

**MOLEKULARZYTOMETISCHE UNTERSUCHUNGEN AN
NIERENZELLTUMOREN DES MENSCHEN -
EINE SUBTYPESPEZIFISCHE DIFFERENZIERUNG**

Dissertation
zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie
der Johannes-Gutenberg Universität
in Mainz

Dirk Reutzel
geb. in Hanau am Main,
Deutschland

Mainz im September 2003

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Jahr der mündlichen Prüfung: 2003

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG	1
1 EINLEITUNG	2
1.1 Der Tumorgeneseprozess auf molekularer Ebene	2
1.1.1 Onkogene	3
1.1.2 Tumorsuppressor-Gene	4
1.1.3 Mutator-Gene	4
1.2 Nierenzellkarzinome	5
1.2.1 Inzidenz, Risikofaktoren und Prognose	5
1.2.2 Diagnose und Therapie	8
1.2.3 Klassifikation epithelialer Nierentumore	10
1.2.4 Genetische Veränderungen in Nierentumoren	12
1.2.4.1 Klarzelliges Nierenkarzinom	13
1.2.4.2 Papilläre Nierenkarzinome	14
1.2.4.3 Chromophobe Nierenkarzinome	16
1.2.4.4 Onkozytome	17
1.3 Die Suche nach Tumor-Genen	18
1.3.1 Zytogenetische Methoden	18
1.3.2 Molekular-zytogenetische Methoden	19
1.3.2.1 Comparative Genom-Hybridisierung (CGH)	19
1.3.2.2 Multiplex-FISH (M-FISH)	20
1.3.3 Molekulare Techniken	22
1.3.3.1 Detektion von Allelverlust durch Mikrosatellitenanalyse (MSA)	22
2 ZIELSETZUNG	23
3 MATERIAL UND METHODEN	24
3.1 Chemikalien und Agenzien	24
3.1.1 Sonstige Materialien	24
3.1.2 Kommerzielle Kits	25
3.1.3 verwendete Primer	25
3.1.4 DNA Sonden	26
3.1.5 DNA-Längenstandards	26
3.1.6 Enzyme und Bakterien	26
3.1.7 Häufig verwendete Puffer und Kulturmedien	27
3.2 Geräte	28
3.3 Probenentnahmen und pathologische Begutachtung	28
3.4 Zellbiologische Methoden	28
3.4.1.1 Aufbereitung epithelialer Nierenzellen	28
3.4.2 Kultivierung	28
3.4.2.1 Mediumwechsel	30
3.4.2.2 Subkultivierung	30
3.4.2.3 Kryokonservierung	30

Inhaltsverzeichnis	II
3.4.2.4 Auftauen	31
3.4.3 Optische Wachstumskurve einer Gewebekultur	31
3.4.4 Lymphozytenkulturen	31
3.5 Zyto genetische Methoden	31
3.5.1 Chromosomen-Präparation aus Blutkulturen	31
3.5.2 Chromosomenaufarbeitung aus Gewebekulturen	32
3.5.3 GTG-Bandenfärbung	33
3.6 Molekulargenetische Methoden	33
3.6.1 Mikrosatellitenanalyse	33
3.6.1.1 Polyacrylamid (PAA) Gelherstellung	33
3.6.1.2 Probenvorbereitung und Gellauf	34
3.6.1.3 Optimierung der PCR Bedingungen	34
3.6.1.4 Auswertung	35
3.6.1.5 Korrelation der MSA und CGH Ergebnisse mit klinischen und histopathologischen Daten	35
3.6.2 Suche nach VHL enthaltenden Klonen	36
3.6.3 Isolation human-genomischer DNA	37
3.6.4 Gewinnung von Plasmid- und PAC-DNA	37
3.6.5 Fällung von DNA	38
3.6.6 Quantifizierung von DNA	38
3.6.7 Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen	39
3.6.8 Agarose-Gelelektrophorese	39
3.6.9 Wiedergewinnung von DNA aus Agarose-Gelen	39
3.6.10 Sequenzierung von DNA	40
3.6.11 Analyse von DNA-Sequenzen	40
3.6.12 Klonierung von DNA-Fragmenten in Plasmidvektoren	40
3.6.12.1 Vektor- und Integratvorbereitung	41
3.6.12.2 Ligation	41
3.6.12.3 Transformation und Selektion positiver Klone	41
3.6.13 Radioaktive Markierung von DNA	41
3.6.14 Nicht-radioaktive Markierung von DNA	42
3.6.14.1 Nick-Translation	42
3.6.14.2 DOP-PCR	43
3.6.15 Herstellung von Koloniefiltern	43
3.6.16 Hybridisierung und Waschen der Koloniefilter	43
3.7 Molekular-zyto genetische Methoden	43
3.7.1 Comparative Genom-Hybridisierung (CGH)	43
3.7.2 FISH	44
3.7.2.1 Denaturierung chromosomaler DNA	44
3.7.2.2 Sondenvorbereitung	45
3.7.2.3 Waschen und Detektion (bei indirekter Markierung)	45
3.7.2.3.1 Block unspezifischer Epitope	45
3.7.2.3.2 Detektion indirekt markierter DNA	45
3.7.3 M-FISH	46
3.7.3.1 Metaphasen -Vorbehandlung	47
3.7.3.2 Sondenherstellung	47
3.7.3.3 Auswertung der M-FISH	49
3.7.4 Auswertung der Hybridisierung mit digitaler Bildbearbeitung	49
3.7.4.1 Besonderheiten im CGH Modus	49

4	ERGEBNISSE	51
4.1	CGH Untersuchungen	51
4.1.1	Klarzellige Nierenkarzinome	51
4.1.1.1	Genomische Imbalancen	51
4.1.1.2	Lokalisierung von Bruchpunktregionen	53
4.1.1.3	Korrelation pathologischer Parameter mit Imbalancen	54
4.1.1.4	Korrelation klinischer Parameter mit Imbalancen	54
4.1.2	Papilläre Nierenkarzinome	55
4.1.2.1	Genomische Imbalancen	55
4.1.2.2	Lokalisierung von Bruchpunktregionen	58
4.1.2.3	Korrelation pathologischer Parameter mit Imbalancen	58
4.1.2.4	Korrelation klinischer Parameter mit Imbalancen	58
4.1.3	Chromophobe Nierenkarzinome	59
4.1.3.1	Genomische Imbalancen	59
4.1.3.2	Lokalisierung von Bruchpunktregionen	61
4.1.3.3	Korrelation pathologischer Parameter mit Imbalancen	61
4.1.3.4	Korrelation klinischer Parameter mit Imbalancen	61
4.1.4	Onkozytome der Niere	63
4.1.4.1	Genomische Imbalancen	63
4.1.4.2	Lokalisierung von Bruchpunktregionen	65
4.1.4.3	Korrelation pathologischer Parameter mit Imbalancen	65
4.1.4.4	Korrelation klinischer Parameter mit Imbalancen	65
4.1.5	Untersuchungen von Zelllinien	66
4.1.5.1	Klarzellige Nierenzelllinie 786-O	66
4.1.5.2	Klarzellige Nierenzelllinie CaKi-1	67
4.1.5.3	Klarzellige Nierenzelllinie CaKi-2	67
4.1.5.4	Klarzellige Nierenzelllinie KTCTL-26A	68
4.1.5.5	Klarzellige Nierenzelllinie A498	68
4.1.5.6	Embryonale Nierenzelllinie HEK 293	69
4.1.6	Matrix-CGH	70
4.2	Molekulargenetische Untersuchungen	71
4.2.1	Mikrosatellitenanalysen auf Chromosom 14	71
4.2.2	Molekulare Untersuchung der VHL flankierenden Region	75
4.3	strukturelle Chromosomenveränderungen	76
4.3.1	Ergebnisse der M-FISH Studien	76
4.3.2	Untersuchungen am familiären Nierenkarzinom	78
4.3.3	FISH-Untersuchung auf VHL-Allelverlust	81
4.3.4	Analyse von Patientenmaterial	83
5	DISKUSSION	84
5.1	Untersuchungsmethoden des Tumor-Genoms und ihre Limitationen	86
5.2	Untersuchungen an Zelllinien	87
5.3	Untersuchungen epithelialer Nierentumoren	88
5.3.1	Klarzellige Nierenkarzinome	94
5.3.1.1	Chromosom 3 Aberrationen	96
5.3.2	Hereditäre Nierenzellkarzinome	98
5.3.2.1	VHL-Erkrankung	98

Inhaltsverzeichnis	IV
5.3.3 Translokationsassoziierte Nierenkarzinome	99
5.3.3.1 Drei-Schritt-Modell der Entstehung familiärer Nierenkarzinome	101
5.3.4 Deletionsstudien des VHL-Locus	108
5.3.4.1 Weitere chromosomale Imbalancen	109
5.3.5 Papilläre Karzinome	113
5.3.6 Chromophobe Karzinome	114
5.3.7 Onkozytome	116
5.3.8 Untersuchungen von Chromosom 14q	117
6 AUSBLICK	120
7 LITERATUR	121
8 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	142
9 ABBILDUNGSVERZEICHNIS	144
10 TABELLENVERZEICHNIS	145
11 ANHANG	146
11.1 Matrix CGH und CGH	146
11.2 Bruchpunktnahe Kandidatengene der Tumorentstehung	147
11.3 Veröffentlichungen	149
11.3.1 Artikel in Fachzeitschriften	149
11.3.2 Kongressbeiträge	149
11.4 Lebenslauf	150
11.5 Auszeichnungen	150
11.6 Danksagung	151
11.7 Versicherung	152

Zusammenfassung

Epitheliale Tumoren der Niere des Erwachsenenalters weisen neben histologisch-zytologischen Merkmalen typische genetische Charakteristika auf, die mit dem biologischen Verhalten der Tumorzellen korrelieren. So findet man in klarzelligen, papillären und chromophoben Nierenzellkarzinomen (NZK) relativ häufig chromosomale Aberrationen, während die gutartigen Onkozytome vergleichsweise wenige Genomveränderungen aufweisen.

In der modernen Medizin versucht man, den Nachweis genomischer Veränderungen zur Diagnostik und zur Prognoseeinschätzung von Tumoren heranzuziehen. Ziele der molekularen Charakterisierung von Tumorerkrankungen sind deshalb, relevante Gene bzw. Aberrationen der Tumorphogenese zu identifizieren und diese Befunde zur Subgruppierung und Einschätzung der Erkrankung zu verwenden. Für die hier untersuchten Nierentumorerkrankungen sind bereits in der Vergangenheit eine Reihe verschiedener tumorrelevanter chromosomaler Veränderungen identifiziert worden aber lediglich das von Hippel-Lindau Tumorsuppressorgen (*VHL*) auf Chromosom 3 oder das *MET* Proto-Onkogen auf Chromosom 7 wurden als gesicherte pathogenetische Faktoren in der Entstehung von NZK identifiziert.

Mit der vorliegenden Arbeit soll ein Beitrag zur molekularen Charakterisierung der Nierentumor-Pathogenese geleistet werden. Die dafür gewählten Ansätze umfassen: (A) Die Analyse mehrerer NZK-Subtypen mit einer Auswahl molekularzytogenetischer Methoden, (B) die spezifische Untersuchung der Translokations-Bruchpunkte eines familiären NZK-Falles und (C) die molekulare Charakterisierung umschriebener Genomveränderungen im Bereich des *VHL*-Lokus auf Chromosom 3p25.

(A) Hierfür wurden 91 epitheliale Primärtumoren und sechs Nieren-Zelllinien mit der vergleichenden genomischen Hybridisierung (CGH; *comparative genomic hybridization*) untersucht. Verschiedene Kopienzahl-Aberrationen wurden identifiziert, die teilweise auf spezifische Chromosomenregionen einzugrenzen waren, was auf dort lokalisierte Nierentumor-assoziierte Gene hinweisen könnte. Ferner konnte das Auftreten spezifischer chromosomaler Aberrationen mit dem dokumentierten Krankheitsverlauf assoziiert werden (prognostische Aussagekraft). In der Gruppe der klarzelligen NZK ging der Verlust der Chromosomen 10 und 17 mit einer hohen Dedifferenzierung der Karzinomzellen, ein Zugewinn des Chromosoms 5 mit einem hohen Differenzierungsgrad einher. Für klarzellige NZK konnte darüber hinaus nachgewiesen werden, dass der Verlust von Chromosom 4 mit hohem Tumorstadium und ein Zugewinn von Chromosom 8q mit einer ungünstigeren Prognose korreliert. Für das papilläre NZK konnte durch die vorliegende Arbeit eine Korrelation des Verlusts von Chromosom 14 mit einer ungünstigen Prognose demonstriert werden. Der ebenfalls untersuchte chromophobe NZK-Subtyp zeigte in Tumoren hohen Stadiums den Verlust von Chromosom 6, wohingegen ein Verlust von Chromosom 8 mit einer günstigen Prognose in Beziehung stand. Bei Tumoren mit ungünstiger Prognose war ein Verlust der Chromosomen 2 oder 17, sowie Zugewinne der Chromosomen 9, 12 und X nachweisbar. Bei den Onkozytomen fanden sich im Verhältnis zu den anderen untersuchten Subtypen - wie erwartet - wenige Genom-Imbalancen. Dieser Subtyp wies insbesondere Verluste der Chromosom 1 und Y, sowie Zugewinne des Chromosoms 7 auf. Die somit als Progressions-assoziiert oder Prognose-relevant identifizierten Chromosomen(bereiche) 5(q22-qter), 4, 10, 14q, 17, 6, 8, 9, 12 können als aussichtsreiche Ausgangspunkte für eine Suche nach Karzinomsubtyp-spezifischen, relevanten Tumorgenen dienen. (B) Zytogenetische Analysen einer Familie mit Veranlagung zur Entwicklung eines klarzelligen NZK führten zum Nachweis einer mit der Erkrankung gekoppelten, reziproken Translokation zwischen den Chromosomen 3 und 8 im peripheren Blut. Weitergehende molekularzytogenetische Untersuchungen mit FISH und Multiplex-FISH deckten ein komplexes chromosomales Rearrangement t(3;8)(q13.1;p21.1) auf. Aufgrund der engen Eingrenzung der Bruchpunkte kann hier eine gezielte Gensuche mit Hilfe positioneller Klonierungsmethoden angeschlossen werden. (C) Die Feinkartierung der chromosomalen Region um den *VHL*-Genlokus ist insbesondere bei Tumoren ohne molekulargenetisch nachzuweisenden *VHL*-Verlust erforderlich. Um die Identifikation weiterer in dieser Region kartierender, evtl. ko-deletierter Tumorsuppressor-Kandidatengene zu ermöglichen, wurden genomische (PAC)-Sonden isoliert, charakterisiert und zur Deletionskartierung eingesetzt.

1 Einleitung

1.1 Der Tumorgeneseprozess auf molekularer Ebene

Krebs ist eine genetische Erkrankung. In jeder Zelle unterliegt die genetische Information einer ständigen Veränderung in Form von Mutationen. Derartige Ereignisse finden natürlicherweise statt, denn es werden in der Zelle endogene, DNA-verändernde Metabolite gebildet. Hinzu kommen exogene Faktoren, wie z.B. ultraviolette/ionisierende Strahlung oder chemische Mutagene, welche die Erbinformation verändern. Diesen Veränderungen wird durch eine kontinuierlich arbeitende DNA-Reparatur entgegengewirkt, die spezifisch verschiedene Läsionen rückgängig macht. Sind die zelleigenen Reparaturmechanismen erschöpft oder arbeiten ineffektiv, so kommt es zu einer Mutationshäufung. Die Wahrscheinlichkeit der Konservierung einer Mutation in funktionell relevanten Sequenzen nimmt dann in jeder einzelnen Zelle zu. Die Konsequenz aus der Anhäufung von Mutationen ist in eukaryontischen Zellen meist der irreversible Zellzyklusarrest (Seneszenz), oder aber die Einleitung des programmierten Zelltodes (Apoptose). Somit unterliegen Zellen, deren Genom Mutationen unterworfen wird, einer negativen Selektion. In seltenen Fällen erlangt eine Zelle, die Mutationen aufgrund deregulierter zellulärer Kontroll-Mechanismen toleriert, durch das Mutationsereignis einen Selektionsvorteil gegenüber umliegenden, unveränderten Zellen. Die Expansion eines bevorzugt proliferierenden, mutierten Klons eröffnet Tochterzellen die Möglichkeit weiterer Mutationsanhäufung. Anhand tierexperimenteller und epidemiologischer Studien konnte gezeigt werden, dass eine Zelle vier bis sechs relevante Mutationen ansammeln muss, um maligne zu entarten (Renan, 1993). Am Beispiel der Kolorektalkarzinogenese konnte gezeigt werden, dass entsprechend vier bis sechs histopathologische Stadien durchlaufen werden, bis das Stadium eines Karzinoms erreicht wird. Die Transformation vom epithelialen Normalstadium führt über das hyperplastische und mehrere adenomatöse Stadien schliesslich zum Karzinom (Fearon und Vogelstein, 1990; Kinzler und Vogelstein, 1996).

Derzeit sind sechs biologische Eigenschaften bekannt, die eine Tumorzelle von einer Normalzelle unterscheiden (Hanahan und Weinberg, 2000):

- Tumorzellen sind unabhängig von externen Wachstumsfaktoren,
- sind von der Zellzykluskontrolle entkoppelt,
- fähig der Apoptose zu entgehen,
- unbegrenzt replikationsfähig,
- in der Lage, Gefäßbildung zu induzieren und
- befähigt, benachbarte oder entfernte Gewebe zu invadieren.

Diese mit der Tumorgenese assoziierten zellbiologischen Veränderungen stehen in enger Beziehung zur Aktivität definierter, genetischer Elemente. Mittlerweile ist man in der Lage, die schrittweise Transformation von Zellen durch sukzessives Einbringen dieser Elemente in eine Primärzelle – zumindest partiell – nachzuvollziehen (Hahn und

Weinberg, 2002). Gene, deren Produkte durch Mutation einen qualitativen Funktionsgewinn bzw. –Verlust erfahren und in der Folge für die Ausprägung eines transformierten zellulären Phänotyps verantwortlich sind, können in die nachfolgend aufgeführten, funktionell charakterisierten drei Tumorgen-Gruppen eingeordnet werden.

1.1.1 Onkogene

Die Funktion von Onkogenen in der Tumorigenese wurde erstmals vor etwa 20 Jahren beschrieben. Entdeckt wurden Onkogene durch krebserzeugende Retroviren. Zelluläre Proto-Onkogene können im Verlauf DNA-verändernder Prozesse in Onkogene umgewandelt werden. Onkogenes Potenzial können Proto-Onkogene aber auch nach Translokations- oder Transpositionseignissen erlangen. In Abhängigkeit des Translokations- bzw. Integrationsortes kann es durch Positionseffekte zu dysregulierter Expression eines Proto-Onkogens kommen.

Die Produkte der Proto-Onkogene greifen in zelluläre Signalwege ein, die Proliferation und das Überleben der Zelle positiv regulieren. Im Unterschied zu Tumorsuppressor-Genen liegt der Tumorentstehung durch Onkogene eine physiologisch abnorme Verstärkung eines wachstumsstimulierenden Signals (positive Regulation) zugrunde. Es reicht die Veränderung in einem Allel eines Proto-Onkogens aus, um eine Zellentartung zu bewirken. Die Tumorigenese durch Proto-Onkogen-Aktivierung - das damit zum Onkogen wird - folgt somit einem dominanten Mechanismus. Ist ein Proto-Onkogen bei der Entstehung eines Tumors beteiligt, kommt es zum quantitativen oder qualitativen Zugewinn einer onkogenen Funktion, der auf wenigstens drei unterschiedlichen Entstehungsmechanismen beruhen kann:

Ein Proto-Onkogen kann in räumliche Nähe eines Gens transloziert werden, welches konstitutiv in hohem Maße exprimiert wird (z.B. Immunglobuline; Zellrezeptoren). Es gelangt dabei unter die Kontrolle der regulatorischen Bereiche dieses Gens. Die Expression des zellulären Proto-Onkogens wird so durch den Positionseffekt von seiner ursprünglich feinregulierten, regelgerechten Transkription entkoppelt. Konsequenz ist eine erhöhte Expression als zelluläres Onkogen (Tsujimoto et al., 1984).

Ein weiterer Mechanismus der Proto-Onkogen-Aktivierung ist die Translokation eines zellulären Proto-Onkogens in das Intron/Exon-Muster eines anderen Gens. Nach Transkription des neu entstandenen Gens und Prozessierung von dessen mRNA kann ein chimäres Fusionsprotein mit von den ursprünglichen Funktionen beider Gene verschiedenen onkogenen Eigenschaften entstehen (McLaughlin et al., 1987; Shtivelman et al., 1985).

Die häufigste Art der Proto-Onkogen-Aktivierung ist die durch Mutation hervorgerufene Veränderung der ursprünglichen Aminosäuresequenz. Tritt so beispielsweise durch „missense“-Mutation der Nukleotidsequenz ein Aminosäure-Austausch in einer essenziellen Domäne eines zellulären Proto-Onkogens auf, so kann dies zu einer Veränderung der Funktion führen, die sich dann auf das Wachstumsverhalten der Zelle auswirkt.

1.1.2 Tumorsuppressor-Gene

Tumorsuppressorgene (TSG) kodieren häufig Proteine, die Schlüsselfunktionen in der Zellproliferation, der zellulären Homöostase, der Differenzierung und der Apoptose besitzen. Die TSG-Proteine nehmen dabei meist eine negativ regulierende, meist wachstumshemmende Funktion wahr. Bereits ein intaktes Allel eines Tumorsuppressor-Gens ist ausreichend, die Tumorentstehung zu unterdrücken. Tumorsuppressoren sind daher Gene, die einem rezessiven Wirkmechanismus folgen. Erst ein doppel-allelischer Funktionsverlust („*loss of function*“) eines Tumorsuppressor-Gens durch Deletion oder funktionsinaktivierende Mutation führt zu unkontrollierter Zellteilung und Tumorentstehung.

Knudson postulierte in einem Modell der Allel-Inaktivierung den Mechanismus der Tumorentstehung durch den Wegfall der negativ regulierenden Funktion des *RB* Tumorsuppressor-Gens in zwei Schritten (Knudson, 1971). Der erste Schritt beschreibt die Inaktivierung eines Allels durch Deletion, Mutation oder epigenetische Inaktivierung. Bei sporadisch entstehenden Tumoren kommt es nach dem Ausfall des ersten Allels in einer somatischen Zelle zur Inaktivierung des zweiten Allels in der identischen Zelle oder in deren Tochterzellen (zweiter Schritt). Träger eines familiären Tumorsyndroms erben über die Keimbahn eines Elternteils bereits ein inaktiviertes Allel, das entsprechend in allen Körperzellen vorzufinden ist. Ereignisse, welche zur Tumorsuppressorgen-Inaktivierung führen, sind die Deletion, die funktionszerstörende Mutation oder epigenetische Inaktivierung des verbliebenen Wildtyp-Allels.

