi, Abdollah; Rouzrokh, Mohsen; Shamsian, Bibi Shahin; Shamshiri, Ahmad Reza (2011): Immunohistochemical detection of p53 protein expression as a prognostic factor in Wilms tumor. In: *Iranian journal of kidney diseases* 5 (3), S. 149–153.
- Jocham, Dieter; Bähre, Manfred (2007): Praxis der Urologie. In zwei Bänden. 3., überarb. u. erw. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme.
- Kamada, Yuhei; Sakata-Yanagimoto, Mamiko; Sanada, Masashi; Sato-Otsubo, Aiko; Enami, Terukazu; Suzukawa, Kazumi et al. (2012): Identification of unbalanced genome copy number abnormalities in patients with multiple myeloma by single-nucleotide polymorphism genotyping microarray analysis. In: *Int. J. Hematol.* 96 (4), S. 492–500. DOI: 10.1007/s12185-012-1171-1.

- Kaplan, E. L.; Meier, Paul (1958): Nonparametric Estimation from Incomplete Observations. In: *Journal of the American Statistical Association* 53 (282), S. 457. DOI: 10.2307/2281868.
- Kaste, Sue C.; Dome, Jeffrey S.; Babyn, Paul S.; Graf, Norbert M.; Grundy, Paul; Godzinski, Jan et al. (2008): Wilms tumour: prognostic factors, staging, therapy and late effects. In: *Pediatr Radiol* 38 (1), S. 2–17. DOI: 10.1007/s00247-007-0687-7.
- Kilday, J.-P.; Mitra, B.; Domerg, C.; Ward, J.; Andreiuolo, F.; Osteso-Ibanez, T. et al. (2012): Copy Number Gain of 1q25 Predicts Poor Progression-Free Survival for Pediatric Intracranial Ependymomas and Enables Patient Risk Stratification: A Prospective European Clinical Trial Cohort Analysis on Behalf of the Children's Cancer Leukaemia Group (CCLG), Societe Francaise d'Oncologie Pediatrique (SFOP), and International Society for Pediatric Oncology (SIOP). In: *Clinical Cancer Research* 18 (7), S. 2001–2011. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-11-2489.
- Kullendorff, Carl Magnus; Soller, Maria; Wiebe, Thomas; Mertens, Fredrik (2003): Cytogenetic findings and clinical course in a consecutive series of Wilms tumors. In: *Cancer genetics and cytogenetics* 140 (1), S. 82–87.
- Lu, Yong-Jie; Hing, Sandra; Williams, Richard; Pinkerton, Ross; Shipley, Janet; Pritchard-Jones, Kathy (2002): Chromosome 1q expression profiling and relapse in Wilms' tumour. In: *Lancet (London, England)* 360 (9330), S. 385–386. DOI: 10.1016/S0140-6736(02)09596-X.
- Lüllmann, Heinz; Mohr, Klaus; Hein, Lutz; Kuschinsky, Gustav (2010): Pharmakologie und Toxikologie. Arzneimittelwirkungen verstehen - Medikamente gezielt einsetzen ; ein Lehrbuch für Studierende der Medizin, der Pharmazie und der Biowissenschaften, eine Informationsquelle für Ärzte, Apotheker und Gesundheitspolitiker ; 130 Tabellen. 17., vollst. überarb. Aufl. Stuttgart, New York, NY: Thieme.
- Mackintosh, C.; Ordóñez, J. L.; García-Domínguez, D. J.; Sevillano, V.; Llombart-Bosch, A.; Szuhai, K. et al. (2011): 1q gain and CDT2 overexpression underlie

- an aggressive and highly proliferative form of Ewing sarcoma. In: *Oncogene* 31 (10), S. 1287–1298. DOI: 10.1038/onc.2011.317.
- Md Zin, Reena; Murch, Ashleigh; Charles, Adrian (2011): Pathology, genetics and cytogenetics of Wilms' tumour. In: *Pathology* 43 (4), S. 302–312. DOI: 10.1097/PAT.0b013e3283463575.
- Mrowka, C.; Schedl, A. (2000): Wilms' tumor suppressor gene WT1: from structure to renal pathophysiologic features. In: *J. Am. Soc. Nephrol.* 11 Suppl 16, S. 15.
- Müller, Markus (2013): Chirurgie. Für Studium und Praxis - 2014/15. 12. Aufl., rev. Ausg. Breisach am Rhein: Medizinische Vlg.- u. Inform.-Dienste.
- Murken, Jan (2011): Taschenlehrbuch Humangenetik. 96 Tabellen. 8. Aufl. Stuttgart [u.a.]: Thieme.
- Natrajan, R.; Williams, R. D.; Hing, S. N.; Mackay, A.; Reis-Filho, J. S.; Fenwick, K. et al. (2006): Array CGH profiling of favourable histology Wilms tumours reveals novel gains and losses associated with relapse. In: *The Journal of pathology* 210 (1), S. 49–58. DOI: 10.1002/path.2021.
- Perlman, Elizabeth J.; Faria, Paulo; Soares, Andreia; Hoffer, Fred; Sredni, Simone; Ritchey, Michael et al. (2006): Hyperplastic perilobar nephroblastomatosis. Long-term survival of 52 patients. In: *Pediatr Blood Cancer* 46 (2), S. 203–221. DOI: 10.1002/pbc.20386.
- Perotti, Daniela; Spreafico, Filippo; Torri, Federica; Gamba, Beatrice; D'Adamo, Pio; Pizzamiglio, Sara et al. (2012): Genomic profiling by whole-genome single nucleotide polymorphism arrays in Wilms tumor and association with relapse. In: *Genes, chromosomes & cancer* 51 (7), S. 644–653. DOI: 10.1002/gcc.21951.
- Rauscher, F. J.; Morris, J. F.; Tournay, O. E.; Cook, D. M.; Curran, T. (1990): Binding of the Wilms' tumor locus zinc finger protein to the EGR-1 consensus sequence. In: *Science (New York, N.Y.)* 250 (4985), S. 1259–1262.
- Reyes-Botero, German; Giry, Marine; Mokhtari, Karima; Labussière, Marianne; Idbaih, Ahmed; Delattre, Jean-Yves et al. (2014): Molecular analysis of diffuse

