

Valérie Schumacher

Dr. sc. hum

## **Molekulare Charakterisierung von Mechanismen zur Entstehung von Wilms-Tumor und Denys-Drash Syndrom-Vom Genotyp zum Phänotyp**

Geboren am 15.03.67 in Göppingen

Reifeprüfung am 20.06.86

Studiengang der Fachrichtung Diplom-Biologie vom WS 1990/1991 bis SS 1995

Vordiplom am 21.10. 1992 an der Universität Bayreuth

Diplom am 05.04.1995 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Humangenetik

Doktormutter: Prof. Dr. rer. nat B. Royer-Pokora

Das Ziel der vorliegenden Promotionsarbeit ist die molekulare Charakterisierung von Mechanismen, die zu der Entstehung von Wilms-Tumor und Denys-Drash Syndrom führen. Der Wilms-Tumor ist ein embryonaler maligner Nierentumor, der nach der Hypothese von Knudson durch zwei Mutationen in einem Tumorsuppressorgen entsteht („Two Hit“ Modell), und entweder isoliert oder im Zusammenhang mit kongenitalen Anomalien vorkommt. Ein Beispiel dafür ist das Denys-Drash Syndrom, welches durch eine Prädisposition für Wilms-Tumor, ein rasch progressives nephrotisches Syndrom und ein intersexuelles Genitale bei genotypisch männlichen Patienten charakterisiert ist. In der vorliegenden Arbeit wurden bei insgesamt 91 Patienten mögliche Mechanismen zur Entstehung von Wilms-Tumor und Denys-Drash Syndrom mit Hilfe vielseitiger molekulargenetischer und biochemischer Analysen untersucht und mit klinischen sowie histologischen Daten korreliert. Diese Genotyp-Phänotyp Korrelation erfolgte in einer interdisziplinären Zusammenarbeit mit Klinikern, Pathologen und Anatomen, die vorwiegend aus Heidelberg waren.

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit der Analyse des einzigen bisher isolierten Wilms-Tumor Gens, *WT1* auf 11p13, sowie weiteren Wilms-Tumor Kandidatengenen, wie *p57KIP2*, *TSG101* und *FWT1*. *WT1*-Mutationsanalysen haben ergeben, daß eine Korrelation zwischen *WT1*-Nonsensmutationen und der Entstehung von stromareichen WT besteht. Die Synthese

und Fehllokalisation von verkürztem Protein konnte *in vivo* und *in vitro* nachgewiesen werden. Dies führt in Tumorzellen zur Ausdifferenzierung in Muskelzellen und zu einer Überexpression von potentiellen WT1-Zielgenen wie *Bcl-2*, *IGF-II* und *N-Myc*, die vermutlich den Proliferationsstimulus für die klonale Expansion darstellen und möglicherweise Ursache der häufig beobachtete Chemotherapieresistenz sind. Diese Daten zeigen zum ersten Mal, daß bei einer histopathologischen Subklasse von Wilms-Tumoren Mutationen im *WT1*-Gen häufig sind und zu einem funktionell inaktiven Protein führen, wie es das „Two Hit“ Modell von Knudson postuliert. Außerdem konnte die Funktion von *WT1*-Mutationen im Hinblick auf die Expression von potentiellen Zielgenen erstmalig direkt am Tumor beobachtet werden und führte zur Erstellung eines WT-Modells. Die Untersuchung weiterer Mechanismen zur Entstehung von WT wie aberrantes Spleißen von *WT1*, verminderte *p57KIP2*-Expression und strukturelle Veränderungen im *TSG101*-Gen führte zu dem Schluß, daß es sich hierbei vermutlich nicht um potentielle Mechanismen zur Tumor-Entstehung handelt. Kopplungsanalysen bei einer Familie mit WT zeigten, daß die Prädisposition für WT in dieser Familie nicht mit dem Genlocus *WT1* auf Chromosom 17q gekoppelt ist.

Die *WT1*-Mutationsanalysen an einem breiten Spektrum von Patienten mit Denys-Drash Syndrom oder einem kongenitalen/isolierten nephrotischen Syndrom führten zu einer möglichen Neudefinierung des Denys-Drash Syndroms, die sowohl klinische als auch genetische Aspekte vereint und zu der Identifizierung von Hochrisiko-Patienten für Wilms-Tumor. Histopathologisch ist das nephrotische Syndrom bei Denys-Drash-Patienten häufig durch eine diffuse mesangiale Sklerose charakterisiert. Diese zeichnet sich durch eine nicht abgeschlossene Nephrogenese und massive mesangiale Matrixvermehrung in den Glomeruli aus. Eine Überexpression von potentiellen *WT1*-Zielgenen, wie *Pax-2*, *Bcl-2*, *IGF-II* konnte an Nierenpräparaten nicht gefunden werden, so daß vermutlich andere Mechanismen zur Pathogenese der diffusen mesangialen Sklerose führen. Möglicherweise aktiviert das *WT1*-Protein durch einen Aminosäureaustausch bei der Entstehung der Glomerulopathie andere Zielgene und hat somit einen anderen Effekt als das verkürzte Protein bei WT-Patienten.

Anhand der hier vorliegenden Ergebnisse und Daten aus der Literatur scheint sich eine Korrelation zwischen Art der Mutation und dem klinischen Phänotyp abzuzeichnen, die in der

Diagnostik zukünftig sicherlich hilfreich für die Risikoabschätzung einer Tumor-Entstehung sein wird.