1.1.3 Mutator-Gene

Die dritte Gruppe von Genen, die Relevanz in der Tumorgenese besitzen, werden als Mutator-Gene definiert (Gartenhaus et al., 1996). Mutator-Gene spielen während der DNA-Replikation und in der Fehlerkorrektur der DNA eine essenzielle Rolle. Mutator-Phänotypen wurden zunächst in Bakterien, Hefen und in Mais beobachtet. Hinweise auf die Relevanz von Mutator-Phänotypen im Menschen ergaben sich zunächst bei der Untersuchung des Kolonkarzinoms (Bronner et al., 1994; Leach et al., 1996; Papadopoulos et al., 1994). Bei einem Funktionsausfall eines Mutator-Gens kommt es zu einer Störung der genomischen oder chromosomalen Integrität, nachweisbar in Form stark ansteigender Mikrosatelliten-Instabilität oder zytogenetisch anhand instabiler Karyotypen. Die funktionellen Grenzen zwischen Tumorsuppressor- und Mutator-Genen sind z.T. undeutlich, da beide Gruppen einem rezessiven Mechanismus folgen. Der Begriff der „*caretaker*“-Gene (Mutator-Gene) wird illustrierend den „*gatekeeper*“ Genen (Tumorsuppressorgenen) gegenübergestellt (Kinzler und Vogelstein, 1997). Dabei kodieren die *gatekeeper*-Gene Proteine, deren funktionelle Inaktivierung direkt die klonale Expansion und Tumorbildung vorantreibt (z.B. über ihre Wirkung auf die Zellproliferation). Ein Defekt in einem *Caretaker* stellt dem gegenüber keinen direkten Selektionsvorteil dar, sondern führt - durch die Funktion als "Integritätswächter des Genoms" – schneller zu Mutationen anderer *gatekeeper*- oder Onkogene. Da die Aktivität dieser Gene wiederum

in enger Beziehung mit den für eine Tumorzelle charakteristischen Eigenschaften steht (vgl. Kap.1.1), schreitet die Tumorgenese in Zellen mit Mutator-Phänotyp besonders schnell fort (Loeb, 1991).

1.2 Nierenzellkarzinome

1.2.1 Inzidenz, Risikofaktoren und Prognose

Tumorerkrankungen der Niere sind mit 3% aller auftretenden, soliden Krebserkrankungen des Menschen seltene Tumore (Hock et al., 2002). Von allen in Deutschland durch Krebserkrankungen verursachten Todesfälle standen Nierentumoren 1997 an achter (Männer) bzw. zwölfter (Frauen) Stelle (Becker und Wahrendorf, 1998). Von allen bösartigen Erkrankungen der Niere nimmt das aus dem Epithel der Nierentubuli entstehende Karzinom einen Anteil von 85 - 90% der Fälle ein (Meloni et al., 1992).

In westlichen Industriestaaten wird eine zunehmende Häufigkeit der Erkrankungen beobachtet. Weltweit steigt die Inzidenz über einen Beobachtungszeitraum von zwanzig Jahren jährlich um etwa 2%, wobei erhebliche regionale Schwankungen zu verzeichnen sind (Mathew et al., 2002). Die größte Häufigkeit des Nierenkarzinoms wurde in Skandinavien und Nordamerika festgestellt. Die niedrigsten Erkrankungsraten werden in Indien, China, Japan sowie Mittel- und Südamerika beobachtet (Parkin und Muir, 1992; McLaughlin und Schuman, 1983). Aktuelle Studien rechnen für die Vereinigten Staaten von Amerika (Deutschland) mit jährlich 30.000 (10.000) Neuerkrankungen (Chow et al., 1999; Landis et al., 1999; Fischer, 1999). Dabei konnte für Ballungsräumen im Vergleich mit dünn besiedelten Regionen eine erhöhte Inzidenz des NZK nachgewiesen werden (Doll, 1991). Das Risiko, an einem Nierenkarzinom zu erkranken, ist für Männer doppelt so hoch wie für Frauen (Richie et al., 1990). Neuere Studien zeigen für Deutschland im Beobachtungszeitraum 1990 – 1997 eine Mortalität von 7.3 – 8.3 für Männer bzw. 5 - 5.5 für Frauen pro 100.000 Personen (*WHO-Mortality Database, Internet ressource <http://www.who.int/research>*).

Die 5-Jahres Überlebensrate ist abhängig vom Tumorstadium bei Diagnosestellung. Lag sie in den frühen sechziger Jahren noch bei knapp unter 40%, konnte die Rate durch verbesserte Diagnosetechniken erhöht werden und betrug in den frühen neunziger Jahren in Ländern mit hohem medizinischen Standard im Mittel knapp unter 60% (Elfving et al., 1997; Chow et al., 1999). Ab dem 35. Lebensjahr steigt die Inzidenz der Nierenkarzinome kontinuierlich und erreicht ihr Maximum im 6. Lebensjahrzehnt. Epitheliale Tumoren der Niere werden ebenfalls bei Kindern beobachtet, haben aber epidemiologisch bei kindlichen Nierenerkrankungen keine Bedeutung (Carcao et al., 1998).

Ursachen für die Entstehung des Nierenkarzinoms sind bisher noch weitgehend ungeklärt. Als Risikofaktoren gelten Übergewicht, Rauchen und Umweltfaktoren (Mellemgaard et al., 1995; Yu et al., 1986; Doll, 1996; Yuan et al., 1998; McLaughlin et al., 1990). Des Weiteren stehen hormonelle Faktoren im Verdacht, die Nierentumorgenese zu fördern (Chow et al., 1996). Als Umweltfaktoren gelten in der

Hauptsache diätetische (Chow et al., 1994a; Wolk et al., 1996) und berufliche Expositionen (Mandel et al., 1995) sowie Pharmaka. Besonders das mittlerweile vom Markt genommene Phenazetin (Chow et al., 1994b; McLaughlin et al., 1995) und andere nicht-steroidale Antiphlogistika stehen in Verdacht, durch Vorschädigung des Nierenepithels die Tumorentstehung in der Niere zu fördern (Gago-Dominguez et al., 1999). Diabetes mellitus und andere Vorerkrankungen wie Bluthochdruck, Nierensteinleiden, Schilddrüsenerkrankungen sowie verletzungs- oder krankheitsbedingte Vorschädigungen oder Infektionen der Niere scheinen die Tumorausbildung ebenfalls zu begünstigen (Schlehofer et al., 1996; Chow et al., 1997; Lindblad et al., 1999). Patienten mit autosomal dominant vererbter polyzystischer Nierenerkrankung sowie langjährige Dialysepatienten entwickeln deutlich häufiger Nierentumoren (Hughson et al., 1986; Watson, 1997). Etwa 5 % aller NZK-Fälle sind mit einer chronischen Nierenschädigung (Ishikawa und Kovacs, 1993) oder einer genetischen Prädisposition für das Nierenkarzinom assoziiert.

Raumforderungen der Niere und die damit einhergehende Kompression des Nachbargewebes verursachen nur selten Schmerzen. Die Mehrzahl Nierenzellkarzinome hat bei Diagnosestellung ein fortgeschrittenes Stadium erreicht, bei fast jedem dritten Patienten ist bereits eine Metastasierung eingetreten (Abi Aad et al., 1991). Mit Hilfe bildgebender Untersuchungstechniken wie Sonografie oder Tomografie werden inzwischen immer häufiger Tumoren in frühen Stadien (<2cm Durchmesser) erkannt und behandelt. Zufallsbefunde, in denen bei sonografischen oder radiologischen Standarduntersuchungen Auffälligkeiten der Niere bemerkt werden, nehmen einen großen Anteil ein.

Im Jahr 1997 einigten sich die Union Internationale Contre Le Cancer (UICC) und das American Joint Committee on Cancer (AJCC) über die zur Zeit international geltenden Prognosefaktoren (Srigley et al., 1997). Diese wurden entsprechend ihrer Relevanz in 3 Wertungskategorien unterschieden:

- In Literaturdaten beschriebene und im klinischen Alltag etablierte Prognosemarker (I)
- Extensiv in biologischen (IIA) / klinischen Studien (IIB) untersuchte Prognosemarker
- Gegenwärtig nicht in Kategorie I oder II eingruppierbare Marker (III)

In Tabelle 1 sind auszugsweise die relevanten, tumorbezogenen Prognosemarker aufgeführt. Dominiert werden die gängigen Faktoren von patho-morphologischen Parametern. Genetische und molekulare Prognosefaktoren werden beim Nierenkarzinom derzeit nicht in der Klinik eingesetzt. Genetische Marker sollen aber zunehmend zur Differenzialdiagnostik herangezogen werden (Swanson et al., 1997).

Der relevanteste, tumorbezogene Prognosefaktor ist das Tumorstadium bei Diagnose. Die 5-Jahres Überlebenswahrscheinlichkeit bei NZK-Patienten in Stadium I bei Erstdiagnose liegt bei über 60%, während die Chance, das gleiche Intervall bei Tumorstadium IV zu überleben auf unter 10% absinkt (Tabelle 3).

Tabelle 1: Auszug aus den derzeit gültigen, tumorbezogenen Prognosemarkern beim Nierenkarzinom (Srigley et al., 1997; Gelb, 1997).

Merkmal	Ungünstige Eigenschaft	Wertungskategorie
<u>Makroskopische Faktoren</u>		
Tumorbefall der Operationsränder	vorhanden	I
Metastasen	vorhanden	
Anzahl	multipel	I
Solitär	nicht entfernbar	I
Metastasierungsort	Leber, Lunge	I
<u>Mikroskopische Faktoren</u>		
TNM Einteilung	keine vorhanden / nicht durchführbar	I
Grad	hoher Grad	I
Histologischer Subtyp	kzNZK (konventionell)	I
	Sammelgangkarzinom (Ductus Bellini)	IIB
Architektur	sarkomatoide Transformation	I
Kernmorphologie	erhöhtes Volumen und Konturveränderung	IIB
<u>Biomolekulare Faktoren</u>		
DNA Gehalt (Ploidie)	Aneuploidie	IIB
<u>Proliferationsmarker</u>		
Ki-67 (MIB-1)	erhöht	IIB
AgNORs ¹	erhöht	IIB
PCNA ²	erhöht	III
<u>Apoptosemarker</u>		
TP53	-	III
BCL2	-	III
p21	-	III
Wachstumsfaktoren	-	III
Zelladhäsionsmoleküle	-	III
Angiogenese	-	III
Tumorsuppressorgene /	-	III
Onkogene	-	
Zytokine	-	III
Zytogenetische Anomalien /	-	III
Verlust der Heterozygotie (LOH)		

Innerhalb der TNM ist die Metastasierung ein sehr wichtiger Prognosefaktor. So überleben etwa 70 % aller Patienten ohne Metastasen einen Beobachtungszeitraum von fünf Jahren (Bretheau et al., 1995). Bei Metastasierung reduziert sich das Überleben der Patienten innerhalb eines 5 Jahresintervalls nach Operation auf 15 Prozent (deKernion et al., 1978). Die Bewertung des histologischen und nukleären Differenzierungsgrades (Grading) ist ein weiterer, etablierter Prognosefaktor (Goldstein, 1997; Thoenes et al., 1990b). Ein einheitlicher, internationaler Standard existiert hierfür nicht. Im Kern-Grading-Schema nach Fuhrman werden anhand der Zellkerngröße, der Kernmembranbeschaffenheit und der Nukleolen vier unterschiedliche Differenzierungstypen (differenziert (G1) bis völlig undifferenziert (G4)) unterschieden. Andere Schemata unterteilen in drei Gradingstufen (eine Übersicht in (Goldstein, 1997)). Die Einordnung eines Tumors in eine höhere Gradingstufe korreliert dabei mit schlechterer Prognose (Fuhrman et al., 1982). Als weitere tumorbezogene Prognosefaktoren finden die Tumorgröße (Medeiros et al., 1988; Herrlinger et al., 1992;

¹ „Argyrophilic nucleolar proteins“ (Silberfärbung der Nukleolus-organisierenden Regionen)

² „Proliferating Cell Nuclear Antigen“

Di Silverio et al., 2000), sowie Zelltyp (Moch et al., 2000; Golimbu et al., 1986) und DNA-Gehalt Anwendung (Di Silverio et al., 2000; Feil et al., 1999; Chin et al., 1985; Di Silverio et al., 1992).

Tabelle 2: Tumorstadieneinteilung nach dem TNM-System (nach AJCC/UICC, 1997) (Guinan et al., 1997).

T	Primärtumor
TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
T1	Tumor auf die Niere begrenzt, größte Ausdehnung: 7 cm oder weniger
T2	Tumor auf die Niere begrenzt, größte Ausdehnung: >7 cm
T3	Tumor breitet sich in größeren Venen aus oder infiltriert die Nebenniere oder perirenales Gewebe, jedoch nicht jenseits der Gerota-Faszie
T3a	Tumor infiltriert Nebenniere oder perirenales Gewebe, aber nicht jenseits der Gerota-Faszie
T3b	Tumor mit makroskopischer Ausbreitung in Nierenvene(n) oder Vena cava unterhalb des Zwerchfells
T3c	Tumor mit makroskopischer Ausbreitung in Vena cava oberhalb des Zwerchfells
T4	Tumor infiltriert über die Gerota-Faszie hinaus
N	Regionäre Lymphknoten
	•hilär •abdominal paraaortal •paracaval •interaortocaval
	Lateralität beeinflusst die N-Klassifikation nicht.
Nx	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Solitär, 2 cm oder weniger / Metastase(n) in solitären regionären Lymphknoten
N2	Solitär oder multipel, Metastasen in mehr als einem regionären Lymphknoten
N3	Multipel, mehr als 5 cm
M	Fernmetastasen
Mx	Vorliegen von Fernmetastasen kann nicht beurteilt werden
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

Tabelle 3: TNM Stadieneinteilung und deren Überlebenswahrscheinlichkeit bezogen auf das Gesamtkollektiv aller Nierenkarzinom-Patienten innerhalb eines postoperativen 5-Jahres-Intervalls. Modifiziert nach (Rini und Vogelzang, 2000).

		Überleben (gesamt)		
Stadium I	T1	N0	M0	60-90%
Stadium II	T2	N0	M0	50-60%
Stadium III	T1	N1	M0	20-40%
	T2	N1	M0	
	T3	N0/I	M0	
Stadium IV	T4	N0/I	M0	0-10%
	Jedes T	N2	M0	
	Jedes T	Jedes N	M1	

1.2.2 Diagnose und Therapie

Die Diagnose des Nierenkarzinoms wird vor allem durch moderne bildgebende Untersuchungsmethoden wie Ultraschall- oder Tomografiertechnik ermöglicht. Mit der Entwicklung von Nierentumoren ist häufig eine ektope Bildung nierenspezifischer Hormone verbunden. Von der Niere ins Blut sezernierte Hormone (z.B. Erythropoietin, Parathormon, Prostaglandine u.a.) werden daher als diagnostische Tumor-Marker

eingesetzt. Mikrosatellitenanalysen aus Blut oder Urin befinden sich als ergänzende Methode der prä-operativen Malignitätsabschätzung in Erprobung (Gonzalzo et al., 2002; Eisenberger et al., 1999; Ashida et al., 2000; Ashida et al., 2003).

Bei kleinen (<4cm), lokal begrenzten Karzinomen der Niere ist die radikale Nephrektomie die Standardtherapie. In jüngerer Zeit wird aber auch für dieses Tumorstadium die organerhaltende Therapie mit lokaler Tumorsektion angewendet. Zum Teil unabhängig vom Stadium kann allerdings vor allem bei papillären Nierenkarzinomen multifokales Wachstum beobachtet werden. Nicht erkannte und in der Niere verbleibende Tumorreste führen zur Rezidivbildung (in etwa 4% aller organerhaltend operierten Fälle). Hier ist dann eine radikale Nephrektomie erforderlich (Schlichter et al., 2000). Neuere Untersuchungen zeigen, dass bei lokal begrenzten Nierenkarzinomen eine operationsbegleitende, systemische Verabreichung von Radio-, Hormon-, Chemo- oder Immuntherapeutika gegenüber einer Nierenresektion alleine keine Prognosevorteile mit sich bringt (Godley und Escobar, 1998).

Eine Standardtherapie für das metastasierende NZK ist bisher nicht etabliert (Motzer et al., 1996). Die bei anderen Tumoren mit zum Teil sehr guten Ansprechraten eingesetzte Strahlen-, Hormon- oder Chemotherapie versagt beim Nierenkarzinom. Nierenzellkarzinome zeigen eine auf unterschiedlichen physiologischen und pharmakologischen Mechanismen beruhende Zytostatika-Resistenz („*multi drug resistance*“, MDR) (Duensing et al., 1994; Mickisch et al., 1990; Mickisch, 1994; Hartmann und Bokemeyer, 1999; Schaub et al., 1999). In der klinischen Erforschung befinden sich derzeit Pharmaka, welche die zelleigenen Exkretionsmechanismen blockieren und somit als MDR-Inhibitoren wirken (Mistry et al., 2001).

Den derzeit erfolgreichsten Therapieansatz des metastasierten NZK stellt die Immuntherapie dar. Spontane Tumorrückbildungen zeigten in sehr geringen Fallzahlen, dass durch wahrscheinlich körpereigene Mechanismen der Immunabwehr der Nierentumor reduziert und sogar vollständig geheilt werden kann. Die Beobachtung, dass das Karzinom der Niere zwar zytostatikaresistent aber immunogen ist, führte in den letzten Jahren zu zahlreichen Therapieversuchen mit Immuntherapeutika (Haas und Hillman, 1996). Aus diesen Versuchsreihen ging die Therapie mit Interleukin-2 (IL-2), z.T. in Kombination mit alpha-Interferon (IFN α) hervor (Atzpodien et al., 1995b). Bei Behandlung mit diesen Zytokinen, welche die zellvermittelte Immunität stimulieren, wurden Ansprechraten von bis zu 30% erzielt (Rosenberg et al., 1985; Fyfe et al., 1995). Ergänzende Verabreichung von *ex vivo* kultivierten, autogenen Tumor-infiltrierenden Lymphozyten (TIL) (Steger et al., 1995) oder Lymphokin-aktivierten Killerzellen (LAK) (Rosenberg et al., 1985) verbessert die Ansprechrate der Immuntherapie im Vergleich zur Gabe von IL-2 alleine nicht. Die gemeinsame Verabreichung von IL-2 und 5-Fluorouracil [eines Pyrimidinanalogon], Vinblastin [Mitosehemmer] oder von 13-cis-Retinsäure [Vitamin A-Analogon] erhöht dagegen die Ansprechraten der Immuntherapie (Atzpodien et al., 1995a; Motzer et al., 1995). Obwohl das Tumorwachstum nach Zytokingabe stagniert und sich der Tumor manchmal sogar zurückbildet, kann ein rezidivfreies Überleben nach Immuntherapie in höchstens zehn Prozent der behandelten Patienten

beobachtet werden (Lopez et al., 1996; Figlin, 1999). Ein Grund für den verhältnismäßig schlechten Heilungserfolg nach der Gabe von immunstimulierenden Pharmaka ist die vom Nierentumor selbst ausgehende Modulation der Immunantwort (Banat et al., 2001). *In vitro* konnte außerdem an Onkogen transfizierten, murinen Fibroblasten gezeigt werden, dass das Phänomen der Immunresistenz in einigen Fällen auf einer Störung der MHC-I assoziierten Antigen-Prozessierungskaskade der Tumorzellen beruht (Seliger und Pfizenmaier, 1989; Brasanac et al., 1999; Dovhey et al., 2000).

Die Therapieresistenz des metastasierten Nierenkarzinoms resultiert in einer sehr schlechten Prognose. Lebensverlängerung unter Beibehaltung einer akzeptablen Lebensqualität steht beim metastasierenden NZK im Vordergrund der Behandlung.

1.2.3 Klassifikation epithelialer Nierentumore

Karzinome der Niere stellen eine heterogene Gruppe von Tumoren dar. Es wurden daher Kriterien festgelegt, die eine systematische Einteilung von Nierentumoren zulassen. Ergebnis solcher Bemühungen war eine Klassifikation anhand histologischer und zytomorphologischer Merkmale (Mostofi, 1981). Für die sogenannte „Mainzer Klassifikation“ der Nierentumore wurden zusätzlich elektronenmikroskopische und immunhistologische Befunde in die Typisierung einbezogen (Thoenes et al., 1986). Sie teilt die Karzinome der Niere nach drei Hauptmerkmalen ein: Zelltyp, Wachstumsmuster und Differenzierungsgrad („*grading*“). Hierbei wird der Zelltyp als primäres Merkmal, Wachstumsmuster und der Differenzierungsgrad der Tumorzellen als sekundäre Merkmale bewertet.

Die aktuelle pathologische Klassifikation von 1997 kombiniert darüber hinaus genetische Erkenntnisse mit den etablierten Kriterien. Sie klassifiziert somit die Nierentumoren anhand zytologischer, morphologischer und genetischer Parameter sowie anhand des Ursprungsortes im Nephron. Derzeit werden im Wesentlichen vier Subtypen des Karzinoms und das Onkozytom der Niere unterschieden (vgl. Abbildung 1) (Störkel et al., 1997; Kovacs et al., 1997), denen charakteristische chromosomale Veränderungen zugeordnet werden können (vgl. Tabelle 4/Tabelle 5 und Kap.1.2.4).

Tabelle 4: Pathologische Klassifikation der Nierenkarzinome und deren charakteristische zytogenetisch erfassbaren Veränderungen (Störkel et al., 1997).

Karzinomtyp	Ursprungsgewebe	zytogenetische Charakteristik	Inzidenz
klarzelliges NZK	proximaler Tubulus	-3p +5, +7, +12, -6q, -8p, -9, -14q, -Y	70-75 %
papilläres NZK	proximaler Tubulus	+7, +17, -Y +3q, +12, +16, +20 Translokationen mit Bruchpunkt Xp11.2	12-15 %
chromophobes NZK	interkalierte Zellen des kortikalen Sammelrohres	kombinierte Monosomien Chromosom 1, 2, 6, 10, 13, 17, 21 Hypodiploidie	4-6 %
Ductus bellini- oder Sammelgang-Karzinom	medulläres Sammelrohr	keine ³	1 %

³ zu geringe Fallzahlen

Tabelle 5: Pathologische Klassifikation der Nieren-Adenome nach Störkel 1997 und Übersicht über die zugeordneten zytogenetischen Veränderungen (Störkel et al., 1997).

Adenomtyp	Ursprungsgewebe	zytogenetische Charakteristik	Inzidenz
papilläres Adenom	proximaler Tubulus	-Y, +7, +17	
Onkozytom	interkalierte Zellen des kortikalen Sammelrohres	-1, -Y Translokationen mit Bruchpunkt 11q13	5 %
Metanephrisches Adenom und M. Adenofibrom	Embryonales, metanephrisches Blastem cuboidale Epithelzellen	keine	<1%

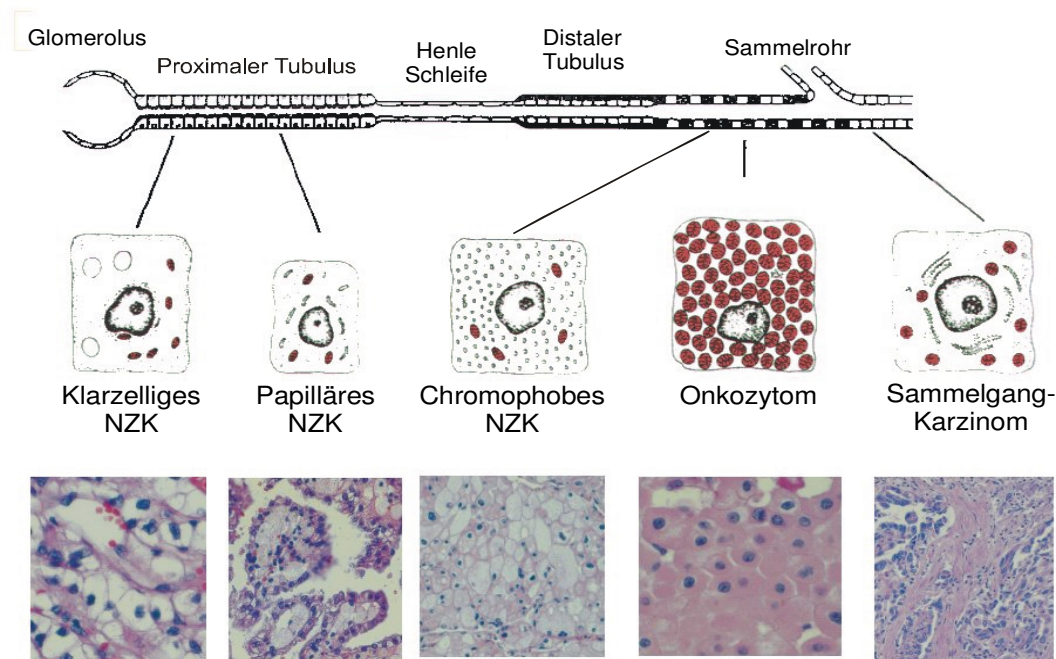


Abbildung 1: Zuordnung der fünf häufigsten epithelialen Neoplasien des Nephrons zu deren Ursprungsort (verändert nach (Thoenes et al., 1990b)). Bemerkenswert ist die hohe Mitochondriendichte der Onkozytomzellen. Histologische Schnitte der Subtypen nach Hämatoxylin / Eosin-Färbung sind im unteren Bereich dargestellt. Aus (Störkel, 1999).