- intrinsic brainstem gliomas in adults. In: *J. Neurooncol.* 116 (2), S. 405–411. DOI: 10.1007/s11060-013-1312-2.
- Rich, Jason T.; Neely, J. Gail; Paniello, Randal C.; Voelker, Courtney C J; Nussenbaum, Brian; Wang, Eric W. (2010): A practical guide to understanding Kaplan-Meier curves. In: *Otolaryngology--head and neck surgery : official journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery* 143 (3), S. 331–336. DOI: 10.1016/j.otohns.2010.05.007.
- Roessner, Albert (2008): *Allgemeine Pathologie und Grundlagen der Speziellen Pathologie.* 11. Aufl. München: Urban & Fischer in Elsevier.
- Satoh, Y.; Nakadate, H.; Nakagawachi, T.; Higashimoto, K.; Joh, K.; Masaki, Z. et al. (2006): Genetic and epigenetic alterations on the short arm of chromosome 11 are involved in a majority of sporadic Wilms' tumours. In: *British journal of cancer* 95 (4), S. 541–547. DOI: 10.1038/sj.bjc.6603302.
- Schouten, Jan P.; McElgunn, Cathal J.; Waaijer, Raymond; Zwijnenburg, Danny; Diepvens, Filip; Pals, Gerard (2002): Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. In: *Nucleic Acids Res.* 30 (12), S. e57.
- Sebire, Neil J.; Vujanic, Gordan M. (2009): Paediatric renal tumours. Recent developments, new entities and pathological features. In: *Histopathology* 54 (5), S. 516–528. DOI: 10.1111/j.1365-2559.2008.03110.x.
- Segers, H.; Kersseboom, R.; Alders, M.; Pieters, R.; Wagner, A.; van den Heuvel-Eibrink, M. M. (2012): Frequency of WT1 and 11p15 constitutional aberrations and phenotypic correlation in childhood Wilms tumour patients. In: *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* 48 (17), S. 3249–3256. DOI: 10.1016/j.ejca.2012.06.008.
- Segers, H.; van den Heuvel-Eibrink, M M; Williams, R. D.; van Tinteren, H.; Vujanic, G.; Pieters, R. et al. (2013): Gain of 1q is a marker of poor prognosis in Wilms' tumors. In: *Genes Chromosomes Cancer* 52 (11), S. 1065–1074. DOI: 10.1002/gcc.22101.
- Singh, Nisha R.; Morris, Christine M.; Koletch, Mary; Wong, Kelly; Ward, Christopher M.; Stevenson, William S. (2013): Polyploidy in myelofibrosis: analysis by