Der häufigste Subtyp ist das aus den Epithelzellen des proximalen Tubulus entstehende, klarzellige Nierenkarzinom (kzNZK). Bis zu 75% aller Nierentumoren können diesem Subtyp des NZK zugeordnet werden. Die Tumoren dieses Subtyps besitzen meist eine gute Gefäßversorgung und zeigen ein aggressiveres Wachstum als die papillären oder chromophoben Nierenkarzinome (Moch et al., 2000).

Das sich ebenfalls aus proximalen Tubulusepithelzellen entwickelnde, tubulo-papillär wachsende papilläre (oder auch chromophile) Karzinom der Niere ist mit etwa 15% am zweithäufigsten an den Tumorerkrankungen der Niere beteiligt. Histologisch wird das papilläre NZK in zwei Typen, Typ 1 bzw. Typ 2 unterteilt (Delahunt und Eble, 1997). Papilläre Karzinome vom Typ 2 zeigen innerhalb dieser Subgruppe eine schlechtere Prognose (Moch et al., 2000).

Das ontogenetisch den interkalierten Zellen des kortikalen Sammelrohrs zuzuordnende, chromophobe NZK ist mit ca. 5% der dritthäufigste epitheliale Tumor der Niere (Störkel et al., 1989; Ortmann et al., 1991; Thoenes et al., 1990b). Es weist eine günstigere Prognose als das klarzellige oder papilläre Nierenkarzinom auf (Moch et al., 2000).

Der vierte Subtyp, das Sammelgang- oder Ductus Bellini-Karzinom stellt mit einem Anteil von weniger als 1% aller Nierenkarzinome einen Subtyp mit sehr aggressivem Wachstumsverhalten dar, wohingegen Onkozytome der Niere gutartige Adenome sind, die unabhängig von der Tumorgroße kein Metastasierungspotenzial besitzen. Wie chromophobe NZK nehmen sie ihren Ausgang aus interkalierten Zellen des kortikalen Sammelrohres (Störkel et al., 1988) (vgl. Abbildung 1) und haben an den Tumoren der Niere einen Anteil von etwa fünf Prozent. Neben den genannten werden unter der Bezeichnung unklassifizierte Nierenkarzinome all jene Nierenkarzinome geführt, die sich nicht in eine der vier Gruppen einordnen lassen (ca. vier bis fünf Prozent aller Nierenkarzinome).

1.2.4 Genetische Veränderungen in Nierentumoren

Die Mehrzahl aller Nierentumore tritt sporadisch auf. Im Unterschied zu familiären Nierenkarzinomen sind multifokale, bilateral auftretende sporadische Tumoren seltener zu beobachten. Die sporadische Form des Nierentumors unterscheidet sich von der familiären Form im Wesentlichen durch das Manifestationsalter: Während familiäre Tumoren meist innerhalb der ersten drei Lebensjahrzehnte zum Ausbruch kommen, manifestieren sich sporadische Tumoren erst ab der 6. Lebensdekade. Der konstitutionelle Karyotyp zeigt bei allen Patienten sporadischer Tumoren keine zytogenetische Auffälligkeit.

Da die genetischen Veränderungen familiärer Formen des Nierenkarzinoms teilweise identisch sind mit solchen, die für sporadische Nierenkarzinome verantwortlich sind, dienen die Untersuchungen familiärer Fälle dem Verständnis der genetischen Mechanismen der Entstehung sporadischer Formen. Dabei können sich familiär auftretenden Tumore ausschließlich nierenspezifisch ausbilden (familiäre kzNZK, familiäre Form des papillären Nierenkarzinoms [HPRCC, „*hereditary papillary RCC*“], familiäres onkozytäres Tumorsyndrom) oder aber Bestandteil eines Krankheitssyndroms mit assoziierter Tumorprädisposition multipler Organe, wie dem von Hippel Lindau-Syndrom (VHL-Syndrom), sein. Selten werden Tumore der Niere auch im Zusammenhang mit Erkrankungen wie der tuberösen Sklerose oder der zystischen Nierenerkrankung beschrieben (Jones et al., 1997; Hughson et al., 1986).

Häufig sind in familiären Fällen beide Nieren von multifokal wachsenden Tumoren betroffen. Bei vielen der Betroffenen ist eine familiäre Prädisposition für eine Nierenkarzinom-Erkrankung erkennbar. Vereinzelt werden aber auch *de novo* Keimbahnmutationen diagnostiziert (Richards et al., 1995; Decker et al., 1996).

1.2.4.1 Klarzelliges Nierenkarzinom

Zytogenetische Untersuchungen an Tumoren Niere ergaben in 80% aller untersuchten **sporadischen Fälle** Aberrationen des Chromosoms 3 (Kovacs et al., 1987; Kovacs et al., 1988a). Eine Zusammenfassung aller chromosomalen Veränderungen fand in über 300 untersuchten NZK Zugewinne von Chromosom 3 in 3.2%, Translokationen ohne zytogenetisch sichtbaren Verlust in 3.2% und Translokationen mit erkennbarem Zugewinn oder einfachem Zugewinn in 11.7% (Mitelman, 1995). Interstitielle Deletionen innerhalb des kurzen Arms von Chromosom 3 wurden durch LOH („*loss of heterozygosity*“) -Studien an mikrodisssezierten Primärtumorzellen in 8.1% der Fälle gefunden (Alimov et al., 2000). Häufigste zytogenetisch detektierbare Aberration ist mit 73.4% der Verlust des distalen Endes des kurzen Arms von Chromosom 3. In 40% aller Fälle ist der Verlust genomischen Materials von Chromosom 3 mit einer unbalancierten Translokation kombiniert (Mitelman, 1995). Die chromosomale Bande 3p13 nimmt wegen der großen Anteile an unbalancierten Translokationen eine Sonderstellung ein. Der Bereich scheint besonders häufig an chromosomalen Translokationen beteiligt zu sein, die zu Verlusten distaler chromosomaler Segmente von Chromosom 3p führen (Kovacs et al., 1988a). Die nachfolgende Tabelle 6 gibt einen Überblick über den Verlust chromosomaler Banden des Chromosomenarmes 3p bei klarzelligem Nierenzellkarzinomen in der Literatur.

Tabelle 6: Zytogenetisch dokumentierte Verluste des humanen Chromosomenarms 3p in Nierentumoren (verändert nach (Erlandsson, 1998))

Bande	Verlust von mindestens (%)	ausschließlich Deletion (%)	Unbalancierte Translokation (%)
3p11	35.9	3,2	3,9
3p12	39.2	1.3	3.6
3p13	61.2	3.2	18.8
3p14	69.9	6.8	1.9
3p21	72.4	1.3	1.6
3p25	73.4	0.3	0.3

Neben strukturellen Aberrationen des Chromosoms 3 konnten beim klarzelligem Nierenkarzinom durch konventionelle, zytogenetische Untersuchungen häufig strukturelle und numerische Veränderungen an Chromosom 5, 6, 7, 8, 9, 14 und den Geschlechtschromosomen gefunden werden. Hierbei sind die Trisomie 5q, Monosomie von Chromosom 6, strukturelle Anomalien in Bande 6q21-q23, Trisomien des Chromosoms 7, der Verlust einer Kopie des Chromosoms 14 und der Geschlechtschromosomen als häufigste Anomalien zu nennen (Walter et al., 1989; Iqbal et al., 1996; van den Berg et al., 1993; van den Berg et al., 1997).

Die **familiäre Form** des klarzelligen Nierenkarzinoms nimmt einen Anteil von 1-2% aller Nierentumore ein. Die Erkrankung führt bereits in frühem bis mittlerem Lebensalter (4. Lebensdekade und früher) zur Tumorbildung (Levinson et al., 1990; Maher und Yates, 1991; Li et al., 1993). Auf zytogenetischer und molekularer Ebene können familiäre kzNZK in zwei Gruppen unterteilt werden: solche *mit* und solche *ohne* Beteiligung von Loci des kurzen Arms von Chromosom 3 am Tumorgeneseprozess.

Bei der am weitesten verbreiteten, für ein familiäres kzNZK verantwortlichen Erkrankung, dem von Hippel-Lindau Syndrom (VHL-Syndrom), kommt es zum funktionellen Ausfall des *VHL*-Tumorsuppressorgens (lokalisiert auf Chromosom 3p25-26; vgl. Diskussion Seite 98). Als Folge treten neben den typischen, früh auftretenden, klarzelligen Nierentumoren Hämangioblastome des ZNS, *Angiomatosis retinae*, Tumoren der Nebenniere (Phäochromozytome), Zysten des Pankreas, Tumoren des Innenohres und zystische Tumoren des Nebenhodens auf (Zbar und Lerman, 1998). Bei der VHL-Erkrankung handelt es sich um ein autosomal dominant vererbtes Tumoprädispositionssyndrom. Die Krankheit tritt mit nahezu vollständiger Penetranz und variabler Expressivität in Erscheinung.

Weitere familiäre kzNZK-Fälle weisen konstitutionelle Translokationen auf, die Bereiche des Chromosoms 3 betreffen. Übereinstimmend konnte bei allen für das klarzellige Nierenkarzinom prädisponierenden, konstitutionellen Translokationen gezeigt werden, dass entweder das derivative Chromosom, welches das 3p-Material enthält oder aber das Normalchromosom 3 im Tumorgewebe verloren geht. Die Analyse des *VHL*-Gens ergab, dass das verbleibende *VHL*-Allel in der überwiegenden Zahl der Fälle (jedoch nicht in allen Fällen !) im Tumor durch Mutation oder epigenetische Modifikation inaktiviert wird. Die molekulare Analyse der beteiligten Bruchpunkte führten in manchen Fällen zur Identifikation weiterer, für die Tumorerkrankung möglicherweise relevanter Gene, wie z.B. das Gen *FHIT* (*fragile histidine triad*) (Sükösd et al., 2003; Ramp et al., 2002).

Wie erwähnt, weisen nicht alle familiären Formen des kzNZK eine Translokation mit Beteiligung von Chromosom 3 oder aber den Funktionsverlust von *VHL* auf. Da diese Fälle zumeist zytogenetisch unauffällig sind, führen Untersuchungen mit zytogenetischen Methoden nicht weiter und müssen durch molekulargenetische Untersuchungen ergänzt werden. Von besonderem Interesse ist hierbei, *VHL*-unabhängige, tumorrelevante Gene zu identifizieren, die dann gezielt molekular und funktionell untersucht werden können.

1.2.4.2 Papilläre Nierenkarzinome

Sporadische Karzinome des papillären Subtyps sind zytogenetisch und molekulargenetisch durch Polysomien der Chromosomen 7, 12, 16, 17 und 20, sowie den Verlust des Y-Chromosoms gekennzeichnet (Kovacs, 1989a; Kovacs et al., 1991; Presti, Jr. et al., 1991; van den Berg et al., 1993; Moch et al., 1998a). Zytologische und histologische Unterschiede innerhalb der papillären Karzinome führten zu einer weiteren Differenzierung in zwei Subtypen (Delahunt und Eble, 1997). Morphologische Merkmale von Typ 1 und Typ 2 des papillären Nierenkarzinoms konnten in einer CGH-Studie mit

genetischen Charakteristika korreliert werden (Jiang et al., 1998b). Dabei fand sich der Zugewinn der Chromosomen 7 und 17 bevorzugt in Karzinomen des Typ 1. Papilläre Karzinome zeigen zudem einen morphologischen Übergang von Adenom zu Karzinom, der mit dem Zugewinn der Chromosomen 12, 16, und 20 einher geht (van den Berg et al., 1997). Papilläre Karzinome treten im Vergleich zu klarzelligen NZK häufig multifokal auf. Mutationen des *MET*-Protoonkogens, wie sie in der familiären Form dieses Subtyps gefunden werden (s.u.), sind in sporadischen Karzinomen selten. Hier wird häufig gesteigerte Expression von *MET* beobachtet (Schmidt et al., 1997; Schmidt et al., 1999a). Mutationen von *MET* werden in anderen Subtypen des Nierenkarzinoms nicht gefunden.

Gehäuft finden sich in papillären Karzinomen Translokationen des Chromosoms Xp11.2 mit verschiedenen Translokationspartnern. In etwa zwanzig Fällen wurde die Translokation mit unterschiedlichen Regionen des Chromosoms 1 [t(X;1)(p11.2;q21)] oder [t(X;1)(p11.2;q34)] gefunden (Dal Cin et al., 1998; Desangles et al., 1999; Kardas et al., 1998; Meloni et al., 1993; Perot et al., 1999; Shipley et al., 1995). Die Translokation mit Chromosom 17 [t(X;17)(p11.2;q25)] (Hernandez et al., 1995) und der Verlust der Chromosomenbande Xp11 (Ohjimi et al., 1993) sind gleichfalls beschrieben worden. Die molekulare Charakterisierung des Bruchpunktes der [t(X;1)(11.2;q21)] konnte zeigen, dass der Transkriptionsfaktor *TFE3* (Xp11.2) und das *PRCC* (*papillary renal cell carcinoma*)-Gen (1q21) von der Translokation betroffen sind. Die entstehenden Fusionsgene *TFE3PRCC* und *PRCCTFE3* konnten in Tumorzellen exprimiert nachgewiesen werden (Sidhar et al., 1996; Weterman et al., 1996b; Weterman et al., 1996a)

Familiäre papilläre Nierenkarzinome (HPRCC = „*hereditary papillary renal cell carcinoma*“) sind selten. Betroffene Individuen entwickeln bilateral multifokale Tumoren mit papillärer Histologie und überwiegend guter Differenzierung. Der Zeitpunkt der Diagnose liegt im Mittel bei 40 Jahren und damit deutlich unter der des sporadischen Karzinoms. Tumoren in anderen Organen als der Niere sind beim HPRCC selten zu beobachten. Zwar wurden bei Patienten oder deren Verwandten vereinzelt auftretende Tumoren anderer Organe beobachtet, jedoch ist die Fallzahl der untersuchten familiären Fälle zu gering, um eine Assoziation mit dem HPRCC zu postulieren (Zbar et al., 1995; Zbar et al., 1994; Schmidt et al., 1999b).

Eine familiäre Häufung papillärer Tumoren der Niere wurde schon früh beschrieben (Pearson, 1969; Franksson et al., 1972; Bernues et al., 1995). Allerdings fielen hier nur Patienten auf, die einer Generation angehörten. Eine Weitergabe der Tumor-Prädisposition lies sich in diesen Fällen nicht nachweisen. Erstmals wurde 1994 eine Familie beschrieben, die über drei Generationen hinweg papilläre Karzinome entwickelte (Zbar et al., 1994). Bei allen betroffenen Familienmitgliedern konnte ein Verlust von Chromosom 3 ausgeschlossen werden (Zbar et al., 1995). In molekularen Studien konnte in betroffenen Individuen ein mutiertes *c-MET* Proto-Onkogen gefunden werden. Diese Mutation findet sich in der Tyrosinkinase-Domäne des Gens und bewirkt eine

konstitutionelle, Liganden-unabhängige Aktivierung des Onkoproteins (Schmidt et al., 1997). Bei der Untersuchung von zwei weiteren HPRCC-Familien konnte in einer Familie die Duplikation und Überexpression des mutierten *MET* auf Chromosom 7q31 nachgewiesen werden. Die zweite untersuchte HPRCC-Familie wies in der Keimbahn keine Mutation von *c-MET* auf, jedoch konnte in deren untersuchten Tumoren die Duplikation nur eines elterlichen Allels nachgewiesen werden (uniparentale Disomie, UPD) (Fischer et al., 1998). Der Tumorentstehung liegt hier offensichtlich keine *MET* Veränderung zugrunde. Die gesteigerte Expression des Proto-Onkogens könnte hier womöglich, zusammen mit dem ebenfalls duplizierten MET-Liganden *HGF* (*hepatocyte growth factor*), einen autokrin-proliferativen Stimulus bewirken und so die Tumorentstehung begünstigen.

Mutationen im Fumarat-Hydratase Gen (*FH*) prädisponieren für hereditäre papilläre Karzinome des Typs 2. Träger von *FH*-Mutationen entwickeln neben papillären Nierenkarzinomen Leiomyomatosen der Haut und des Uterus (Tomlinson et al., 2002; Alam et al., 2003).

1.2.4.3 Chromophobe Nierenkarzinome

Der kombinierte Verlust der Chromosomen 1, 2, 3, 6, 10, 13, 17 und 21 ist eindeutiges Merkmal des **sporadischen chromophoben Nierenkarzinoms** (Speicher et al., 1994; Kovacs und Kovacs, 1992). Zytogenetische Untersuchungen von Kurzzeit-kultivierten Primärtumorzellen zeigen, dass neben diesen bekannten, kombinierten chromosomalen Verluste häufig ein hoher Grad der Polyploidisierung nachzuweisen ist (Shuin et al., 1996; Gunawan et al., 1999; Gerharz et al., 1995). Andere Studien konnten im chromophoben Subtyp Zugewinne der Chromosomen 7, 12, 16, 18 und 19, sowie strukturelle Anomalien des Chromosomenarmes 11q nachweisen (van den Berg et al., 1993). Metastasen des chromophoben Nierenkarzinoms zeigen zudem strukturelle Anomalien der Chromosomen 1, 5, 12, 15 und 18 (Dijkhuizen et al., 1998). Veränderungen mitochondrialer DNA wurde in chromophoben Karzinomen durch RFLP Analysen aufgedeckt (Kovacs et al., 1992). Sequenzierungen des mitochondrialen Genoms in 8 chromophoben Karzinomen belegten einen hohen Anteil somatischer Mutationen mitochondrialer DNA (Nagy et al., 2002).

Familiäre Formen des chromophoben Karzinoms sind äußerst selten. Das Birt-Hogg-Dubé-Syndrom (BHD), eine autosomal-dominant vererbte Erkrankung, prädisponiert für Nierentumoren (siehe auch Kap. 1.2.4.4). Die Mehrzahl der in diesem Zusammenhang gefundenen Tumore sind Onkozytome oder chromophobe Karzinome, jedoch werden auch Mischformen gefunden (Pavlovich et al, 2002). Zur Genetik der familiär auftretenden chromophoben Karzinome ist bisher nur wenig bekannt (Nickerson et al., 2002).

1.2.4.4 Onkozytome

Sporadische Onkozytome weisen nur wenige zytogenetische Auffälligkeiten auf. Das verhältnismäßig seltene Auftreten des Tumors führt zudem dazu, dass genetische Merkmale dieses Nierentumors nicht gut definiert sind. Zytogenetische Analysen konnten einerseits den Verlust des Chromosoms 1 und Y, andererseits die reziproke Translokation [t(5;11)(q35;q13)] detektieren (Brown et al., 1996; Crotty et al., 1992; Füzesi et al., 1998a; Kovacs et al., 1989b; van den Berg et al., 1995; Presti et al., 1996; Neuhaus et al., 1997). Eine CGH-basierte Studie identifizierte den Verlust von Chromosom 1 und/oder 14 (Presti, Jr. et al., 1996b). Weitere Veränderungen sind die Verluste von Chromosom 6p, 21 und der Verlust eines Geschlechtschromosoms. Ähnlich den chromophoben Karzinomen finden sich in Onkozytomen der Niere mitochondriale DNA-Veränderungen (Welter et al., 1989).

Familiäre Onkozytome treten selten auf (Weirich et al., 1998). Molekular-zytogenetische Untersuchungen zeigen als charakteristische Veränderung einen Verlust von Chromosom 1. Die Häufigkeit genomischer Veränderungen ist jedoch in familiären Onkozytomen deutlich geringer als in ihrer sporadischen Form (Junker et al., 2001). Familiäre Onkozytome treten im Zusammenhang mit dem Birt-Hogg-Dubé-Syndrom auf, einer Erkrankung, die neben multiplen Hautpapeln im Gesicht, am Hals und Oberkörper auch Nierentumoren und Kolonzysten in einem autosomal-dominanten Erbgang vererbt. Verantwortlich für das Syndrom ist das auf Chromosom 17p12-q11.2 lokalisierte *BHD* (Birt-Hogg-Dubé)-Gen (Khoo et al., 2001). Ein Patient ohne BHD-Syndrom aber mit zahlreichen, bilateralen Onkozytomen wies eine Translokation [(8;9)(q24.1;q34.3)] sowie Allelverluste des Chromosoms 1 und darüber hinaus eine ungewöhnliche missense Mutation in *VHL* auf (Teh et al., 1998).

1.3 Die Suche nach Tumor-Genen

Derzeitige Modellvorstellungen der Onkogenese sehen eine sequenzielle Abfolge von Genveränderungen als Grundlage der Entstehung und Progression eines Tumors an. Gene mit Relevanz für die Tumorentstehung gehören meist den zuvor beschriebenen drei Gruppen von Tumorgenen an (siehe Kap. 1.1). Viele tumorrelevante Gene konnten durch die Untersuchung von Zelllinien identifiziert werden, die unbegrenzt teilungsfähig sind, also bereits Merkmale zellulärer Transformation tragen. Solche transformierten Zellen sind relativ leicht zu kultivieren, haben aber den Nachteil, dass sie oft ein bereits fortgeschrittenes Tumorstadium repräsentieren und zudem aufgrund der Kulturbedingungen artifizielle Veränderungen aufweisen können.

Analysen primärer Tumorzellen, die ein möglichst authentisches genetisches Abbild des Tumors wiedergeben, werden einerseits wegen limitierter Mengen von Tumor-Material, andererseits wegen methodischen Gründen seltener durchgeführt. Bei der Analyse von Primärtumoren können im Unterschied zu Zelllinien vergleichende Untersuchungen von Genom, Transkriptom und Proteom zwischen Normal- und Tumorgewebe durchgeführt werden. Die Analyse eines gut charakterisierten Tumorkollektivs ist daher ein sehr aussichtsreicher methodischer Ansatz, nach Tumor-relevanten Genen zu suchen.

Mit der in Mainz vorhandenen Nierentumorbank und den zur Verfügung stehenden korrespondierenden klinischen und pathologischen Daten sind die Voraussetzungen für derartige Untersuchungen geschaffen worden.

1.3.1 Zytogenetische Methoden

Eine genetische Untersuchung beruhte lange Zeit ausschließlich auf der Beobachtung seggregierender Phänotypen (Mendel, 1865). Mit der Einführung der Zytogenetik konnten erstmals numerisch oder strukturell auffällige Chromosomenveränderungen mit dem Phänotyp in Verbindung gebracht werden. Die Bestimmung der korrekten menschlichen Chromosomenzahl markiert den Beginn der modernen zytogenetischen Analytik (Tjio et al., 1956).

Zytogenetische Untersuchungen bieten die Möglichkeit, alle klonalen Chromosomen-Aberrationen von (Tumor-) Zellen darzustellen. Die Untersuchung von Tumor-Chromosomen stellt spezielle Anforderungen an die Zellkulturbedingungen. Es muß vermieden werden, dass sich nur solche Primärtumorzellen in Kultur etablieren, deren genetische Ausstattung die Kulturbedingungen am besten tolerieren. Zudem ist der Mitoseindex primärer Tumorzellen *in vitro* meist deutlich herabgesetzt. Trotz der beschriebenen methodischen Problematik hat die konventionelle Zytogenetik wertvolle Informationen zur Aufklärung chromosomaler Veränderungen bei einer Vielzahl von Tumorerkrankungen, ganz wesentlich auch des Nierenkarzinoms, beigetragen (van den Berg et al., 1997; van den Berg und Dijkhuizen, 1999).

1.3.2 Molekular-zytogenetische Methoden

1.3.2.1 Comparative Genom-Hybridisierung (CGH)

Mit der 1992 eingeführten comparativen Genom-Hybridisierung (CGH) wurde eine molekular-zytogenetische Methode etabliert, die unabhängig von vitalem Gewebe und Zellkultur erlaubt, chromosomale Imbalancen des Tumors darzustellen (Kallioniemi et al., 1992). Grundlage der Methode ist die kompetitive Hybridisierung differenziell markierter Test- und Referenz-DNA auf Chromosomen eines gesunden, männlichen Individuums. Als Referenz-DNA dient konstitutionelle DNA aus Blut einer männlichen Normalperson. Bei kompetitiver Hybridisierung beider markierten DNAs auf den Normal-Karyotyp bei Suppression repetitiver Sequenzen (Landegent et al., 1987; Lichter et al., 1988) treten quantitative Unterschiede der Test-DNA gegenüber der Referenz-DNA zutage. Rechnerunterstützt erfolgt dann die Normalisierung der Referenz-Fluoreszenz, Hintergrundkorrektur sowie die Berechnung der Fluoreszenzintensitäts-Ratio (Test:Referenz) entlang der Chromosomenachsen (du Manoir et al., 1993; Piper et al., 1995; du Manoir et al., 1995a; du Manoir et al. 1995b).

Die CGH stellt eine Ergänzung zu bisher etablierten Methoden der Genomuntersuchung bei Tumoren wie z.B. Mikrosatellitenanalysen oder konventioneller Zytogenetik dar. Archivierte Tumorgewebeproben können mittels CGH retrospektiv untersucht werden. Da die DNA aus primärem Tumorgewebe isoliert wird, gibt die CGH die genomischen Verhältnisse des Tumors *in situ* wieder. Die Expansion einer Gruppe von Tumor-Klonen, die Zellkulturbedingungen gut toleriert und somit die ursprünglichen genomischen Verhältnisse im Tumor verfälschen kann, wird durch die CGH ausgeschlossen.

Die CGH weist genomische Verluste oder Zugewinne bestimmten chromosomalen Regionen zu. Eine chromosomale Veränderung, die sich nicht in einem Netto-Zugewinn oder –Verlust untersuchter DNA äußert, wie es beispielsweise bei balanzierten Translokationen der Fall ist, kann von der CGH nicht detektiert werden.

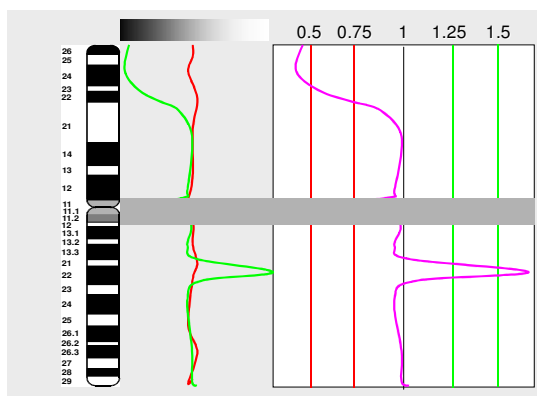


Abbildung 2: Links: Ideogramm des analysierten Chromosoms; mitte: Darstellung der Einzelfluoreszenzen; rot: Referenzfluoreszenz; grün: Testfluoreszenz; rechts: berechneter Fluoreszenz-quotient (Test:Referenz) magenta. Die mit Satelliten-DNA angereicherten Zentromerregionen können durch die Suppressionsbedingungen der Hybridisierung nicht bewertet werden und werden von der CGH-Analyse ausgenommen.

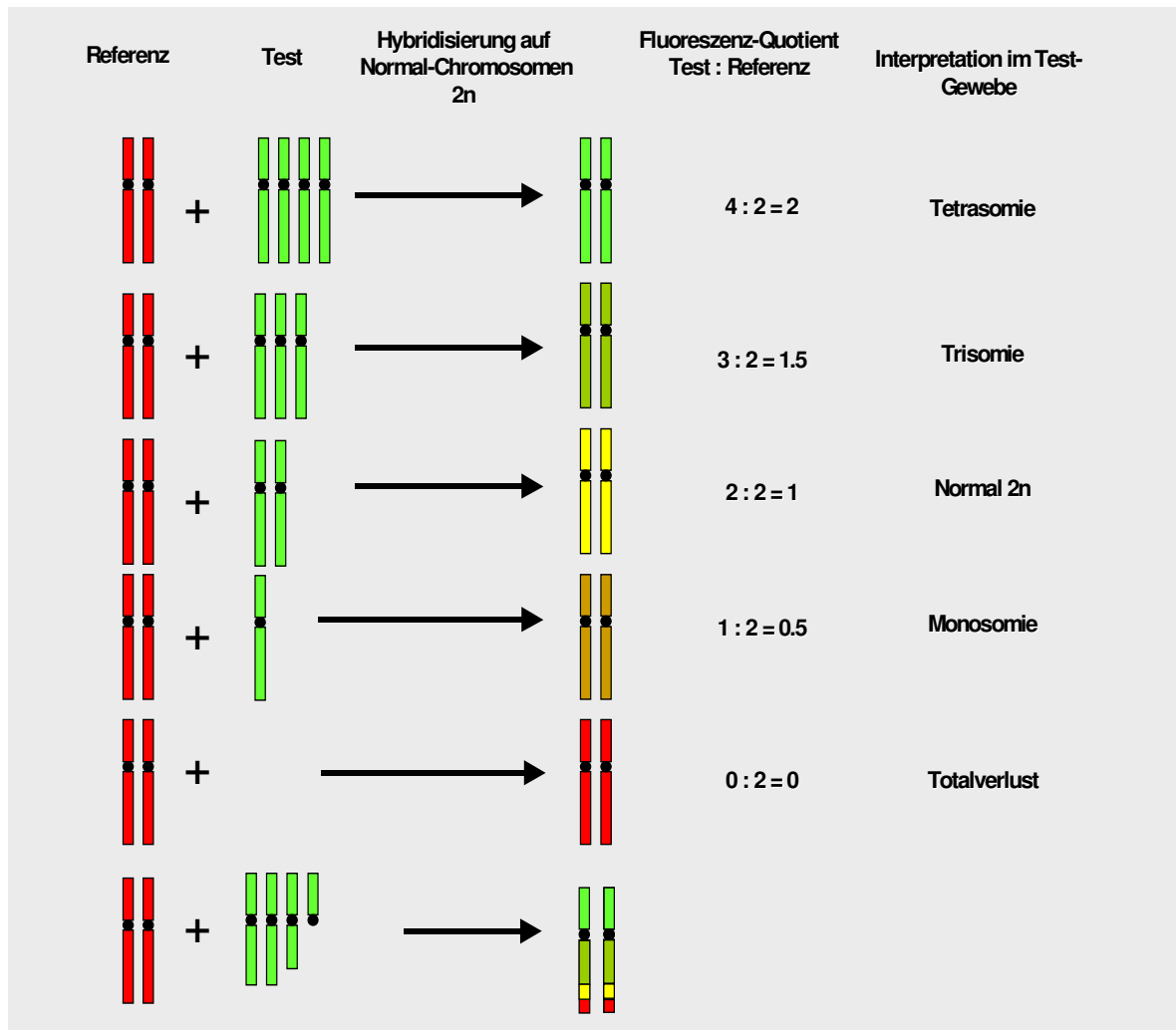


Abbildung 3: Interpretation des Fluoreszenzquotienten bezüglich der DNA-Anteile im Tumorgewebe. Dargestellt sind die Verhältnisse bei reiner Tumor-DNA. Im Tumorgewebe finden sich oft genomisch normale Zellen (Stroma-Fibroblasten oder Tumor-infiltrierende Lymphozyten) und der Quotient verschiebt sich hin zu Zwischenwerten. Durch strukturelle Rearrangements hervorgerufene, numerische Imbalancen verursachen ein tumorspezifisches Hybridisierungsmuster auf den beiden Zielchromosomen. Modellhaft abgebildet ist in der unteren Reihe ein Fall mit Tetrasomie des kurzen Chromosomenarms (hellgrün), Trisomie eines Teils des langen Chromosomenarmes (dunkelgrün), Disomie eines kurzen Teils des langen Armes (gelb) und Deletion des distalen Endes des langen Armes (rot).

1.3.2.2 Multiplex-FISH (M-FISH)

Die Methode der Multiplex-FISH wurde erstmals 1996 beschrieben (Speicher et al., 1996). Grundlage der Technik ist die initiale durchflußzytometrische Separation aller menschlichen Chromosomen. Nachfolgend werden die sortierten Chromosomen kombinatorisch zu fünf Chromosomenmischungen zusammengestellt.

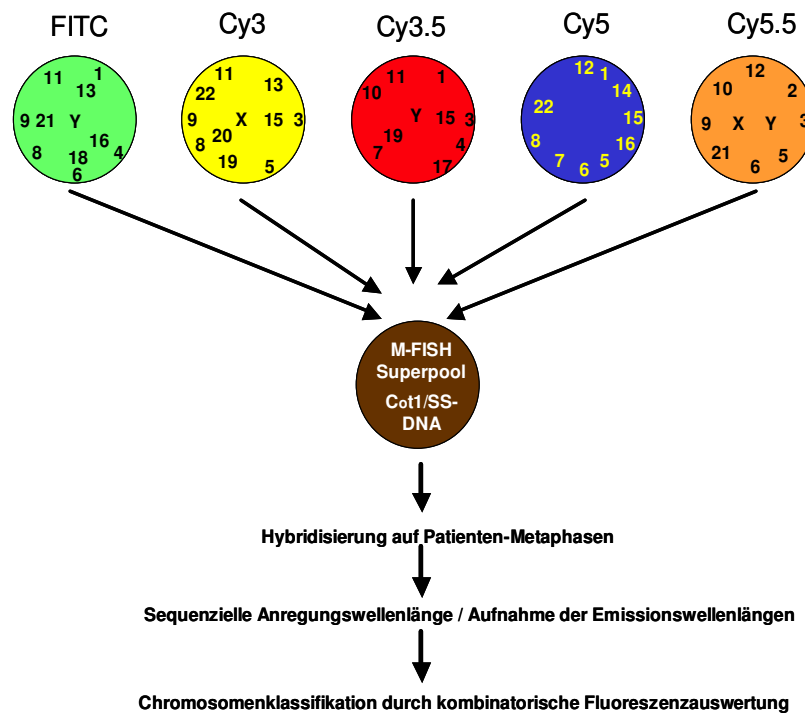


Abbildung 4: Prinzip der M-FISH. Fünf DNA-Mischungen mit differenzieller Fluorochrom-Markierung werden unter Suppressionsbedingungen (Lichter et al., 1988) (unter Zugabe von unmarkierter humaner $c_{ot}1$ -DNA und hochmolekularer Lachssperma-DNA („salmon sperm“-DNA)) gemeinsam gefällt und anschließend auf die zu untersuchenden Chromosomenpräparate hybridisiert. Die sequenzielle Aufnahme der sechs Fluoreszenzkanäle (fünf DNA-„Pools“ und DAPI Gegenfärbung) liefert die Rohdaten zur Bildauswertung. Der in die DNA interkalierende Farbstoff DAPI (Diaminophenylindol) färbt spezifisch Chromosomenareale an. Die DAPI Fluoreszenz wird als digitale Schablone genutzt, die später Grundlage der Bildauswertung ist.

Mit Hilfe der DOP-PCR („*degenerate oligo nucleotide priming*-PCR“) (Telenius et al., 1992a) werden die Mischungen differenziell mit modifizierten Nukleotiden markiert und dann in einem Hybridisierungsansatz vereinigt. Kombinatorisches Zusammenstellen der Mischungen ($n=5$) ermöglicht $2^{n-1} = 24$ Farbkombinationen (Speicher et al., 1996). Erreicht wird somit die spezifische Färbung aller 24 menschlichen Chromosomen. Die M-FISH und die vom Hybridisierungsablauf identische SKY („*spectral karyotyping*“) (Schrock et al., 1996; Liyanage et al., 1996) ist geeignet zur Aufklärung zytogenetisch auffälliger, komplexer chromosomaler Veränderungen, sogenannter Markerchromosomen. M-FISH nutzt zur Detektion der Fluoreszenzsignale hochspezifische Filtersysteme, die eine sequenzielle Erfassung der sechs Fluoreszenzkanäle ermöglichen (5 Chromosomenmischungen und eine DAPI Gegenfärbung). SKY unterscheidet sich von M-FISH durch die Methode der Bildaufnahme. SKY erfasst mit einer Aufnahme das spektrale Profil aller sechs Fluoreszenzen mittels eines Interferometers. Die Fluoreszenzspektren werden durch Fourier-Analysen in Farbbildinformation umgesetzt.

1.3.3 Molekulare Techniken

1.3.3.1 Detektion von Allelverlust durch Mikrosatellitenanalyse (MSA)

Neben konventioneller Zytogenetik und molekularzytogenetischen Methoden nehmen molekulargenetische Untersuchungen von Tumoren eine Rolle in der Aufklärung von Genomaberrationen ein. Eine wichtige Komponente der DNA Untersuchung stellt die Analyse von Mikrosatelliten dar. Diese Mikrosatelliten bestehen oft aus $(CA)_n$, $(AAAN)_n$ oder $(GA)_n$ Nukleotid-Wiederholungen (wobei n etwa 2-10 beträgt). Das menschliche Genom enthält etwa 50-100.000 solcher Sequenzblöcke, die sich an den meisten Lokalisationen in ihrer Länge von Individuum zu Individuum unterscheiden. Allel-Untersuchungen nutzen diese Varianzen von Mikrosatelliten. Etwa 10.000 solcher informativen (polymorphen) $(CA)_n$ oder $(GA)_n$ Marker sind für das humane Genom bekannt und lokalisieren statistisch verteilt im Abstand von ungefähr 300 kb (Kong et al., 2002). Die PCR-basierte Vervielfältigung derartiger genomischer Abschnitte liefert in diploiden Zellen zwei allelspezifische Produkte meist unterschiedlicher Länge, die einen heterozygoten Status des untersuchten Locus repräsentieren. Die Länge der mit polymorphen Markern generierten PCR Amplifikate liegt durchschnittlich bei etwa 100 bp. Die Tumorforschung nutzt die Mikrosatellitenanalyse zur Untersuchung von Allelverlusten im Tumorgewebe. Hierzu werden die Allelverhältnisse von Patienten DNA aus gesundem Gewebe (i.d.R. Lymphozyten) in Beziehung zum Allelstatus des Tumors im betroffenen Individuum gesetzt. Ein Verlust eines Allels in Tumor-DNA spiegelt sich im Verlust der Heterozygotie („*loss of heterozygosity*“, LOH) des untersuchten Mikrosatelliten wider. Allelverlust ist ein Mechanismus der Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen (Comings, 1973).

2 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die genetische Charakterisierung von Nierenzelltumoren. Mit Hilfe zytogenetischer, molekular-zytogenetischer und molekulargenetischer Techniken sollen tumorrelevante Genomveränderungen identifiziert werden. Neben konventioneller Zytogenetik sollen die FISH-Analyse, die vergleichende genomische Hybridisierung („*comparative genomic hybridization*“; CGH) und die Multiplex Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierung (M-FISH) zur Anwendung kommen, um eine möglichst umfassende Analyse aller genomischen Veränderungen in Tumorzellen zu erreichen. Durch molekulargenetische Techniken wie die Mikrosatelliten-Analyse können die gefundenen Aberrationen dann genauer eingegrenzt werden.

Eine statistische Korrelation spezifischer genetischer Veränderungen mit klinischen Parametern soll helfen, chromosomale Bereiche zu definieren, die das biologische Verhalten des Nierenzellkarzinoms bestimmen. Eine Eingrenzung Prognose- und Progressions-assoziiierter Chromosomen-Abschnitte soll dann die Grundlage zur Identifikation einzelner Tumorgene bilden. Zudem soll geklärt werden, ob sich mit den genannten Methoden subtypspezifische genomische Veränderungen finden lassen, die mit der histo-pathologischen Einteilung der Nierenzellkarzinome übereinstimmen und als Ergänzung der Diagnostik herangezogen werden können.

3 Material und Methoden

3.1 Chemikalien und Agenzien

Agarose (AMERSHAM Biosciences, Freiburg); Ethanol reinst (ROTH GmbH, Karlsruhe); Fötale Kälberserum (Greiner, Frickenhausen); Penicillin / Streptomycin (INVITROGEN GmbH, Karlsruhe); *Pokeweed Mitogen* 80µg / ml (Biochrom KG, Berlin); *Pokeweed Mitogen* (80 µg/ml) (BIOCHROM KG, Berlin); Antikoagulanzen Liquemin® (ROCHE, Grenzach-Wyhlen); Hanks balanced salt solution (HBSS) (INVITROGEN GmbH, Karlsruhe); RPMI 1640 (Seromed, Berlin); L-Glutamin (INVITROGEN GmbH, Karlsruhe); Colcemid Karyomax® (INVITROGEN GmbH, Karlsruhe); tri-Natriumcitrat-Dihydrat (ROTH GmbH, Karlsruhe); Methanol (SIGMA Chemie, Deisenhofen); Pepsin (Roche Diagnostics); Essigsäure 100% (SIGMA Chemie, Deisenhofen); Proteinase K (MERCK, Darmstadt); Natriumacetat (MERCK, Darmstadt); Magnesiumchlorid (SIGMA Chemie, Deisenhofen); Mercapto-Ethanol (SIGMA Chemie, Deisenhofen); Glycerin (MERCK, Darmstadt); Natrium-Dodecylsulfat (SIGMA Chemie, Deisenhofen); humane c₀t 1-DNA (1µg/µl) (INVITROGEN GmbH, Karlsruhe,); Dextransulfat (Sigma Chemie, Deisenhofen); Formamid deionisiert (Qbiogene-ALEXIS, Grünberg); Formamid (SIGMA Chemie, Deisenhofen); Kaliumdihydrogen-Phosphat (MERCK, Darmstadt); Di-Natrium Hydrogenphosphat (MERCK, Darmstadt); Natrium di-Hydrogenphosphat (MERCK, Darmstadt); Giemsa-Stammlösung (MERCK, Darmstadt); Entellan (MERCK, Darmstadt); Tri-Natriumcitrat (ROTH GmbH, Karlsruhe); Natriumchlorid (ROTH GmbH, Karlsruhe); Tween 20 (SIGMA Chemie, Deisenhofen); Nonidet-P40 (ICN Pharmaceuticals, Frankfurt am Main); Anti-Digoxigenin-TRITC / Avidin-FITC (QBIogene-ALEXIS, GRÜNBERG); DAPI / Antifade (QBIogene-ALEXIS, GRÜNBERG); Digoxigenin-11-dUTP 1mM (ROCHE Diagnostics, Mannheim); Biotin-16-dUTP 1mM (ROCHE Diagnostics, Mannheim); FITC (Fluorescein-Isothiocyanat)-dCTP, Cy3-dUTP, Cy5-dUTP, Anti DIG-Cy7, Avidin-Cy3.5 (AMERSHAM Biosciences, Freiburg); dATP, dCTP, dGTP, dTTP (peqlab, Erlangen); Gescherte Lachssperma-DNA (SIGMA Chemie, Deisenhofen); TRIS-(hydroxy-methylaminomethan)-HCl (MERCK, Darmstadt); TRIS (hydroxy-methylaminomethan) (ROTH GmbH, Karlsruhe); Salzsäure (MERCK, Darmstadt); NaOH-Lösung (MERCK, Darmstadt); NaOH Plättchen (ROTH GmbH, Karlsruhe); N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure, HEPES (MERCK, Darmstadt); Acrylamid (SERVA, Heidelberg); Acrylamid/Bisacrylamid-Lsg (ROTH, Karlsruhe); Ammoniumpersulfat APS (INVITROGEN GmbH, Karlsruhe); Borsäure (MERCK, Darmstadt); Bromphenolblau/Xylencyanol (SIGMA Chemie, Deisenhofen); Ethanol (ROTH, Karlsruhe); Ethidiumbromid 0.7mg/ml (EUROBIO, Raunheim); Ethylendiamintetraacetat EDTA (MERCK, Darmstadt); Formamid (SIGMA Chemie, Deisenhofen); Harnstoff (ROTH, Karlsruhe); HCl (MERCK, Darmstadt); Isopropanol (Apotheke des Klinikums); Maleinsäure (MERCK, Darmstadt); 10X PCR Puffer PE (Perkin Elmer, Norwalk); 1X Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) (Apotheke des Klinikums); 5X PCR Puffer A, D, J, M (INVITROGEN GmbH, Karlsruhe); Aqua ad injectabilia (BRAUN, Melsungen); Roti-Phenol (ROTH, Karlsruhe); Proteinase K (MERCK, Darmstadt); Tetramethylethylendiamin TEMED (BIO-RAD, München); Tween 20 (ROCHE Diagnostics, Mannheim, Mannheim); Ampicillin (RATIOPHARM, Ulm); IPTG (Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside) (ROCHE Diagnostics, Mannheim); X-Gal (EUROGENTEC, Belgien); Kanamycin (RATIOPHARM, Ulm); α³²P-dCTP (AMERSHAM Biosciences, Freiburg); Szintillationsflüssigkeit Rotiszint (ROTH, Karlsruhe); DNA QUANT Standard 200bp, 500bp, 1000bp (OMEGA BIO-TEK, Doraville, GA, USA); Trypton, Agar und Hefeextrakt (DIFCO Laboratories, Detroit, USA).

3.1.1 Sonstige Materialien

Kulturflaschen 25cm² oder 75cm² (T25 oder T75) (NUNC, Roskilde, Dänemark); Petrischalen (GREINER, Frickenhausen); Skalpell (DAHLHAUSEN, Köln); 15 und 50 ml Spitzbodenröhrchen (GREINER, Frickenhausen); Quarzküvetten, Schichtdicke 10mm (HELLMA, Müllheim); Kryoröhrchen (NUNC, Roskilde, Dänemark); Objektträger 76 × 26 mm (IDL, Nidderau); Deckgläser 24 × 50 mm (IDL, Nidderau); Deckgläschen 18 × 18 mm (IDS, Nidderau); Deckgläschen 15 × 15 mm (IDS, Nidderau); Fixogum Montagekleber (MARABUWERKE, Tamm); Feuchte Kammer (eigene Herstellung); Pasteurpipetten, Glas (Brand, Wertheim); Objektträgerküvetten nach Hellendahl ; Nagellack, Einfrierboxen (NALGENE, Roskilde); Hybond N+ Nylonmembran (AMERSHAM Biosciences, Freiburg); 384-Loch-Platte und -Stempel (GENETIX, Dorset, England);

fusselfreies Tuch Kimwipes (KIMBERLY-CLARK, Koblenz); Filmkassetten mit Verstärkerfolie (AMERSHAM Biosciences, Freiburg).

3.1.2 Kommerzielle Kits

- CGH-Nick Translation Kit (VYSIS, Downers Grove, IL; USA)
- DNA Preparation Kit from Mammalian Blood (ROCHE Diagnostics, Mannheim)
- High Pure Template Preparation Kit (ROCHE Diagnostics, Mannheim)
- *Nucleobond AX-Kits* (MACHERY und NAGEL, Düren)
- *Qiagen Plasmid Preparation Kit* (QIAGEN, Hilden)
- High Pure PCR-Product Purification Kit (ROCHE Diagnostics, Mannheim)
- TAMRA Kit mit 6x Blaumarker (APPLIED BIOSYSTEMS, Weiterstadt)
- GFX DNA and Gel Band Purification Kit (AMERSHAM Biosciences, Freiburg)
- TOPO TA[®] Cloning Kit Version K2[™] (INVITROGEN GmbH, Karlsruhe)
- Prime-It II Random Prime Labelling Kit (STRATAGENE, Amsterdam)

3.1.3 verwendete Primer

Zur Amplifikation genomischer Fragmenten für die Mikrosatellitenanalysen des Chromosomenarms 14q werden insgesamt 15 verschiedene Primerpaare verwendet. Der *forward* Primer ist am 5' Ende mit einem der drei Farbstoffe Fam (6-Carboxyfluorescein), Hex (Hexachloro 6-Carboxyfluorescein) oder Tet (Tetrachloro 6-Carboxyfluorescein) markiert. Informationen über viele bereits kartierte Mikrosatellitenmarker einschließlich Primersequenzen sind im Internet auf der Seite des Sanger Instituts (<http://www.ensembl.org>).