- cytogenetic and SNP array indicates association with advancing disease. In: *Mol Cytogenet* 6 (1), S. 59. DOI: 10.1186/1755-8166-6-59.
- Song, Qingxuan; Merajver, Sofia D.; Li, Jun Z. (2015): Cancer classification in the genomic era: five contemporary problems. In: *Human genomics* 9, S. 27. DOI: 10.1186/s40246-015-0049-8.
- Tan, Daniel S W; Camilleri-Broët, Sophie; Tan, Eng Huat; Alifano, Marco; Lim, Wan-Teck; Bobbio, Antonio et al. (2014): Intertumor heterogeneity of non-small-cell lung carcinomas revealed by multiplexed mutation profiling and integrative genomics. In: *Int. J. Cancer*. DOI: 10.1002/ijc.28750.
- Termuhlen, Amanda M.; Tersak, Jean M.; Liu, Qi; Yasui, Yutaka; Stovall, Marilyn; Weathers, Rita et al. (2011): Twenty-five year follow-up of childhood Wilms tumor: a report from the Childhood Cancer Survivor Study. In: *Pediatric blood & cancer* 57 (7), S. 1210–1216. DOI: 10.1002/pbc.23090.
- Vanden Borre, Pierre; Schrock, Alexa B.; Anderson, Peter M.; Morris, John C.; Heilmann, Andreas M.; Holmes, Oliver et al. (2017): Pediatric, Adolescent, and Young Adult Thyroid Carcinoma Harbors Frequent and Diverse Targetable Genomic Alterations, Including Kinase Fusions. In: *The oncologist* 22 (3), S. 255–263. DOI: 10.1634/theoncologist.2016-0279.
- Verschuur, Arnauld C.; Vujanic, Gordan M.; van Tinteren, Harm; Jones, Kathy Pritchard; Kraker, Jan de; Sandstedt, Bengt (2010): Stromal and epithelial predominant Wilms tumours have an excellent outcome: the SIOP 93 01 experience. In: *Pediatric blood & cancer* 55 (2), S. 233–238. DOI: 10.1002/pbc.22496.
- Vicens, Jimena; Iotti, Alejandro; Lombardi, Mercedes Garcia; Iotti, Roberto; Davila, Maria Teresa Garcia de (2009): Diffuse hyperplastic perilobar nephroblastomatosis. In: *Pediatric and developmental pathology : the official journal of the Society for Pediatric Pathology and the Paediatric Pathology Society* 12 (3), S. 237–238. DOI: 10.2350/07-09-0349.1.
- Vujančić, Gordan M.; Sandstedt, Bengt; Harms, Dieter; Kelsey, Anna; Leuschner, Ivo; Kraker, Jan de (2002): Revised International Society of Paediatric Oncology

- (SIOP) working classification of renal tumors of childhood. In: *Medical and pediatric oncology* 38 (2), S. 79–82.
- Wang, Yong; Waters, Jill; Leung, Marco L.; Unruh, Anna; Roh, Whijae; Shi, Xiuqing et al. (2014): Clonal evolution in breast cancer revealed by single nucleus genome sequencing. In: *Nature* 512 (7513), S. 155–160. DOI: 10.1038/nature13600.
- Warmann, Steven W.; Furtwängler, Rhoikos; Blumenstock, Gunnar; Armeanu, Sorin; Nourkami, Nasenien; Leuschner, Ivo et al. (2011): Tumor biology influences the prognosis of nephroblastoma patients with primary pulmonary metastases: results from SIOP 93-01/GPOH and SIOP 2001/GPOH. In: *Ann. Surg.* 254 (1), S. 155–162. DOI: 10.1097/SLA.0b013e318222015e.
- Weirich, A.; Leuschner, I.; Harms, D.; Vujanic, G. M.; Tröger, J.; Abel, U. et al. (2001): Clinical impact of histologic subtypes in localized non-anaplastic nephroblastoma treated according to the trial and study SIOP-9/GPOH. In: *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 12 (3), S. 311–319.
- Weirich, A.; Ludwig, R.; Graf, N.; Abel, U.; Leuschner, I.; Vujanic, G. M. et al. (2004): Survival in nephroblastoma treated according to the trial and study SIOP-9/GPOH with respect to relapse and morbidity. In: *Ann. Oncol.* 15 (5), S. 808–820.
- Xu, Hongtao; Zhu, Xia; Xu, Zulong; Hu, Yue; Bo, Shiping; Xing, Tongjing; Zhu, Kuichun (2015): Non-invasive Analysis of Genomic Copy Number Variation in Patients with Hepatocellular Carcinoma by Next Generation DNA Sequencing. In: *Journal of Cancer* 6 (3), S. 247–253. DOI: 10.7150/jca.10747.

8 Danksagung

Als Erstes möchte ich mich bei meinem Doktorvater **Prof. Dr. med. Ivo Leuschner** für die Bereitstellung des Themas dieser Arbeit, die Betreuung und die Ermöglichung der Durchführung der wissenschaftlichen Methoden in der Sektion für Kinderpathologie bedanken. **Prof. Dr. med. Christoph Röcken** möchte ich dafür danken, dass er die abschließende Betreuung übernommen hat.

Ein großer Dank gilt außerdem **Dr. med. Christian Vokuhl** für die gute Unterstützung und Betreuung während der Erstellung dieser Arbeit.

Zudem danke ich **Sabine Roggenbrodt** und **Sylvia Iwersen** für die Unterstützung bei der Durchführung der in dieser Arbeit angewandten wissenschaftlichen Methoden.

Ein weiterer Dank geht an die Mitarbeiter des **neuropathologischen Instituts der Universität Bonn** sowie der **SIOP-2001/GPOH-Studienzentrale** in Homburg/Saar für die Durchführung der MLPA bzw. die Unterstützung bei der Auswertung der statistischen Daten für diese Arbeit.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei meinem Ehemann **Jonas** für die Unterstützung und die zahlreichen Tipps und Anregungen.

Abschließend gilt der größte Dank meinen **Eltern**, die mir das Studium und damit auch diese Arbeit ermöglicht haben. Vielen Dank!