Tabelle 7: Primer-Sequenzen der verwendeten Mikrosatelliten-Loci. Jeweils der *forward*-Primer ist mit einem der drei Fluoreszenzfarbstoffe Fam, Hex, oder Tet markiert. Sämtliche für die Mikrosatellitenanalyse verwendeten *Primer* wurden bei der Firma APPLIED BIOSYSTEMS (ABI) in Weiterstadt synthetisiert.

Locus	Sequenzen [jeweils oben <i>forward</i>]	Allelgröße (bp)	Heterozygotie in Prozent	5'- Markierung
D14S80	5'-CAT CTA CCT GCC GCA A-3'	135-163	83	Fam (blau)
	5'-TAG CCA ATT TAT GGA TAC AAC TT-3'			
D14S70	5'-ATC AAT TTG CTA GTT TGG CA-3'	96-110	75	Hex (gelb)
	5'-AGC TAA TGA CTT AGA CAC GTT GTA G-3'			
D14S288	5'-AGC TAG ACT CTG CCA TAA ACA-3'	187-209	83	Tet (grün)
	5'-TGG AGA CAG GAA CAA CAC AC-3'			
D14S276	5'-TGC TTT ACC AAG TGC ATC AC-3'	233-245	76	Tet (grün)
	5'-AGC TCA GAA TCT AGG CCC T-3'			
D14S63	5'-GGC CAG GTT TCA ATC AGT TT-3'	172-190	76	Hex (gelb)
	5'-GCC AGA GAG CCA CAC TGT AT-3'			
D14S1011	5'-GCT GAG ATT GCA CCA CG-3'	175-191	76	Fam (blau)
	5'-GCC CCT TGA GAT CAG GTT-3'			
D14S258	5'-TCA CTG CAT CTG GAA GCA C-3'	191-209	79	Fam (blau)
	5'-CTA ACT AAA TGG CGA GCA TTG AG-3'			
D14S1002	5'-AGA TTT TGG ATG TAT CAG GC-3'	147-169	78	Fam (blau)
	5'-CAG AAG CAA TAG GAT GGA TG-3'			
D14S74	5'-CCT GTA CCA CTA CCT GAG TTG AGT-3'	293-317	79	Hex (gelb)
	5'-CTT TGG CTG CCC GAA A-3'			
D14S68	5'-GAG AGG TGG TTT TCA GTG GT-3'	317-343	91	Tet (grün)
	5'-TCA GGG ATA GTT GGT GGG TA-3'			
D14S280	5'-GGG CAA CAG AGC AGA TTT C-3'	236-254	68	Fam (blau)
	5'-GCA CCC AGG CCA GAA C-3'			
D14S65	5'-GCT CCA CCC CCT AAA GAT CC-3'	122-152	79	Tet (grün)
	5'-TAC ACC CTG TGG AAA GGC TG-3'			
D14S78	5'-GGC AGG GAT AAG TAT GTC CT-3'	213-237	66	Hex (gelb)
	5'-AAA GGT AAC ATC CAA GGG GT-3'			
D14S292	5'-CAC TAA GAG ATA AGC AGG GCT AC-3'	80-96	73	Fam (blau)
	5'-ATA AAA ATC AGT GTT AGG TGG TGT TC-3'			
D14S826	5'-TCT CTA AAG CTA CTA TAA CCC AG-3'	140-160	76	Tet (grün)
	5'-TGC TGT TGG ACT CAG GTA GCT A-3'			

Tabelle 8: Für die Durchsuchung der PAC-Bibliothek nach humangenomischen VHL Klonen werden die folgenden, Exon-spezifischen Primer verwendet:

VHL-Exon1 F:	5'-TGT AAA ACG ACG GCC AGT CCT CCG TTA CAA CAG CCT-3'
VHL-Exon1 R:	5'-CAG GAA ACA GCT ATG ACC TGG ATG TGT CCT GCC TCA-3'
VHL-Exon2 F:	5'-TGT AAA ACG ACG GCC AGT GTC TTG ATC TCC TGA CCT-3'
VHL-Exon2 R:	5'-CAG GAA ACA GCT ATG ACC TAC ATC ATC TCC ATT TTA-3'
VHL-Exon3 F:	5'-TGT AAA ACG ACG GCC AGT AGT AGT ACA GGT AGT TGT-3'
VHL-Exon3 R:	5'-CTG AGA ATG AGA CAC TTT GAA AC-3'

Vektorprimer:

PAC 2.808: 5'-CGA CGA TAG TCA TGC CCC-3'
PAC 18.628: 5'-TCT GCC GTT TCG ATC CTC-3'
T7: 5'-AAT ACG ACT CAC TAT AGG G-3'
SP6: 5'-ATT TAG GTG ACA CTA TAG -3'

Degenerierter Primer zur Genom-Amplifikation:

DOP Primer: 5'-CCG-ACT-CGA-GNN-NNN-NAT-GTG-G-3'

3.1.4 DNA Sonden

- M-FISH-Chromosomen-„Pools“
- *Whole Chromosome Painting Probes* Chromsomen 3 und 8 (Vysis, Downers Grove, IL, USA)
- *Chromosome Enumeration Probe* CEP3 (QBIOSYSTEMS-ALEXIS, GRÜNBERG)

3.1.5 DNA-Längenstandards

- Tamra (Applied BioSystems, Weiterstadt)
- 100 bp Leiter (INVITROGEN GmbH, Karlsruhe)
- 1 kb Leiter (INVITROGEN GmbH, Karlsruhe)
- λ-Phagen-DNA, *Hind*III-restringiert (INVITROGEN GmbH, Karlsruhe)

3.1.6 Enzyme und Bakterien

- Proteinase K (ROCHE Diagnostics, Mannheim)
- Pepsin Lyophilisat (ROCHE Diagnostics, Mannheim)
- Kollagenase (INVITROGEN GmbH, Karlsruhe)
- Trypsin/EDTA (Seromed, Berlin)
- Bacto-Trypsin-Pulver (Difco, Detroit MI, USA);
- Ampli Taq Gold DNA-Polymerase (APPLIED BIOSYSTEMS, Weiterstadt)
- Taq-Polymerase (ROCHE Diagnostics, Mannheim)
- Sämtliche Restriktionsendonukleasen (New England Biolabs, Frankfurt am Main)
- *E.coli* **DH5α** (Invitrogen)
- *E.coli* **TOP10F'** (Invitrogen)

3.1.7 Häufig verwendete Puffer und Kulturmedien

Alle verwendeten Glas- und Metallgeräte wurden vor Gebrauch für 4 Stunden bei 180 °C sterilisiert. Die verwendeten Lösungen wurden, wenn nicht anders beschrieben, mit demineralisiertem Wasser aus der Millipore-Anlage (Millipore, Wien, Österreich) angesetzt und bei 120 °C, 1,2 bar für 20 Minuten autoklaviert oder - bei hitzeinstabilen Substanzen -sterilfiltriert (0,2 µm).

LB-Medium	10g Trypton 5g Hefeextrakt 10g NaCl ad 1 l H ₂ O (pH 7.5)
Agarplatten	15g Agar-Agar ad 1 l LB-Medium
Ampicillin	Stammösung: 50mg/ml in H ₂ O Endkonzentration: 50-100 µg/ml
Kanamycin	Stammlösung: 50mg/ml in H ₂ O Endkonzentration: 50-100µg/ml
<i>Church</i> -Hybridisierungspuffer	1mM EDTA 0.5M NaHPO ₄ , pH 7,2 7 % SDS 1 % BSA
DNA-Denaturierungslösung	1.5M NaCl 0.5M NaOH
DNA-Neutralisierungslösung	0.5M Tris-HCl, pH 7.0 1,5 M NaCl
DNA-Probenpuffer (6x)	0.25 % Bromphenolblau 0.25 % Xylencyanol 40 % Sucrose
Puffer P1 (Resuspensions Puffer)	50 mM Tris/Cl, pH 2.0 10 mM EDTA 100 µg/ml RNase A
Puffer P2 (Lysierungspuffer)	200 mM NaOH 1% SDS
Puffer P3 (Neutralisierungspuffer)	3.0 M Kaliumacetat, pH 5.5
SSC-Puffer (20x)	3 M NaCl 0,3 M tri-Natriumcitrat (pH 7.0)
TE-Puffer:	10mM Tris-HCl, pH 7.5 1mM EDTA
10X TBE-Puffer	890 mM Tris-Base 890 mM Borsäure 25 mM EDTA, pH 8
50X TAE Puffer	2M Tris-Acetat 0.05M EDTA, pH 8.3

3.2 Geräte

Automatisierter Sequenzer ABI 377 XXL (APPLIED BIOSYSTEMS, Weiterstadt) mit Computer (APPLE MACINTOSH) und Drucker (HEWLETT PACKARD); Dokumentations-system E.A.S.Y.-Videosystems (Herolab, Wiesloch); Auflicht-Fluoreszenzmikroskope LEICA DM RBA und DM RXA (LEICA DEUTSCHLAND, Bensheim); Bildauswertungs-Systeme: Cytovision (Applied Imaging Corp., USA) und LEICA Bildauswertungsrechner; Hybridisierungsöfen (BIOMETRA, Göttingen); CO₂-Inkubator 37°C (HERAEUS, Hanau); Brutschrank 37°C (HERAEUS, Hanau); Wasserbad (GRANT, Cambridge, England); Schüttelwasserbad (KÖTTERMANN, Ütze-Henigsen); Sterilwerkbank ANTAIR BSK (M.HOFFMAN, Stade); Gekühlte Tischzentrifuge Biofuge fresco (HERAEUS, Hanau); Eppendorf-Tischzentrifuge (EPPENDORF, Hamburg); Kühlzentrifuge mit Schwenkbecherrotor (HERAEUS, Hanau); Phasenkontrastmikroskop Laborlux S (LEICA, Bensheim); UV-Durchleuchtungstisch (LABOTEC, Wiesbaden); Gefrierschrank -20°C (BOSCH, Wien); Kühlschranks 4°C (BOSCH, Wien); Tiefgefrierschrank -80°C (HERAEUS, Hanau); Photometer Pharmacia ULTROSPEC 2000 (PHARMACIA, Uppsala, Schweden) und Drucker (EPSON, Düsseldorf); Kühlwasserbad (MGW Lauda, Lauda-Königshofen), Heizblock temperierbar 20-96°C (EPPENDORF, Hamburg); Mikrowellengerät (BOSCH, Wien); Maxi-, Midi- und Mini-Gel-Kammer mit Gelträger und passenden Gelkämmen (peqlab, Erlangen); Stabilisierte Gleichstromquelle (peqlab, Erlangen); pH-Meter (KNICK, Berlin); Laborwaage LC2201 (SARTORIUS, Göttingen); Labor-Feinwaage BA110 (SARTORIUS, Göttingen); 36- Spur Gelkamm Squaretooth GENESCAN (APPLIED BIOSYSTEMS, Weiterstadt); Magnetrührer (IKA LABORTECHNIK, Stauffen i. Br.); Vortex (IKA LABORTECHNIK, Stauffen i. Br.) Hochleistungs-Kühlzentrifuge (KENDRO, Langenselbold); Szintillationszähler WALLAC 1410 (PERKIN ELMER WALLAC, Freiburg); Hybridisierungsöfen Techne Hybridiser HB-2 mit passenden Röhren (THERMO-DUX, Wertheim), ChefMapper Pulsfeld-Gelelektrophorese-Kammer/-Steuergerät mit Modell 1000 Mini-Chiller (BIORAD, München).

3.3 Probenentnahmen und pathologische Begutachtung

Diese Arbeit befasst sich mit den genetischen Veränderungen von Nierenzellkarzinomen. Es handelt sich bei allen untersuchten Nierengeweben um sporadische Nierentumoren, die in der Urologischen Klinik (Leiter: Prof. Dr. med. Thüroff) des Universitätsklinikums der Johannes-Gutenberg Universität in Mainz im Zuge eines operativen Eingriffs entnommen wurden. Die pathologische Begutachtung der Tumoren erfolgte im Institut für Pathologie der Universitätsklinik in Mainz (Leiter: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Kirkpatrick). Die zustimmende Stellungnahme der lokalen Ethikkommission zum Projekt Nierenmalignome liegt vor. Vor jeder Entnahme und wissenschaftlichen Nutzung des Gewebes wurde vom Patient die schriftliche Zustimmung eingeholt. Der Patient wurde zudem durch ein Informationsblatt über die weitere Verwendung des Gewebes in Kenntnis gesetzt. Gewebe von nicht zustimmenden Patienten wurde nicht verwendet.

3.4 Zellbiologische Methoden

3.4.1.1 Aufbereitung epithelialer Nierenzellen

Exakte Aussagen über mögliche Korrelationen molekular-(zyto)genetischer und pathologischer Befunde sind nur dann möglich, wenn das zur genetischen Untersuchung verwendete pathologische Gewebestück identisch ist mit dem vom Pathologen begutachteten Gewebe. Das Gewebe wird schnellstmöglichst nach der Entnahme verarbeitet, da die Vitalität der Zellen schnell abnimmt. Während Probenentnahme wird nekrotisches Gewebe und Zelldebris entfernt. Separat entnommenes Tumor- und Normalgewebe (etwa 0.5-1cm³ große Tumor- und Normalgewebestücke) werden möglichst steril in 10ml Transportmedium überführt.

3.4.2 Kultivierung

Alle beschriebenen Zellkulturarbeiten werden unter einer sterilen Werkbank durchgeführt, um Kontaminationen zu vermeiden.

Die Kultivierung der Zellen erfolgt in einem Begasungsbrutschrank bei 37°C unter einer 5% CO₂-Atmosphäre. Es werden Gewebekulturflaschen mit einer Grundfläche von 25 cm² (T25) bzw. 75 cm² (T75) eingesetzt. Das Gewebe wird durch Dekantieren vom Transportmedium getrennt und mit Waschmedium kurz gespült. Das Gewebestück wird danach zunächst in eine Petrischale überführt. Jedes Gewebe wird daraufhin in mindestens drei etwa gleich große Teile zertrennt. Gefäßanteile, Bindegewebe und nekrotisierende Gewebeanteile werden, soweit makroskopisch erkennbar, von der weiteren Prozessierung ausgeschlossen. Zwei Gewebestücke jeder Probe werden stufenweise bis hin zur Lagerung bei -80°C niedergefroren. Die nicht kryokonservierte Gewebeprobe wird zur Anlage von Zellkulturen aufbereitet.

Kulturmedium

RPMI 1640 (Biochrom KG, Berlin)	500ml
Fötale Kälberserum (FKS) 20% (v/v) (Greiner, Frickenhausen)	100ml
Penicillin / Streptomycin [10.000 U ml ⁻¹ / 10000 IE ml ⁻¹] (Biochrom KG, Berlin) 1% (v/v)	6ml
L-Glutamin (200 mM) (Biochrom KG, Berlin) 1% (v/v)	6ml

Transportmedium

RPMI 1640 (Biochrom, Berlin)	500ml
FKS (Greiner, Frickenhausen) 10% (v/v)	50ml
Penicillin / Streptomycin (Biochrom KG, Berlin) 1% (v/v)	6ml
Gentamycin-Sulfat (10mg/ml) (SIGMA, Deisenhofen) 1% (v/v)	6ml
Fungizone (250µg/ml) (INVITROGEN GmbH, Karlsruhe) 2% (v/v)	12ml

Waschmedium

Hanks balanced salt solution (HBSS)	500ml
Penicillin / Streptomycin (Biochrom KG, Berlin) 1.2% (v/v)	6ml

Kollagenaselösung:

Stammlösung: 2000 U/ml RPMI

- 37°C, Inkubation unter leichtem Schütteln für 2h
- sterilfiltrieren (Filter 0.2 µm Porengröße)
- Portionierung in 2ml Reaktionsgefäßen
- Lagerung bei -20°C

Hierzu wird das gewaschene Gewebestück mechanisch mit Hilfe von Einmalskalpellen solange zerkleinert, bis keine größeren Fragmente mehr vorhanden sind. Nach dem mechanischen Aufschluß erfolgt die enzymatische Zerkleinerung durch Einwirken von Kollagenase. Kollagenase ist eine spezifische Proteinase, die die Kollagenverbindungen zwischen den Zellen auflöst und so eine Einzelzellsuspension erzeugt. Das mechanisch zerkleinerte Gewebe wird in einer Kollagenase-Endkonzentration von 200U/ml bei 37°C entweder in einem 15 ml Röhrchen für 3-4 Stunden auf einem Taumelroller, oder über Nacht in einer Kulturflasche im CO₂-Inkubator inkubiert. Nach der Kollagenaseeinwirkung wird die Zellsuspension in ein 15 ml Röhrchen überführt und für 5 Minuten bei 1400 UpM (400g) zentrifugiert. Das so gewonnene Zellpellet wird in 10ml Kulturmedium aufgenommen. 1/10 Volumen der Einzelzellsuspension (1ml) werden mit 10% DMSO und zusätzlichen 10% FKS niedergefroren, der Rest wird auf zwei bis vier T75-Zellkulturflaschen aufgeteilt und mit Medium auf 10ml aufgefüllt.

Die ausgesäten Zellen verbleiben nun für etwa 24 Stunden in einem CO₂-Brutschrank, damit sich die Zellen an die Kulturflaschenböden anheften können. Am darauffolgenden Tag erfolgt ein Mediumwechsel mit Kulturmedium. Dabei werden abgestorbene, nicht adhärenz Zellen entfernt, da nur vitale Zellen die Fähigkeit der Adhärenz zeigen.

Da Gewebe nicht immer völlig keimfrei entnommen werden kann kommt es in vereinzelt Fällen nach einigen Tagen zu einer Pilz- oder Bakterienkontamination. Zur Vermeidung der Bakterienkontamination wird das Kulturmedium schon vorsorglich mit den antibiotisch wirkenden Substanzen Penicillin und Streptomycin versetzt. Treten trotzdem Bakterienverunreinigungen oder Verpilzungen auf, so hilft i.d.R. auch der Einsatz weiterer Antibiotika nicht weiter. Die Kultur wird daher bei Anzeichen einer Verkeimung verworfen.

3.4.2.1 Mediumwechsel

Der Mediumwechsel unterscheidet sich bei Monolayer- und Suspensionskulturen. Bei Monolayerkulturen, wie z.B. Nierenzellkarzinomzellen, erfolgt ein Mediumwechsel nach pH-Umschlag des Mediums von rot zu gelb (pH 6,0), in der Regel zweimal wöchentlich. Das alte Medium wird komplett abgesaugt, zu jeder Kultur werden 10 ml frisches Medium gegeben. Dabei ist es wichtig, Kontaminationen zu vermeiden.

Bei Suspensionskulturen wie z.B. Blutkulturen, die kontinuierlich ohne feste Substratunterlage wachsen, ist es in der Regel nicht nötig, das Medium auszutauschen. Falls das alte Medium verbraucht ist (Farbwechsel des Mediums) wird neues hinzugegeben oder aber die Passage wird sofort subkultiviert. Sollte ein Mediumwechsel doch nötig sein, läßt man die Zellen sedimentieren und ersetzt nur einen Teil des Mediums.

3.4.2.2 Subkultivierung

Durchgeführt nach (Lindl und Bauer, 1987).

Auch bei der Subkultivierung unterscheiden sich Suspensions- und Monolayerkulturen. Suspensionskulturen werden zur Hälfte in ein neues Kulturgefäß überführt und mit neuem Medium auf 10ml aufgefüllt. Auf diese Weise erfolgt eine Zellzahlverminderung um die Hälfte.

Ist die gesamte Kulturfläche der Flasche von Monolayerzellen bedeckt, so wachsen in der Regel die adherenten Zellen nicht mehr weiter und müssen passagiert werden. Dazu werden die Zellen in Suspension gebracht und dann nach Verdünnung in ein neues Kulturgefäß überführt. Die am weitesten verbreitete Methode, adhärenente Zellen zu subkultivieren, ist der Gebrauch eines Trypsin/EDTA Gemischs. Trypsin und EDTA greifen die Proteine der Zellmembran an und verhindern damit die Anheftung an den Boden des Kulturgefäßes bzw. führen zu einem Ablösen der Zellen. Eine zu hohe Trypsinkonzentration kann jedoch zu irreversiblen Schädigungen der Zellmembran führen. Da die Wirkung des Trypsins durch Medium stark beeinträchtigt wird, werden die Zellen entweder vor der Subkultivierung mit 1 x PBS-Puffer gespült oder sehr gründlich vom Medium befreit.

Zu den Zellen werden 3 ml Trypsin/EDTA-Lösung (0.05% Trypsin; 0.02% EDTA) gegeben. Unter dem Phasenkontrastmikroskop kann beobachtet werden, wie sich bei leichtem Klopfen an die Kulturschale die Zellen ablösen. Nach Ablösen der Zellen vom Boden des Kulturgefäßes, spätestens aber nach 5 Minuten, wird die Wirkung des Trypsins durch Zugabe von einigen Millilitern Medium gestoppt. Die restlichen Zellen werden durch Spülen mit Medium gelöst und in ein 15 ml Röhrchen überführt. Nach Zentrifugation für fünf Minuten bei 1500 UpM (400g) werden die Zellen in 10ml Medium aufgenommen und auf zwei Zellkulturflaschen aufgeteilt. Beide Flaschen werden anschließend mit Medium aufgefüllt.

3.4.2.3 Kryokonservierung

Vitale Zellen können in flüssigem Stickstoff bei -196°C über längere Zeit aufbewahrt werden. Als Schutzmedium wird mit 10% DMSO (Dimethylsulfoxid) versetztes RPMI-Medium verwendet. DMSO verhindert die zu einer Zerstörung führende Ausbildung von Eiskristallen in den Zellen. Da es allerdings auch zytotoxisch wirkt, müssen die Zellen möglichst schnell niedergefroren, bzw. aufgetaut werden.

Die Zellen werden, falls es sich um Monolayerkulturen handelt, trypsinisiert und für 5 Minuten bei 1500 UpM (400g) abzentrifugiert. Anschließend werden sie in einem Milliliter Einfriermedium aufgenommen und in Kryoröhrchen überführt.

Zum schnellen Einfrieren mit gleichmäßiger Temperaturabsenkung werden Einfrierboxen verwendet, die mit Isopropanol gefüllt sind. Sie sind so konstruiert, daß sie bei Lagerung bei -80°C 1°C pro Minute abkühlen. Nach 12 bis 24 bei -80°C werden die Zellen in flüssigem Stickstoff kryokonserviert.

3.4.2.4 Auftauen

Das Auftauen der Zellen sollte möglichst zügig erfolgen. Hierzu wird das aufzutauende Kryoröhrchen aus dem Stickstoff entnommen und sofort in ein 37°C Wasserbad überführt. Sobald das letzte Eis verschwunden ist (kleine Eisstücke sollten noch erkennbar sein), werden die Zellen in ein schon mit angewärmtem Medium gefülltes 15ml Röhrchen gegeben. Nach einmaligem Waschen mit 10ml HBSS werden die aufgetauten Zellen in eine Kulturflasche ausgesät. Am nächsten Tag erfolgt ein kompletter Mediumwechsel.

3.4.3 Optische Wachstumskurve einer Gewebekultur

Mit Hilfe der optischen Wachstumskurve einer Gewebekultur kann die Dauer der logarithmischen Wachstumsphase abgelesen werden, in der die mitotischen Zellen zur Chromosomendarstellung gestoppt werden sollen. Zur Erstellung dieser Kurve wird zunächst das Medium einer Kultur frisch gewechselt. Im Abstand von einer Stunde werden dann in einem fest definiertem Ausschnitt von etwa 1 x 1 cm die Metaphasezellen gezählt. Zellen, die sich in der Metaphase befinden, sind an ihrer abgekugelten Form zu erkennen.

3.4.4 Lymphozytenkulturen

Für die Chromosomendarstellung wird mit dem Gerinnungshemmer Heparin versetztes, peripheres Blut verwendet. Lymphozyten zeichnen sich *in vitro* durch eine begrenzte Lebensdauer und Proliferationsrate aus. Zellteilungen finden ohne zusätzliche Stimulation nur in geringer Zahl statt. Die Stimulation geschieht üblicherweise mit dem aus der Bohne *Phaseolus vulgaris* gewonnenen Phytohämagglutinin (PHA) und/oder dem aus *Phytolacca americana* isolierten Pokeweed Mitogen (PWM). Diese Polysaccharide, die der Stoffgruppe der Lektine angehören, stimulieren unspezifisch T-Lymphozyten (PHA) und B-Lymphozyten (PWM) zur Proliferation. Die Zellkulturarbeiten werden unter einer sterilen Werkbank durchgeführt, um Kontaminationen zu vermeiden. Zu 20 ml des Kulturmediums werden die Mitogene Phytohämagglutinin (Endkonz.: 6 µg/ml) und (Endkonz.: 1.3 µg/ml) gegeben.

Kulturmedium

RPMI 1640 (Biochrom KG, Berlin)	500ml
Fötale Kälberserum (FKS) 20% (v/v) (Greiner, Frickenhausen)	100ml
Penicillin / Streptomycin [10.000 U ml ⁻¹ / 10000 IE ml ⁻¹] (Biochrom KG, Berlin) 1% (v/v)	6ml
L-Glutamin (200 mM) (Biochrom KG, Berlin) 1% (v/v)	6ml
Liquemin®N, Wirkstoff: Natrium-Heparin [5000 IE] (ROCHE, Grenzach-Whylen, CH)	
Phytohämagglutinin-L Stammlösung [0,24mg / ml] (Biochrom KG, Berlin)	
Pokeweed Mitogen Stammlösung [80µg / ml] (Biochrom KG, Berlin)	

Durch Venenpunktion wird 10 ml Blut entnommen und mit 5000 IE des Antikoagulanzen Liquemin® N versetzt. Jeweils 20 ml Nährmedium in T75 Kulturflaschen werden mit 5ml frisch entnommenem, heparinisiertem Vollblut versetzt. Die Kultur wird 72 Stunden bei 37°C im CO₂-Inkubator gehalten. Als Sterilkontrolle dient vollständig mit Zusätzen versehenes Nährmedium ohne Blut.

3.5 Zytogenetische Methoden

3.5.1 Chromosomen-Präparation aus Blutkulturen

Die Präparation der Chromosomen erfolgte nach (Verma und Babu, 1989)

Blutzellen aus 72-Stunden Kultur Colcemid Karyomax® [10 µg/ml] (INVITROGEN GmbH, Karlsruhe) Hypotone Lösung (0.2 % KCl / 0.2% (w/v) tri-Natriumcitrat) FIXATIV gekühlt auf -25°C (3 Volumenteile Methanol:1 Volumenteil Eisessig)
--

Die Lymphozyten-Kultur wird nach 72 Stunden durch die Verabreichung von Colcemid abgebrochen (Endkonzentration 0.02µg/ml). Nach 20-30 minütiger Einwirkzeit wird die Kultur von der Kulturschale in 50ml Spitzboden-Zentrifugenröhrchen überführt. Zentrifugation der Kultur (1500 UpM - 5 Min.; 400g) pelletiert die zellulären Bestandteile. Der Überstand (colcemidhaltiges Medium) wird abgenommen und gemäß den Vorschriften entsorgt. Die Resuspension des Zellpellets erfolgt in 50 ml auf 37°C temperierter, hypotoner Lösung. Die Zellen verbleiben für 20-30 Minuten bei 37°C in der hypotonen Lösung. Nach anschließender Zentrifugation (1500 UpM - 5 Min.; 400g) wird der klare, durch Plasmolyse der Erythrozyten rot gefärbte Überstand bis auf einen kleinen Rest verworfen. Zum resuspendierten Pellet aus Leukozyten werden tropfenweise je 30 ml eiskaltes Fixativ zugeben und gleichzeitig durch leichtes Schütteln gemischt. Erneut schließt sich ein Zentrifugationsschritt an (1500 UpM - 5 Min.; 400g) der, in Abhängigkeit der Reinheit des Pellets, bis zu dreifach wiederholt werden muss. Das scharf von Überstand getrennte Pellet wird in wenigen Millilitern Fixativ aufgenommen. Die Zellsuspension wird bei -20°C bis zum Anfertigen der Tropfpräparate aufbewahrt.

Das Auftropfen der Kernpräparate erfolgt auf in Methanol-gereinigte, entfettete Objektträger in feuchter Atmosphäre neben einem 50°C Wasserbad. Es werden drei Tropfen Zellsuspension pro Objektträger aufgetropft. Die Trocknung der Präparate erfolgt am Wasserbad bei Raumtemperatur. Im Phasenkontrastmikroskop sollte sich das Präparat metaphasenreich, kernplasmafrei und dunkel kontrastiert darstellen. Die Chromosomen der Spreitung sollten sich nach Möglichkeit nicht überlagern. Bei Eignung der Präparate für die Hybridisierung wird die Position der Chromosomenspreitung auf der Rückseite der Objektträger mit einem Diamantschreiber markiert. Die Präparate können dann bei 4°C in 70% Ethanol für mehrere Monate aufbewahrt werden.

3.5.2 Chromosomenaufarbeitung aus Gewebekulturen

Die Chromosomendarstellung erfordert möglichst viele Zellen, die sich in Teilung befinden. Hierzu wird einen Tag oder einige Stunden vor der Chromosomenaufarbeitung das Medium gewechselt, um die Zellteilung anzuregen.

- | |
|--|
| <ul style="list-style-type: none">• Zellen in Gewebe Kultur• Colcemid Karyomax® [10 µg/ml] (INVITROGEN GmbH, Karlsruhe)• <u>Hypotone Lösung</u><ul style="list-style-type: none">0.02M HEPES0.04M KClpH. 7.0• FIXATIV gekühlt auf -25°C (3 Volumenteile Methanol:1 Volumenteil Eisessig) |
|--|

Die Zellteilung wird in allen Fällen durch Zugabe des Spindelgiftes Colcemid gestoppt. Hierzu wird Colcemid für 3-4 Stunden in einer Konzentration von 0,02 µg/ml Medium zu den Zellen gegeben. Im Phasenkontrastmikroskop kann beobachtet werden, wie sich die Zellen in der mitotischen Phase abkugeln. Befinden sich genug Zellen in der Mitose, werden sie durch Zugabe von Trypsin/EDTA abgelöst und zentrifugiert (1500 UpM, 5 Min, 400g).

Die Zellen werden im Anschluß einer hypotone Behandlung zugeführt. Die Zugabe von 10 ml hypotoner Lösung für 60-90 Minuten bewirkt eine Quellen der Zellen in Folge osmotischen Druckes. Beim späteren Auftropfen auf einen Objektträger zerplatzt die Zellmembran. Eine zu lange Einwirkungszeit bewirkt ein vorzeitiges Zerplatzen der Zellmembran und die Metaphasen sind durch weite Streuung der Chromosomen nur schwer zu analysieren. Eine zu kurze hypotone Behandlung behindert das Platzen der Zellmembranen und die Chromosomen können nicht dargestellt werden.

Nach der hypotonen Behandlung werden die Zellen erneut abzentrifugiert (800 UpM, 132g; 8 Min) und zwei bis dreimal mit Fixativ (3:1 Mischung aus eiskaltem Methanol und Eisessig) fixiert. Unter vorsichtigem Schütteln wird auf dem Rüttler das Fixativ tropfenweise zu den Zellen gegeben, damit es zu einer möglichst gleichmäßigen, schnellen Verteilung kommt. Nach der letzten Fixierung verbleibt etwa 1 ml Fixativ im Röhrchen. Die Zellen werden gut gemischt und mit einer Pasteurpipette aus einer Höhe von 20-30 cm auf entfettete, gut gewaschene Objektträger getropft. Durch den Aufprall platzen die Zellen auf und die Chromosomen werden freigesetzt. Im Phasenkontrastmikroskop wird nach Fertigstellung des ersten Präparates überprüft, ob

Konzentration und Auftropfhöhe stimmen, bevor weitere Objektträger hergestellt werden. Die Metaphasespreitungen können bei 4 °C in 70% Ethanol mehrere Monate gelagert werden oder für die zytogenetische Analyse verwendet werden.

3.5.3 GTG-Bandenfärbung

Zur klassischen zytogenetischen Analyse werden Metaphasen aus peripherem Blut hergestellt. GTG-Technik (G-Banden mit Trypsin und Giemsa) gebändert (Seabright, 1971). Die G-Bandenfärbung beruht auf einer Vorbehandlung der Chromosomen mit dem proteolytischen Enzym Trypsin, das vermutlich die Proteine des GC-reichen Euchromatins stärker angreift als die des AT reichen Heterochromatins. Daraufhin werden die Proteine des Heterochromatins stärker gefärbt, so daß ein Bandenmuster entsteht (Traut, 2000). Für die G-Bänderung u.a. Bandenmuster wurde eine internationale Standard-Chromosomen-Nomenklatur festgelegt (1995).

- **Physiologische NaCl Lösung** (0,9% w/v)
- **Sørensen-Phosphat-Puffer, pH 6,8:**
0,067 M KH_2PO_4 (9,07g/l)-Lösung
0,067 M Na_2HPO_4 (11,87 g/l)-Lösung
im Verhältnis 1:1 gemischt
- **Bacto-Trypsin-Stammlösung:**
Bacto-Trypsin-Pulver, gelöst in 10 ml sterilem Aqua dest.,
in 2ml Aliquots bei -20 °C lagern
- **Bacto-Trypsin-Arbeitslösung:**
2 ml Bacto-Trypsin-Stammlösung + 98 ml 0,9%ige NaCl-Lösung
- **Giemsa-Lösung:**
8 ml Giemsa
+92 ml Sørensen-Puffer

Für die G-Bänderung werden Präparate durch Auftropfen aus den in Methanol / Eisessig fixierten Zellen (vgl. Kap.3.5.1) hergestellt und eine Woche lang bei Raumtemperatur gealtert oder über Nacht bei 65 °C inkubiert. Die Metaphase-Präparate werden 30 – 60 sec mit Bacto-Trypsin-Lösung behandelt, kurz in Sørensen-Puffer gespült, 10 min in der Giemsa-Lösung angefärbt und schließlich in Aqua dest. gespült. Nach dem Lufttrocknen werden die gefärbten Präparate mit Entellan überschichtet und mit Deckgläsern 24x50 mm eingedeckt. Die G-Banden-Analyse wurde an einem Leica DMRBE-Mikroskop im Durchlichtmodus durchgeführt. Für die Bildaufnahme und Karyotypisierung der Metaphasen wurden eine KOHU-Graustufen CCD („charge coupled device“)-Kamera und die Bildauswertungs-Software Cytovision Version 3.1 der Firma Applied Imaging (Santa Clara, CA), auf einem Dell Power Edge SP 590-2-Rechner, eingesetzt. Von den Präparaten wurden jeweils 10 bis 15 Metaphasen ausgewertet, die in der Regel alle mit Hilfe der Cytovision Software vollständig karyotypisiert wurden.

3.6 Molekulargenetische Methoden

3.6.1 Mikrosatellitenanalyse

3.6.1.1 Polyacrylamid (PAA) Gelherstellung

Die Auftrennung der PCR Produkte erfolgt auf einem 4.25 Prozent Polyacrylamidgel. Zwei Glasplatten werden vor dem Gießen des Gels mit NaOH, Millipore- H_2O und Isopropanol sorgfältig gesäubert. Die entgaste und filtrierte Gellösung wird vor Zugabe von TEMED und APS in ein frisches Becherglas überführt und 350µl APS und 15µl TEMED hinzupipettiert. Das Gel wird nun gegossen. Bei den hier verwendeten Genescangeln wird ein Rechteckkamm eingesetzt. Nach 1 bis 2 Stunden Polymerisierungszeit entfernt man den Kamm vorsichtig und setzt das Gel in das Sequenziergerät ein. Polyacrylamidgele sollten frisch verwendet werden, da die Gefahr des Austrocknens besteht. Falls das Gel länger als 3h nicht weiterbearbeitet werden kann, sollten die Ränder mit in 1xTBE getränkten Tüchern abgedeckt werden, um der Austrocknung entgegenzuwirken.

Acrylamidgellösung: (4.25% Acrylamid, 7M Harnstoff, 1X TBE)	
Harnstoff	21 g
Autokl. M-H ₂ O	21 ml
Acrylamid/Bisacrylamidlösung	7,1 ml
Deionisierungskügelchen	ca.2g
10xTBE	6ml
Ammoniumperoxidsulfat (APS) , 10%	350µl
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	15µl

3.6.1.2 Probenvorbereitung und Gellauf

Als Puffer wird 1xTBE verwendet (ca.1.4 l), der in die Pufferkammern eingefüllt wird. Um die Geltaschen für den Probenauftrag besser sichtbar zu machen, werden ca. 80 µl Blaumarker über die Geltaschen pipettiert. Es folgt ein Vorlauf, um die gewünschte Heizplattentemperatur von 51 °C zu erreichen. In der Zwischenzeit werden die Proben 2 min im sprudelnden Wasserbad denaturiert, danach auf Eis gestellt. Außerdem erfolgt die Eingabe der Proben-Daten in den Computer (*Samplesheet*). Ist die Heizplattentemperatur erreicht, können die Proben aufgetragen werden. Der Sequenzer wird nun gestartet. Die Laufzeit eines Genescanges beträgt ca. 4h.

Die Proben werden wie folgt vorbereitet:	PCR-Produkt	2 µl
	deionisiertes Formamid	1.8µl
	Größenstandard (TAMRA 350)	0.6µl
	Blaumarker	0.6µl

3.6.1.3 Optimierung der PCR Bedingungen

Die PCR Bedingungen wurden für jedes Primer-Paar optimiert. Dabei wurden folgende Parameter verändert: MgCl₂-Konzentration und pH-Wert durch den Einsatz verschiedener PCR-Puffer, die Annealing-Temperatur und die Länge des einleitenden Denaturierungsschritts. Alle PCRs zur Amplifikation der Mikrosatellitenfragmente wurden in einem Reaktionsvolumen von 25µl nach folgendem Ansatz durchgeführt: Für alle im Rahmen der MSA durchgeführten PCR-Amplifikationen wurden das PCR-Gerät UNO II verwendet. Die Amplifikation aller Mikrosatellitenmarker erfolgte mit einem der folgenden PCR-Programme :

Tabelle 9: Für die Optimierung verwendete PCR-Puffer.

PCR Puffer	[MgCl ₂] mM 1X	pH	Konz. des Stocks
A	1.5	8.5	5x
D	3.5	8.5	5x
J	2.0	9.5	5x
F	2.0	9.0	5x
M	1.5	10	5x
PE	1.5	8.3	10x

Tabelle 10: PCR-Ansatz für die Amplifikation der Mikrosatelliten

Komponente	Volumen [µl]	Konzentration d.Stammlösung	Endkonzentration
10X Reaktionspuffer PE	2.5	[Mg ²⁺]=1.5 mM	[Mg ²⁺]=0.15 mM
dNTPs – Mix	2.5	2.5mM/Base	0.25mM
Primer	2	5 pmol/µl	0.4 µM
DNA template	2	100 ng/µl	8 ng/µl
PCR-Wasser	15.8	-	-
Taq-Polymerase	0.2	5 U/µl	1U
Gesamtvolumen	25		

Tabelle 11: PCR-Programm „MSA“ (links) und Programm „Gold Taq“ (rechts)

95°C	10 Minuten		95°C	5 Minuten	
95°C	30 Sekunden	35 Zyklen	94°C	15 Sekunden	10 Zyklen
50°C	20 Sekunden		55°C	15 Sekunden	
72°C	20 Sekunden		72°C	30 Sekunden	
72°C	4 Minuten		89°C	15 Sekunden	35 Zyklen
4°C	∞		55°C	15 Sekunden	
			72°C	30 Sekunden	
			72°C	10 Minuten	
			4°C	∞	

3.6.1.4 Auswertung

Die PCR-Produkte werden elektrophoretisch auf einem 4.25%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und durch Laserfluoreszenz mit dem automatisierten Sequenziergerät detektiert. Die Analyse der Daten erfolgt mit der *Genescan Analysis Software*. PCR-Produkte aus korrespondierendem normalem Nierenepithel und Tumorgewebe werden grundsätzlich auf dem gleichen Gel aufgetrennt. Bis zu 7 verschiedene Mikrosatellitenmarker werden auf der gleichen Spur im Gel aufgetragen. Die Größenberechnung (in bp) der amplifizierten Mikrosatellitenallele erfolgt automatisch mit Hilfe des internen Größenstandards Tamra. Durch die Berechnung eines Imbalancefaktors wird jedes Mikrosatellitenamplifikat auf den Verlust der Heterozygotie (LOH) im Tumorgewebe überprüft. Da Tumorgewebe meist mit Normalgewebe und/oder infiltrierenden Immunzellen verunreinigt sind, wird die betreffende Allelbande i.d.R. nur abgeschwächt und verschwindet nicht vollständig. Daher wird das Verhältnis der Allelintensitäten im Normalgewebe relativ zum Tumorgewebe nach folgender Formel berechnet:

$$AR = (T1/T2) / (N1/N2)$$

mit: AR: Allelic Ratio (Imbalancefaktor)
T1: Allelintensität des kürzeren Allels der Tumorprobe
T2: Allelintensität des längeren Allels der Tumorprobe
N1: Allelintensität des kürzeren Allels der Normalgewebeprobe
N2: Allelintensität des längeren Allels der Normalgewebeprobe.

AR=1 bedeutet gleiches Verhältnis der Allelintensitäten in Tumor- und Normalgewebe. Bei Abweichen der AR Werte von 1, läßt dies auf den Gewinn oder Verlust chromosomalen Materials schließen.

In Übereinstimmung mit entsprechenden Literaturstellen wurde bei $AR \geq 1.5$ der Verlust eines der beiden Allele im Tumorgewebe (LOH) postuliert. Bei einem Imbalancefaktor zwischen 1.3 und 1.5 wurden PCR und Genescanlauf für das betreffende Pärchen wiederholt. Sämtliche Allelintensitäten wurden einer von der *Genescan Analysis Software* generierten Tabelle entnommen.

3.6.1.5 Korrelation der MSA und CGH Ergebnisse mit klinischen und histopathologischen Daten

Alle klinischen und histopathologischen Daten entstammen der Nierentumordatenbank der Arbeitsgruppe Zabel. Für jede untersuchte Tumor-Probe liegen hier eine Vielzahl Daten über den Grad und das Stadium des Tumors, den Tabakkonsum und das Geschlecht der Patienten vor. Die Ergebnisse der Mikrosatellitenanalyse und der CGH Analysen wurden mit diesen Daten korreliert. Mit Hilfe des Wilcoxon Tests wurden die Unterschiede zwischen den Tumorkollektiven mit und ohne LOH auf Chromosomenarm 14q bei den Parametern Tumorgrad, Tumorstadium und Tumorgroße auf ihre statistische Signifikanz untersucht. Alle Berechnungen wurden durchgeführt mit dem Programm GraphPad Prism 2.01 (GraphPad Software). Der Signifikanzschwellenwert wurde bei $p = 0.05$ festgelegt.

Die Korrelationen der CGH Analysen mit Stadium und Grad erfolgte mit dem Fishers Exact Test. Die Bestimmung der Überlebenswahrscheinlichkeiten der Patientenkollektive erfolgte nach der

Kaplan-Meier Methode (Kaplan und Meier, 1999). Der Bestimmung der Überlebenswahrscheinlichkeit nach Kaplan-Meier liegt folgendes Prinzip zu Grunde: Sind die Überlebenszeiten für n Individuen bekannt und r dieser Patienten überleben eine bestimmte Zeit t , dann ist die Wahrscheinlichkeit, länger als t zu überleben r/n .

$$P(T>t) = r/n$$

P	Wahrscheinlichkeit
T	Überlebenszeit
n	Gesamtzahl der Patienten
r	Anzahl der Patienten, die zum Zeitpunkt t noch leben

3.6.2 Suche nach *VHL* enthaltenden Klonen

Zur Gewinnung eines bakteriellen Klons, der das *VHL*-Gen beinhaltet, wird eine humangenomische PAC-Bibliothek (Hersteller: Pieter J. deJong), die dem Labor bereits zur Verfügung steht, durchsucht. Die Bibliothek besteht aus gesamtgenomischer DNA, welche aus männlichem Blut isoliert wurde. Die DNA wurde mechanisch gesichert und innerhalb der *Bam*H1-Schnittstellen von pCYPAC2-Vektoren ligiert. Insgesamt umfaßt sie ca. 115.000 Einzelklone, deren durchschnittliche Integrallänge 110kb beträgt. Die Redundanz für das haploide Genom liegt somit statistisch bei drei. Zur einfachen und systematischen Analyse der Bank ist diese nach einem bestimmten Schema hierarchisch angeordnet und besteht aus 36 sogenannten „superpools“. Jeder dieser „superpools“ setzt sich aus der bakteriellen DNA mehrerer vereinter „platepools“ zusammen. Ein „platepool“ beinhaltet die Plasmid-DNA aller Einzelklone einer 384-Lochplatte. Dabei liegt die bakterielle DNA sowohl der „superpools“ als auch der „platepools“ in isolierter Form vor, während die Dauerkulturen der Platten als vitale Bakteriensuspensionen vorliegen. Mittels PCR-Untersuchungen werden die „superpools“ auf das Vorhandensein der drei *VHL*-Exons überprüft. Die positiv getesteten ergeben die positiven „platepools“. Die ermittelten „platepools“ werden ebenfalls durch PCR-Analysen untersucht. Um auf den untersuchten Platten *VHL*-enthaltende Einzelklone aufzufinden, werden zwei unterschiedliche Methoden angewendet: Zum Einen die Koloniefilterhybridisierung und zum Anderen eine systematische, auf einem „pooling“-Schema beruhende PCR-Analyse. Dazu werden jeweils die Einzelklone einer Reihe (A-P) und die einer Spalte (1-24) vereint und als Matrice in die PCR-Reaktion eingesetzt. Die Kreuzungspunkte der positiv getesteten Reihen-„pools“ mit ebensolchen Spalten-„pools“ zeigen die Position der positiven Einzelklone an.

Tabelle 12: Schema der Bankanordnung. Die eingeklammerten Nummern bezeichnen die 36 „superpools“. *R* bezeichnet die Reihen, *S* die Spalten. Die Zahlen 1-321 innerhalb des fettgedruckten Rahmens stehen für die „platepools“ des jeweiligen Kreuzungspunktes.

	S1 (17)	S2 (18)	S3 (19)	S4 (20)	S5 (21)	S6 (22)	S7 (23)	S8 (24)	S9 (25)	S10 (26)	S11 (27)	S12 (28)	S13 (29)	S14 (30)	S15 (31)	S16 (32)	S17 (33)	S18 (34)	S19 (35)	S20 (36)
R1 (1)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
R2 (2)	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
R3 (3)	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
R4 (4)	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
R5 (5)	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
R6 (6)	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120
R7 (7)	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140
R8 (8)	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	0	0	0	158	159	160
R9 (9)	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180
R1 (10)	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200
R11 (11)	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220
R12 (12)	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240
R13 (13)	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255	256	257	258	259	260
R14 (14)	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271	272	273	274	275	276	277	278	279	280
R15 (15)	281	282	283	0	0	286	287	288	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300
R16 (16)	301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	0	312	313	314	315	316	317	318	319	320 321

Tabelle 13: Zusammensetzung der PCR-Ansätze (50 µl Volumen) für die *VHL*-Exons 1-3 in [µl].

	Exon 1	Exon 2	Exon 3
Puffer [10x]	5	5	5
dNTPs	2	2	2
DMSO	2,5	1	-
Primer (F) [10 µM]	1	1	1
Primer (R) [10 µM]	1	1	1
Taq-Polymerase	2	2	2
Aqua dest.	36,5	38	39

Tabelle 14: Temperatur und Dauer der Amplifikationsschritte für die *VHL*-Exons. Allen Programmen ging eine initiale 4minütige Denaturierung bei 94 °C voraus. Nach Ablauf der Zyklen folgte eine 20-minütige terminale Kettenverlängerung bei 70 °C. Standardmäßig wurden alle Reaktionen mit einem finalen 4 °C Schritt beendet.

	Exon 1	Exon 2	Exon 3
Denaturierung	94 °C - 60 sek	94 °C - 45 sek	94 °C - 45 sek
Primeranlagerung	55 °C - 60 sek	60 °C - 30 sek	60 °C - 30 sek
Kettenverlängerung	72 °C - 60 sek	70 °C - 60 sek	70 °C - 45 sek
Amplifikationszyklen	35	35	35

3.6.3 Isolation human-genomischer DNA

Die DNA-Isolation aus peripherem Blut mit dem kommerziell erhältlichen Kit (ROCHE *DNA-Isolation Kit from mammalian Blood*) erfolgt nach Herstellerangaben. Hierbei wird durch selektive Lyse zunächst der Erythrozyten dann der Zellkern-haltigen Leukozyten. Letztgenannter Schritt dient der Freisetzung der DNA. Nach einem Fällschritt mit Isopropanol (absolut) wird die flockig ausfallende, hochmolekulare DNA mit einem sterilen Glasstab aufgenommen, in ein 1.5ml Reaktionsgefäß überführt und nach zwei Waschschritten mit Ethanol (70%), bei denen Salzreste entfernt werden, bei 37 °C getrocknet.

Frisches oder tiefgefrorenes Gewebe wird auf einer sterilen Arbeitsplatte durch mechanische Einwirkung fragmentiert. Frisches Gewebe wurde sofort aufbereitet. Die DNA-Isolation erfolgte nach Lyse der Gewebeproben mit Proteinase K [5µg/ml Endkonzentration] für mehrere Stunden bei 50 °C mit einem kommerziell erhältlichen Kit (ROCHE *High pure PCR Template Preparation Kit*) exakt nach Herstellerangaben.

Beide Isolationsmethoden beinhalten einen RNase Verdau, der vollständige RNA Degradation gewährleistet, damit störende RNA-Effekte spätere DNA Analysen nicht beeinflussen.

3.6.4 Gewinnung von Plasmid- und PAC-DNA

Die Präparation von geringeren Mengen Plasmid- und PAC-DNA erfolgt nach dem Prinzip der alkalischen Lyse, wenn die isolierte DNA nachfolgend lediglich in Restriktionsverdaus oder in der PCR eingesetzt werden sollte. Hierzu wurde der *Qiagen Miniprep Kit* (Fa. Qiagen, Hilden) mit Modifikationen verwendet. Es werden 1.5 ml Bakterienkultur sedimentiert und das Pellet in 150 µl P1 (bei 4 °C gelagert, da RNase haltig) resuspendiert. Nach dem Hinzufügen von 150 µl P2 (Lysepuffer) wird das Gemisch einige Male invertiert und 30 sek inkubiert. Anschließend werden 150 µl P3 (Neutralisierungspuffer) dazu getropft, sorgfältig gemischt und bei 14.000 UpM in einer Eppendorf Tischzentrifuge für 10 min zentrifugiert. Dabei pelletiert das bakterielle Lysat und die freigesetzte Plasmid- bzw. PAC-DNA bleibt sich im Überstand gelöst. Der Überstand wird in ein neues Eppendorf-Gefäß transferiert. Nach 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wird die DNA durch Zugabe von 1 ml Ethanol (100%), Mischen und Zentrifugation bei 4 °C (14.000 UpM; 15 min) gefällt. Zur Entfernung von Salzresten wird das entstandene Pellet zweimal mit 70%igem Ethanol gewaschen. Nach Trocknung des Pellets bei 37 °C wird dieses in 30 µl 0.1x TE gelöst.

Sollen größere Mengen Plasmid-DNA isoliert werden, findet der *Nucleobond AX-Kits* der Fa. Macherey und Nagel (Düren) nach Angaben des Herstellers Anwendung. Zur Präparation von bis zu 100 ml Bakteriensuspension werden AX100-Säulen und bei größerem Volumen (bis zu 300 ml) AX500-Säulen eingesetzt. Nach Sedimentation des Bakterienpellets (20.000 UpM; 30 min; 4 °C) erfolgt die Resuspension in 8 ml S1-Puffer. Nach der Zugabe von 8 ml S2-Puffer wird das Gemisch

5 mal vorsichtig invertiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 8 ml S3-Puffer, der die Präzipitation der Plasmid-DNA bewirkt, hinzugegeben und ebenfalls 5 mal invertiert. Nach 5-minütiger Inkubation auf Eis wurde die Bakteriensuspension wahlweise zentrifugiert oder filtriert. Bei Filtration wurde der verwendete Filter erst mit Aqua dest. befeuchtet. Das DNA-haltige Lysat wurde dann auf die entsprechende, mit 2.5 ml N2-Puffer äquilibrierte Säule gegeben. Der aufgefangene Durchfluß wurde abermals über die Säule geschickt. Bei diesem Vorgang adsorbierte die DNA an die Säulenmatrix. Gewaschen wurde mit 3 mal 4 ml N3-Puffer. Nach dem Überführen der Säule in ein neues Spitzboden-Röhrchen wurde die DNA 2 mal mit je 2.5 ml N5-Puffer (50°C) eluiert. Die DNA des Lysats wurde durch eine nachfolgende Isopropanol-Fällung gewonnen.

3.6.5 Fällung von DNA

In der Regel wird DNA durch Zugabe von 0.1 Vol. 3 M Natriumacetat (pH 5.2) und 2.5 Vol. eiskaltem Ethanol (100%) gefällt. Nach Mischen des Ansatzes wird für 30- 45 min bei 14.000 UpM (4° C) zentrifugiert. Nachdem der Überstand verworfen ist, wird das entstandene Pellet 10 min bei 14.000 UpM mit 1-2 Vol. 70 % Ethanol gewaschen. Das Pellet wird bei 37°C dehydriert und in 10- 50 µl 0.1x TE oder Aqua dest. resuspendiert. Beim Ausfällen von DNA nach der Sequenzierungs-Reaktion wird der gleiche methodische Ablauf gewählt, jedoch erfolgen alle Arbeitsschritte bei Raumtemperatur.

Zur Aufreinigung speziell von Oligonukleotiden aus PCR-Ansätzen werden letztgenannte mit 1 Vol. 4M Ammoniumacetat und 2 Vol. (frisch abgefülltem) Isopropanol versetzt. Die Zentrifugation erfolgt bei 14.000 UpM für 30 min bei Raumtemperatur. Unter diesen Bedingungen bleiben Nukleotide unter 80 bp in Lösung. Der Überstand wird verworfen. Zum Waschen des Pellets werden 2 Volumenteile 70% Ethanol zugefügt und für 10 min bei 14.000 UpM zentrifugiert. Anschließend wird das Pellet bei 37°C getrocknet und in 10-50 µl 0.1x TE oder Aqua dest. gelöst.

3.6.6 Quantifizierung von DNA

Die photometrische Bestimmung von Nukleinsäurenkonzentrationen beruht auf der spezifischen Absorption ultravioletter Strahlung der in der DNA enthaltenen Purin- und Pyrimidinbasen. Das Absorptionsmaximum der Basen liegt bei 260nm. Die aus der Anregungswellenlänge aufgenommene Energie wird dabei in Form von Wärme und Fluoreszenzstrahlung freigesetzt. Während die Absorptionsmessung bei 260nm die im Messvolumen enthaltene DNA erfasst, spiegelt die Absorption bei 280nm die enthaltenen Protein-Anteile wider. Hier sind es die aromatischen Seitenketten der Aminosäuren Phenylalanin, Tryptophan und Tyrosin, die eine Transmissionsreduktion der entsprechenden Wellenlänge bewirken. Gemessener Parameter ist das Absorptionsmaß bei entsprechender Wellenlänge. Von der in TE-Puffer gelösten DNA wird eine Verdünnung in TE hergestellt. Die Messung erfolgt in Quarzglasküvetten mit 1 cm Schichtdicke. Als Referenz-Messung dient TE-Puffer ohne DNA. In wässriger Lösung weist DNA bei einer Konzentration von 50 µg/ml bei 260nm im Photometer eine Absorption von 1 auf. Unter Berücksichtigung des Gesetzes von Lambert-Beer (siehe Kasten) kann nun bei gleichbleibender Schichtdicke, Wellenlänge und zu messendem Stoff die Formel zur DNA-Konzentrationsbestimmung zusammengefasst werden:

$$c[\text{DNA}] = A_{260} \times 50 [\mu\text{g/ml}] \times \text{Verdünnungsfaktor(VF)}$$

$A = c \times d \times \kappa \quad \text{wobei}$ A = Absorptionsmass c = Konzentration des absorbierenden Stoffes d = Schichtdicke κ = spektraler Absorptionskoeffizient (wellenlängenabhängig)

Es wird durch Variation des Volumens eine Konzentration von 1µg/µl und ein A_{260}/A_{280} -Quotient von 1.8 angestrebt.

Bei der quantitativen Abschätzung des Nukleinsäuregehalts mittels eines Agarose-Gels werden die DNA-Proben elektrophoretisch aufgetrennt. Anhand eines quantitativen DNA-Standards wird die DNA-Konzentration der Proben abgeschätzt. Hierzu wird ein *DNA Quant Standard* (500 bp-Fragmente; 100 ng/µl) im Verhältnis 1:10 mit Aqua dest. verdünnt und jeweils ein Volumen von 10, 20, 30 und 50 ng auf das Gel aufgebracht. 2 µl der zu bestimmenden Proben werden zusammen mit 8 µl Aqua dest. und 2 µl 6fach DNA-Probenpuffer aufgetragen. Nach erfolgter elektrophoretischer Auftrennung kann anhand der Bandenintensität der Proben im Vergleich zu der Intensität der Bande des Standards der DNA-Gehalt abgeschätzt werden.

3.6.7 Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Der Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen wird entsprechend den Empfehlungen des Enzymherstellers (*New England BioLabs*) angesetzt. Für einen 10-50 µl Ansatz wird eine Menge von 0.1-1 µg der extrahierten DNA bzw. der Subklon-DNA eingesetzt. Als Restriktionsenzym dient jeweils 5-10 U Restriktionsenzym. Dazu werden jeweils 0.1 Vol. der korrespondierenden 10-fach Reaktionspuffer verwendet. Die Inkubation erfolgt abgestimmt auf DNA-Menge und Enzym für 2-12h bei für das Enzym optimalen Temperaturen (Herstellerangabe).

3.6.8 Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente von 75bp bis 20kb Größe werden auf horizontalen Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt. Die Agarosekonzentration variiert je nach aufzutrennender Fragmentgröße zwischen 0.8 und 1.2 %. Während kleine Fragmente in hochkonzentrierten Gelen aufgetrennen, werden für größere Fragmente niedrigere Agarosekonzentration gewählt. Das Laufverhalten der in einem elektrischen Feld aufgetrennten Nukleinsäuren ist dabei abhängig von derer Konformation und Größe. Die Lauflänge entspricht dabei dem negativen dekadischen Logarithmus der Fragmentgröße. Ein direkter Rückschluss von der Laufhöhe der Fragmente auf ihre Größe erfolgt durch den Vergleich mit aufgetragenen Molekulargewichtsstandards. Zur Färbung der DNA wird die noch flüssige, auf etwa 50°C abgekühlte Agarose mit Ethidiumbromid, einem in die DNA interkalierenden Farbstoff, versetzt. Vor Aufbringen der Proben in das polymerisierte, erkaltete Gel werden diese mit 1/6 Vol. 6x DNA-Probenpuffer versetzt, um diese zu beschweren. Als Puffersystem dient 1 x TAE. Die angelegte Spannung liegt, je nach Gelgröße, bei 80-150 Volt. Nach erfolgter Elektrophorese werden die Gele unter UV-Licht ($\lambda=312$ nm) mittels eines E.A.S.Y.-Videosystems (Herolab, Wiesloch) dokumentiert.

Zur Auftrennung größerer Fragmente (10 kb-160 kb) wird die Pulsfeld-Gelelektrophorese gewählt. Bei dieser bewirkt die Verwendung einer speziellen Gelkammer, deren elektrisches Feld periodisch die Richtung wechselt, eine Wanderung der aufzutrennenden Fragmente durch eine besonders grobmaschige Agarose-Gelmatrix. Das Gel wird mit PFGE-Agarose (1%) hergestellt. Als Puffersystem dient in diesem Fall 0.5x TBE. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgt in 24.5h bei 14°C mit einer Spannung von 6 V/cm. Der Winkel des elektrischen Pulses beträgt 120°. Die Richtung des Pulses wechselt initial alle 0.47 Sekunden und steigt linear zu einem finalen zeitlichen Abstand von 13,75 Sekunden an. Als Molekulargewichtsstandard findet die DNA des Bakteriophagen λ und *Hind* III restringierte λ -DNA Verwendung. Nach erfolgter Elektrophorese wird das Pulsfeld-Gel ca. 20-30 min in einer (frisch hergestellten) Ethidiumbromid-Lösung angefärbt, anschließend 20-30 min gewässert und photographisch dokumentiert.

3.6.9 Wiedergewinnung von DNA aus Agarose-Gelen

Nach elektrophoretischer Auftrennung werden die zur Wiedergewinnung ausgewählten DNA-Banden mit einem frischen Skalpell möglichst exakt aus dem Agarose-Gel ausgeschnitten. Die Aufreinigung der DNA-haltigen Fragmente erfolgt mit Hilfe des *GFX DNA and Gel Band Purification Kit* der Firma *Amersham Pharmacia*. Nach Bestimmung des Gelgewichtes wird das Fragment mit dem korrespondierenden Volumen *Capture*-Puffer versetzt. Der Ansatz wird nach ausgiebigem Mischen für 5-15 min bei 60°C inkubiert bis das Gel völlig gelöst vorliegt. Die Probe gelangt dann auf eine GFX-Säule in einem speziellen Sammelgefäß und wird 1 min inkubiert. Nach 1-minütiger Zentrifugation (14.000 UpM; RT) wird der Durchfluss verworfen. Die an der Membran der Säule gebundene DNA wird mit 500 µl Wasch-Puffer 2 min bei 14.000 UpM (RT)

gewaschen. Nach Verwerfen des aufgefangenen Waschpuffers erfolgt ein zusätzlicher 1-minütiger Zentrifugationsschritt, der den im Waschpuffer enthaltenen Ethanol vollständig von der Membran entfernen soll. Anschliessend wird die Säule in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gestellt und die DNA mit 20-50 µl *Elutions*-Puffer (entweder Aqua dest. oder 0.1x TE) eluiert. Dafür wird die gewählte Flüssigkeit direkt auf die Matrix gegeben, 1 min inkubiert und 2 min wie beschrieben zentrifugiert.

3.6.10 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von DNA basiert auf der von Sanger et al. entwickelten Kettenabbruch-Reaktion durch Di-Desoxynukleotide (Sanger et al., 1977), die von Lee et al. durch Verwendung fluoreszierender Di-Desoxynukleotide modifiziert wurde (Lee et al., 1992). Durch den Einsatz vier verschiedener Fluorophore für die vier Di-Desoxynukleotide ist dabei nur ein Sequenzier-Ansatz pro zu sequenzierendem DNA-Strang nötig. Für die Sequenzierungsreaktion wurde der *Prism Ready Reaction DyeDeoxy-Terminator Cycle Sequencing Kit* (Fa. Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt) nach modifizierten Angaben des Herstellers verwendet. In einen 20 µl Ansatz wurden 50-100 ng PCR-Produkt, 0.5-1 µg Plasmid DNA oder 1-5 µg PAC-DNA als Matrize eingesetzt. Dem Ansatz werden 5-10 pmol eines spezifischen Oligonukleotid-Primers und 8 µl *Premix* (enthält den Reaktionspuffer, markierte Di-Desoxynukleotide, Nukleotide und das Enzym) zugefügt. Die Reaktion wird mit folgendem Sequenzierprogramm in einem Thermocycler durchgeführt:

Plasmide und PCR-Produkte			PAC-DNA	
95 °C	1 Minute		4 Minuten	
95 °C	30 Sekunden	30 Zyklen	30 Sekunden	35 Zyklen
50 °C	10 Sekunden		5 Sekunden	
60 °C	4 Minuten		4 Minuten	
4 °C	∞		∞	

Die Produkte der Reaktion werden anschließend mittels Natriumacetat/Ethanol (RT) präzipitiert und nach Trocknung bei 37 °C in 2-3 µl deionisiertem Formamid / 50 mM EDTA (5:1, pH 8,0) gelöst.

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese, die Detektion der Fluoreszenzsignale sowie die automatische Auswertung erfolgt nach Angaben des Herstellers der Sequenziergeräte (Fa. Applied Biosystems, Weiterstadt). Vor der anschließenden Gelelektrophorese werden die Proben 2 min bei 95 °C denaturiert und 2 min auf Eis gekühlt. 1.5 µl der Proben wurden auf das Sequenzierungsgel (4.5% PAA-Gel, 7M Harnstoff) des automatischen Sequenziergerätes aufgetragen. Während der Auftrennung bei angelegter Spannung von 30 V misst ein Detektor die Fluoreszenzsignale der durch einen Laser angeregten DNA-Fragmente an bestimmten Punkten im Gel. Durch die vier verschiedenen Fluorophore kann die DNA-Sequenz in einer Spur detektiert werden. Die Auswertung der Intensitätsprofile der Fluoreszenzfarbstoffe erfolgt mit der *Analysis 2.1.2*-Software (Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt).

3.6.11 Analyse von DNA-Sequenzen

Die DNA-Sequenzdaten werden mit der *Sequencher 4.1* Software (Fa. Gene Codes Corporation, Inc., USA) computergestützt editiert und ausgewertet. Überlappende Nukleotidsequenzen werden mittels des Sequencher-Programmes nach festzulegenden Parametern (Übereinstimmungsgrad in Prozent und Mindestüberlappung in Anzahl der Basen) angeordnet. Homologievergleiche mit öffentlichen Datenbanken (nicht redundante Gendatenbank, EST-Datenbank) werden mit dem Programm *BLAST* (*Basic Local Alignment Search Tool*) vorgenommen (Altschul et al., 1997). Dabei wird der *BLASTN*-Algorithmus verwendet, bei dem ein Vergleich der Nukleotidsequenzen mit Einträgen von Nukleotidsequenzdatenbanken durchgeführt wird. Das *BASIC BLAST* Programm ist im Internet zugänglich unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>.

3.6.12 Klonierung von DNA-Fragmenten in Plasmidvektoren

Die Subklonierung von PCR-Produkten in Plasmidvektoren erfolgt mit dem *TOPO TA[®] Cloning Kit Version K2[™]* (INVITROGEN GmbH, Karlsruhe). Der darin enthaltene linearisierte *pCRII-TOPO*-Vektor verfügt über einzelsträngige 3'-Thymidin Überhänge. Daher können die mittels des Enzyms

Taq-Polymerase amplifizierten PCR-Produkte, die einen 5'-Desoxyadenosin-Überhang besitzen, direkt in den Plasmid-Vektor ligiert werden. Die kovalente Kopplung des Enzyms Topoisomerase I an den Vektor gewährleistet eine sehr effiziente Ligation. Nach abgeschlossener Ligation wird das Produkt in chemokompetente Bakterien transformiert. Hierzu wurden 50-100 µl kompetenter DH5α-Bakterien vorsichtig mit der zu transformierenden DNA gemischt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock bei 42°C für 1 min wurde der Ansatz mit 1 ml LB-Medium versetzt und bei 37°C für 1 Stunde geschüttelt. In der Regel wurden 10-300 µl des Transformationsansatzes auf LB-Agarplatten (mit 100 µg/ml Ampicillin, 40µg/ml X-Gal und 50µg/ml IPTG) ausgestrichen und für 16-20 Stunden bei 37°C bebrütet. Rekombinante Bakterienstämme werden sowohl durch eine Antibiotika-Resistenz als auch durch eine Farbstoff-Reaktion (β-Galaktosidase-Aktivität) selektioniert. Durchschnittlich wurden 2-12 weiße, rekombinante Kolonien in 3ml ampicillinhaltiges LB-Medium überimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine Charakterisierung der Plasmidintegrate durch DNA-Isolation und anschließenden Restriktionsverdau oder durch spezifische PCR-Reaktionen.

3.6.12.1 Vektor- und Integratvorbereitung

Der verwendete Plasmidvektor (*pCRII-TOPO*) liegt, wie bereits beschrieben, linearisiert vor und musste nicht weiter modifiziert werden. Als Integrat dienen PCR-Produkte, die in einer Standard-PCR amplifiziert werden. Diese Fragmente werden nach gelelektrophoretischer Auftrennung aus dem Gel eluiert. Die so gewonnen Fragmente werden entweder direkt in die Ligation eingesetzt oder wie folgt behandelt: Da bei der Gel-Elution die A-Überhänge der PCR-Produkte vermutlich teilweise eliminiert werden, müssen diese neu generiert werden. Dafür wird in einen 25 µl Ansatz 20.5 µl PCR-Produkt, 2.5 µl (10x) Puffer, 1µl dATPs und 1µl Taq-Polymerase eingesetzt. Nach erfolgter Inkubation bei 72°C für 20 min folgt die Sedimentation der DNA mit 100%igem, kaltem Ethanol.

3.6.12.2 Ligation

Eine Ligation, bei der die T-Überhänge des Vektors mit den A-Überhängen der PCR-Produkte hybridisieren, läuft nur in kleinem Reaktionsvolumen und optimalem Verhältnis von Integrat und Vektor (ca. 4:1) effizient ab.

In einen 4 µl Ansatz werden folgende Komponenten vereint: 2µl PCR-Produkt, 0.5 µl Vektor (*pCRII-TOPO*) und 0.5 µl *Salt Solution*. Die Inkubation erfolgt je nach Größe des zu integrierenden Fragments 5-30 min bei RT. Daraufhin wird der Ansatz bis zur weiteren Bearbeitung auf Eis gelagert.

3.6.12.3 Transformation und Selektion positiver Klone

Für die Transformation eines Ligationsansatzes werden entweder die im *TOPO-KIT* enthaltenen chemokompetenten *E.coli* Bakterien vom Stamm *TOP10F'* oder selbst hergestellte chemokompetente Bakterien (*E.coli* DH5α, Invitrogen) verwendet. Hierzu werden 50 µl dieser kompetenten Bakterien vorsichtig mit 2 µl der zu transformierenden DNA gemischt und 10 min auf Eis inkubiert. Nach einem 30-sekündigen Hitzeschock bei 42°C wird der Reaktionsansatz auf Eis abgekühlt und nachfolgend mit 220 µl LB-Medium versetzt. Es folgt eine Inkubation von 1h bei 37°C im Schüttler. Anschließend wurden 70-140 µl des Gemisches auf LB-Agarplatten (mit 100µg/ml Ampicillin, 40µg/ml X-Gal und 50µg/ml IPTG) ausplattiert und für 16-20h bei 37°C bebrütet. Weiße, rekombinante Kolonien werden in 3-5ml ampicillinhaltiges LB-Medium überimpft und über Nacht im Schüttelinkubator (37°C) kultiviert. Zur Charakterisierung der Plasmidintegrate wird die DNA isoliert und mit Hilfe von Restriktionsverdaus oder spezifischen PCR-Reaktionen analysiert. In Folge werden die Integrate mittels Sequenzierung verifiziert. Von positiven Bakterienklonen werden große Übernachtskulturen in einem Volumen von 100-200 ml LB-Medium (50 µg/ml Ampicillin) angesetzt und deren DNA isoliert.

3.6.13 Radioaktive Markierung von DNA

Alle Arbeiten mit radioaktiven Material wurden in einem dafür zugelassenen Laborraum durchgeführt. Für die Identifikation *VHL* enthaltender Klone im Koloniefilter-Assay wird ein PCR-

generiertes Fragment des Exon 3 von VHL als Sonde verwendet. Hierzu wird das Fragment auf einem präparativen Agarose-Gel ausgeschnitten und die DNA mit dem GFX *purification kit* aus dem Agaroseblock wiedergewonnen. Nach Quantifizierung des Eluats wird das Fragment mit der *random priming* Methode mit $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP (AMERSHAM Biosciences, Braunschweig) markiert. Hierzu wird das Prime It II Kit von Stratagene verwendet.

X	μl	50 ng DNA
ad	23.5 μl	Aqua dest.
10	μl	Nonamer-Primer Mischung ↳ 5 Minuten Denaturierung 96 °C
10	μl	dCTP Puffer (5x)
1.6	μl	Polymerase (Exonuklease negativ)
5	μl	$\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP (=50 μCi) ↳ 30 Minuten 37 °C

Um den Nachweis spezifischer Signale zu gewährleisten, müssen die bei Markierungsreaktionen anfallenden, nicht eingebauten, markierten Nukleotide von der markierten polymeren DNA abgetrennt werden. Dies geschieht im Falle der „*random priming*“ Markierung durch Affinitätsäulen-Aufreinigung mit Hilfe des PCR-Aufreinigungskits von Qiagen. Dabei wird exakt nach Herstellerangaben verfahren. Der in 50 μl A.dest. gelösten, von freien Nukleotiden gereinigten, radioaktiv markierten DNA-Sonde werden 2 μl entnommen und in Szintillationsflüssigkeit verdünnt. Die spezifischen Aktivität der Sonde wird in einem Wallac Szintillationszähler bestimmt. Nach Verrechnung des Verdünnungsfaktors (hier 25) wird die für die Hybridisierung notwendige Sondenmenge bestimmt (abhängig von der Fläche des Filters mit Hybridisierungszielen).

3.6.14 Nicht-radioaktive Markierung von DNA

3.6.14.1 Nick-Translation

Zur nicht radioaktiven Markierung von DNA wurde der Nick Translations Kit der Firma Vysis verwendet. Die Anwendung erfolgte nach Herstellerangabe mit nachfolgend angeführten Modifikationen:

Humane, gesamtgenomische DNA oder PAC-DNA werden mit Hilfe des CGH Nick-Translation Kits der Firma Vysis mit Biotin-16-dUTP oder DIG-11-dUTP markiert. Bei der Nick-Translation (Macgregor und Mizuno, 1976) wird doppelsträngige DNA unter Zuhilfenahme der DNase I sowie der E. coli-Polymerase I markiert: Die DNase I fügt statistisch verteilt Einzelstrangbrüche, sog. „*nicks*“ in den DNA-Doppelstrang ein. Es entstehen also offene Phosphodiesterbrücken, die Ansatzpunkt für die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Pol I darstellen. Vom 5'-Ende her werden nun sukzessive Nukleotide abgebaut, es entsteht versetzt einzelsträngige DNA. Diese Stränge dienen der Polymerasefunktion der Pol I als Substrat und die Lücke wird vom 3'-OH-Ende her geschlossen. Geschieht dies unter Anwesenheit markierter Nukleotide (Digoxigenin- oder Biotin-markiert), so wird die DNA gleichmäßig markiert.

a) Markierung mit Biotin-16-dUTP (Tumor- bzw. Test-DNA)

X	μl	DNA (1–3 μg)
ad	19.6 μl	Aqua dest.
+5	μl	10 x Nick-Translation Puffer
+10	μl	dNTP-Mix (je 0,1 mM dATP, dGTP sowie dCTP)
+3.31	μl	0,1 mM dTTP
+2.1	μl	1 mM Biotin-16-dUTP
+10	μl	Enzymmischung (DNase I / DNA Pol I)

b) Markierung mit DIG-11-dUTP (Referenz-DNA)

X	μl	DNA (1–2 μg)
ad	15 μl	Aqua dest.
5	μl	10 x Nick-Translation Puffer
10	μl	dNTP-Mix (je 0,1 mM dATP, dGTP sowie dCTP)
6,66	μl	0,1 mM dTTP
3,33	μl	0,1 mM DIG-11-dUTP
10	μl	Enzymmischung (DNase I / DNA Pol I)

Der Ansatz wird auf Eis pipettiert und für 180 Minuten in ein 15° C -Wasserbad gebracht. Nach Abschluß des Verdauens wird der Ansatz für die Zeit der Fragmentlängenbestimmung auf Eis belassen. Bei optimalen Fragmentlängen (zwischen 500 und 2000 bp) wird der Ansatz mit 3 µl 0.5M EDTA pH 8.0 und 1 µl SDS 10 % versetzt und für 10 Minuten auf 68°C erhitzt. Bei überlangen Fragmenten (>2000 bp) wird durch Zugabe von Enzymmischung für ½ Stunde bei 15°C nachverdaut. Fragmentlängen unter 100 bp machen einen Neuansatz mit kürzeren Verdauzeiten nötig. Die abgestoppten Reaktionsansätze können für längere Zeit bei -20°C schadlos gelagert werden.

3.6.14.2 DOP-PCR

Die Markierung von DNA durch DOP (*degenerate oligonucleotide primed*)-PCR wird zur repräsentativen und unspezifischen Amplifikation genomischer DNA aus geringen Mengen von Ausgangs-DNA benötigt. Erstmals wurde diese Methode 1992 beschrieben (Telenius et al., 1992a). Als Primer dient ein 22-mer mit in sechs benachbarten Positionen stehenden, degenerierten Nukleotiden (N = A,T,C oder G). Die DOP-PCR wird ausführlich in Kapitel 3.7.3.2 beschrieben.

3.6.15 Herstellung von Koloniefiltern

Zur Herstellung der Koloniefilter wurden Bakterienklone der 384-Loch-Mikrotiterplatte mit einem 384er Stempel auf eine Hybond N⁺-Membran aufgetragen. Um einen gleichmäßigen Abruck des Stempels zu gewährleisten befand sich die Membran auf einem flexiblen Untergrund (Zellulose-Tücher). Nachdem der Filter mit der gestempelten Seite nach oben auf eine kanamycinhaltige LB-Agarplatte aufgebracht worden war, erfolgte eine Inkubation von 37°C über Nacht. Tags darauf wurde der Filter in folgender Weise prozessiert:

Zuerst wurden die Bakterienklone durch 10minütiges Aufbringen der Membran auf 10%ige SDS-Lösung lysiert, die dadurch freiliegende DNA für 10 min mit DNA-Denaturierungslösung in ihre Einzelstränge zerlegt und anschließend für 10 min in DNA-Neutralisierungslösung inkubiert. Die Fixierung der DNA an die Membran erfolgte durch 2stündige Inkubation bei 80°C. Nach der vorsichtigen Entfernung des Bakterienlysats mit einem fusselfreien Zellulose Tuch (Kimwipes, Kimberly-Clark) wurde der Filter für 30 min in 100 mM Na₂HPO₄/1% SDS-Lösung gewaschen.

3.6.16 Hybridisierung und Waschen der Koloniefilter

Der Filter wurde für 4-16 h in 30-50 ml Church-Hybridisierungspuffer bei 65°C im Hybridisierungssofen prähybridisiert. Daraufhin folgte die eigentliche Hybridisierung. Hierfür wurde der Filter für 16-20h in frischem Church-Hybridisierungspuffer mit der markierten Sonde (Konzentration von 1-2x 10⁶ cpm/ml) bei 65°C inkubiert. am folgenden Tag wurde unspezifisch gebundenes Sondenmaterial durch Waschen des Filters entfernt. Dazu wurden Na₂HPO₄ / 1% SDS-Lösungen absteigender Molarität (200 mM, 100 mM, 50 mM Na₂HPO₄) verwendet. Es wurde mindestens 30 min mit der jeweiligen Lösung bei 60°C-65°C gewaschen. Zur Detektion des Signales wurde der Filter in Frischhalte-Folie verpackt und in einer mit Verstärkerfolie ausgekleideten Kassette für 16-24 h bei -80°C autoradiografiert.

3.7 Molekular-zytogenetische Methoden

3.7.1 Comparative Genom-Hybridisierung (CGH)

Die CGH ist eine Methode der reversen FISH (Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung). Diese Bezeichnung beschreibt die Anwendung unbekannter, zu testender DNA-Sonden auf genetisch normale Hybridisierungsziele. Die zu testende DNA (hier Tumor DNA) wird mit Nick-Translation mit Biotin, die Referenz DNA (isoliert aus peripherem Blut) mit gleicher Methode durch Digoxigenin markiert (siehe Kap. 3.6.13). Für eine Hybridisierung von bis zu vier Objektträgern werden je 1 µg

Biotin-markierte Test- und 1µg Digoxigenin-markierte Referenz-DNA mit 70µg unmarkierter, humaner c₀t1-DNA gemeinsam gefällt.

	1µg biotinylierte Test-DNA
+	1µg digoxigenierte Referenz-DNA
+	70µg humane c ₀ t1-DNA
+	¹ / ₂₀ Volumen 3 M NaO-Acetat pH 5.2
+	2 Volumen eiskalter Ethanol (100%)

Die Zugabe dieses großen Überschusses unmarkierter, mit (hoch-)repetitiven Sequenzen angereicherter c₀t1-DNA dient dazu, repetitive Alu- oder Kpn- Sequenzen der markierten DNA zu blockieren. Durch CISS (*chromosomal in situ suppression*) Hybridisierung wird gewährleistet, daß lediglich solche Sequenzen mit chromosomalen Zielsequenzen hybridisieren, die relevante, also genkodierende Sequenzabschnitte enthalten. Zudem werden störende, individuelle Polymorphismen von der quantitativen Bildanalyse ausgeblendet (Landegent et al., 1987; Cremer et al., 1988; Lichter et al., 1988).

Die Abtrennung nicht in die DNA inkorporierter Nukleotide erfolgt durch Ethanol-Fällung der DNA-Mischung. Polymere DNA fällt aus, während Nukleotide in Lösung bleiben.

Die DNA-Mischung wird ausgiebig gemischt und bei 14.000 UpM gekühlt zentrifugiert. Nach Dekantieren des Überstandes wird das Pellet mit 500µl kaltem Ethanol (70%) gewaschen und zentrifugiert. Der Waschschrift wird ein weiteres Mal wiederholt. Der Überstand wird mit einer Pipette scharf vom Pellet getrennt und das Pellet auf einem 37°C Heizblock bei geöffnetem Deckel des Reaktionsgefäßes luftgetrocknet.

Die gefällte DNA wird für mindestens eine halbe Stunde auf einem 37°C Schüttler in deionisiertem Formamid gelöst (6µl/Objektträger).

Im Anschluß werden 6µl Hybridisierungs-Puffer (4 × SSC; 20% Dextransulfat) / Objektträger hinzupipettiert und nochmals für mindestens ½ Stunde bei 37°C geschüttelt.

Die Denaturierung der Sondenmischung erfolgt für 6 Minuten bei 75°C im Heizblock.

Die nun einzelsträngige DNA wird ½ Stunde bei 37°C zur Prä-Hybridisierung ruhen gelassen. In dieser Zeit hybridisieren repetitive Sequenzen genomischer DNA mit unmarkierten Sequenzen der c₀t1-DNA. Diese Reaktion unterbindet durch Blockierung repetitiver Sequenzen die spätere Hybridisierung der nicht kodierenden DNA mit chromosomaler Zielsequenz. Komplexe DNA-Anteile der markierten DNA bleiben hiervon unberührt und können weiterhin als Einzelstrang-Moleküle mit ihren homologen, chromosomalen Sequenzen Bindungen eingehen. Die Prä-Hybridisierungsphase sollte zwischen 15 und 30 Minuten andauern. Nach Verstreichen der Prä-Hybridisierungszeit werden die DNA Sonden auf vortemperierte, denaturierte Chromosomepräparate pipettiert (zur Herstellung denaturierter Chromosomen siehe Kap. 3.7.2.1).

3.7.2 FISH

3.7.2.1 Denaturierung chromosomaler DNA

Denaturierungspuffer		Endkonzentration
• Formamid, dreifach destilliert	49ml	70 %
• 20 × SSC	7ml	2 × SSC
• A. bidest. pH 7.0 ± 0.02	14ml	

- Die bei 4°C in 70 % Ethanol gelagerten Chromosomen-Präparate werden luftgetrocknet und danach für exakt 2 Minuten in das 72°C warme Denaturierungsbad gebracht (Messung der Temperatur innerhalb der Denaturierungs-Küvette). Es sollten nicht mehr als drei Objektträger gleichzeitig denaturiert werden, um ein Absinken der Denaturierungspuffer-Temperatur zu vermeiden. Nach Verstreichen der Zeit schließt sich die Entwässerung der Präparate in einer aufsteigenden, eiskalten Ethanolreihe (70%, 90%, 100%, jeweils 5 Minuten) an. Die Trocknung der Präparate erfolgt im Anschluß bei Raumtemperatur.

3.7.2.2 Sondenvorbereitung

- Durch nicht radioaktive DNA-Markierung hergestellte DNA-Sonde (vgl. Kap. 3.6.14) wird nach Fällung und Trocknung in deionisiertem Formamid gelöst und bei 37°C 30 Minuten geschüttelt. Nach Lösung des Pellets wird das gleiche Volumen 4xSSC / 20% Dextransulfat zupipettiert und wiederum 30 Minuten bei gleicher Temperatur geschüttelt. Nach vollständiger Lösung folgt die Sonden-denaturierung.
- Hierzu wird die markierte Sonde für 5 Minuten auf 76°C aufgeheizt. Anschließend wird die DNA prä-hybridisiert (30 Minuten, 37°C).
- Nach Verstreichen der Prä-Hybridisierungszeiten der DNA Sonden werden diese auf zuvor denaturierte und auf 37°C vortemperierte Chromosomenpräparate pipettiert (siehe Kap. 3.7.2.1). Auf jeden OT werden in Abhängigkeit der Deckglasfläche 8.5 bis 15µl Sonden-DNA aufgetragen. Nach Abdecken der Präparate mit Deckgläsern werden diese mit Fixogum abgedichtet und in einer feuchten Kammer bei 37°C für 24-48 Stunden im Brutschrank gelagert.

3.7.2.3 Waschen und Detektion (bei indirekter Markierung)

Zum Abbruch der Hybridisierung werden die Objektträger dem Brutschrank entnommen und die Deckgläschen entfernt. Zur Entfernung von nur unspezifisch hybridisierten Sequenzen werden die Chromosomen einer Reihe stringenter Waschschrte unterzogen. Die Waschschrte stellen geeignete Bedingungen bereit, schwache Bindungen der Sonden-DNA mit der chromosomalen DNA zu lösen. Hybridisierungen homologer Sequenzen werden hierbei in weit geringerem Umfang gelöst.

Waschlösung A		Endkonzentration
• Formamid	150 ml	50 %
• 20 × SSC	30 ml	2 × SSC
• A.bidest.	120 ml	
pH 7.0 ± 0.02		

Waschlösung B		Endkonzentration
• 20 × SSC	2.5 ml	0.1 × SSC
• A.bidest.	ad 500ml	
pH 7.0 ± 0.02		

- Nach Entfernung der Deckgläschen erfolgt ein Waschen der Objektträger für 10 Minuten, dann für 3×5 Minuten in Waschlösung A bei 42 °C im Schüttelwasserbad.
- Direkt im Anschluß werden die Objektträger für 3×5 Minuten bei 60°C in Waschlösung B gebracht. Bei allen Schritten ist darauf zu achten, dass die Objekte nicht trockenfallen, da ein Eintrocknen der Chromosomen in einer starken Granulierung des Fluoreszenz-Signals resultiert.

3.7.2.3.1 Block unspezifischer Epitope

Um eine unspezifische Detektion zu unterbinden, werden die sondenmarkierten Chromosomen mit einem Blockierungspuffer eingedeckt. Der Puffer enthält Rinder-Serumalbumin, eine Proteinkomponente, die hier alle unspezifischen, potentiellen Bindungsstellen für die sich anschließende Detektion überdeckt und somit eine spezifische Bindung der Fluorochrom-Antikörper oder Fluorochrom-Avidin Konjugate ermöglicht.

- Auf die gewaschenen, Sonden-markierten Chromosomenpräparate werden pro Objektträger 200µl Blockierungspuffer pipettiert und mit einem großen Deckgläschen luftblasenfrei abgedeckt. Die Objektträger werden im Anschluß in einer feuchten Kammer bei 37°C für ½ Stunde inkubiert.

3.7.2.3.2 Detektion indirekt markierter DNA

- Die geblockten Präparate werden dem Brutschrank entnommen und das Deckglas entfernt. Auf den noch feuchten Objektträger werden nun 200µl Detektionspuffer (ergänzt mit den entsprechenden Detektionssubstanzen (siehe Kasten S.46 unten) oder, im Fall der CGH, 60µl Detektionsmischung aufpipettiert und wiederum mit einem großen Deckglas abgedeckt. Die Detektion erfolgt innerhalb einer halben bis einer Stunde im Brutschrank bei 37°C.

<u>Blockierungspuffer:</u>
• 4 × SSC • 3% (w/v) Rinderserumalbumin Fraktion V • 0.1% (v/v) Tween 20
<u>Detektionspuffer:</u>
• 1% BSA Fraktion V • 4 × SSC • 0.1% (v/v) TWEEN 20
<u>ergänzt mit:</u>
<u>M-FISH:</u>
○ +1:300 Volumen Avidin-Cy3.5 und ○ +1:200 Volumen Anti-Digoxigenin Cy-5.5
<u>FISH:</u>
○ +1:300 Volumen Avidin-Cy3.5
<u>CGH Detektionsmischung:</u>
• Anti-Digoxigenin-TRITC / Avidin-FITC (Pufferzusammensetzung vom Hersteller nicht publiziert)

- Die mit Detektionslösung eingedeckten Objektträger werden der feuchten Kammer entnommen und für 3 × 5 Minuten lichtgeschützt im 42°C Schüttelwasserbad in Waschlösung C gewaschen.

<u>Waschlösung C:</u>	<u>Endkonzentration</u>	
• 20 × SSC	100 ml	4 × SSC
• A.bidest.	ad 500ml	
• TWEEN 20	500µl	0.1 % (v/v)
pH 7.0 ± 0.02		

- Die Objektträger werden anschließend der Fluorochromwäsche entnommen. Der Objektträger wird, ohne das Präparat trockenfallen zu lassen, von überschüssiger Waschlösung befreit. Es werden dann, in Abhängigkeit der Deckglasgröße 10-20 µl DAPI / Antifade auf das Hybridisierungsareal pipettiert und mit einem Deckglas luftblasenfrei abgedeckt. Um das Präparat vor Austrocknung und vor Scherkräften durch Verschieben des Deckglases zum Objektträger zu schützen, wird das Deckglas mit handelsüblichem Nagellack an den Rändern luftdicht versiegelt und bis zur Mikroskopie bei 4°C dunkel gelagert.

3.7.3 M-FISH

Die Chromosomenseparation mittels Fluoreszenz-aktivierter Zell Sortierung (FACS, „*fluorescence activated cell sorting*“) basiert auf der Einlagerung DNA-interkalierender Farbstoffe in die chromosomale DNA. Die optische Anregung DNA-interkalierter Farbstoffe und die Detektion emittierter Fluoreszenzen erlauben mit geeignet ausgestatteten Sortiermaschinen die chromosomenspezifische Separation der Genombestandteile. Resultat der Separation sind 24 chromosomenspezifische DNA Fraktionen (22 Autosomen, X und Y-Chromosom). Die Zusammenstellung der in dieser Arbeit für die M-FISH verwendeten Chromosomen-„*Pools*“ aus den chromosomenspezifischen Fraktionen erfolgte wie in 3.7.3.2 beschrieben (Eils et al., 1998).

3.7.3.1 Metaphasen -Vorbehandlung

RNase Stammlösung:

- 10mg/ml RNase

RNase Arbeitslösung:

- RNase Stammlösung 10µl
 - 2x SSC 1000µl
- Endkonzentration: 0.1 µg/µl

Pepsin-Stammlösung:

- 10% (w/v) Pepsin in Aqua dest. (Lagerung bei –20 °C bis Verwendung)

Pepsin Arbeitslösung:

- 99ml A.dest + 1ml 1N HCl (pH 2)
- + 8.5µl Pepsin Stammlösung

Hybridisierungspuffer:

- 2 x SSC
- 30% Dextransulfat

Die Metaphase-Präparate werden zur Verbesserung der Hybridisierungsqualität mit RNase und Pepsin vorbehandelt (Lengauer et al., 1992). Dabei werden durch Pepsin noch vorhandene zytoplasmatische Rückstände entfernt. RNA-Reste verursachen bei Detektion Digoxigenin-markierter Nukleotide mit Anti-DIG-Cy5.5 ein starkes Hintergrundsignal. Daher wird durch RNase die noch vorhandene RNA verdaut. Hierzu werden die Metaphasen kurz in 2x SSC hydriert, mit 200µl RNase-Lösung eingedeckt, 1h bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubiert und 3 x 5 min in 2 x SSC bei 37 °C unter Schütteln gewaschen. Anschließend werden die Objektträger mit 200 µl Pepsin-Lösung eingedeckt, 4 bis 10 min bei 37 °C inkubiert, 3x 5 min bei 37 °C mit PBS unter Schütteln gewaschen und final in einer eiskalten Ethanolreihe dehydriert (je 2 min in 70, 80 sowie 100%igen Ethanol). Nachdem die Präparate an der Luft getrocknet sind, erfolgt ihre Denaturierung für 1Minute 45 Sekunden bis 2 Minuten in Denaturierungspuffer bei 70 °C, gefolgt von Dehydrierung in einer aufsteigenden eiskalten Ethanolreihe nach konventionellen FISH Protokoll (vgl. Kap. 3.7.2.2).

3.7.3.2 Sondenherstellung

Die DNA-Menge der zur Verfügung stehenden, unmarkierten Chromosomen-*Pools* ist begrenzt. Daher werden die DNA-Mischungen mittels DOP-PCR repräsentativ amplifiziert.

Tabelle 15: Darstellung der Zusammensetzung der fünf verschiedenen Chromosomen-*Pools*

Chromosomen-„Pools“:

FITC-Pool:	Chromosom 1, 4, 6, 8, 9, 11, 13, 16, 18, 21, Y
Cy3-Pool:	Chromosom 3, 5, 8, 9, 11, 13, 15, 19, 20, 22, X
Biotin (Cy3.5)-Pool:	Chromosom 1, 3, 4, 7, 10, 11, 15, 17, 19, Y
Cy5-Pool:	Chromosom 1, 5, 6, 7, 8, 12, 14, 15, 16, 22
DIG (Cy5.5)-Pool:	Chromosom 2, 3, 5, 6, 9, 10, 12, 21, X, Y

Hierzu wird für jede der fünf DNA Mischungen folgender PCR-Ansatz gewählt:

Tabelle 16: DOP-PCR Pipettierschema zur genomischen Amplifikation geringer Ausgangsmengen

	Einfachansatz	6-fach Ansatz	Endkonzentration
DNA-Mischung	1µl	1µl	~100-150ng
10 fach PCR-Puffer	2,5µl	15µl	1x
5mM dNTPs (ATCG)	1µl	6µl	0.2mM
MgCl ₂ (50mM)	1µl	6µl	2mM
MW6 DOP-Primer 100µM	0.5µl	3µl	2µM
ddH ₂ O	18,8	112.8µl	
Taq-Pol (INVITROGEN)	0.2µl	1.2µl	1U

- Die Herstellung der zweiten Generation von DNA-Pools erfolgte mit folgendem Protokoll. In einem ersten Amplifikationsschritt bei niedrig stringenten Bedingungen (30 °C) werden in großer Zahl Primer-Anlagerungen zugelassen. Die nachfolgende stringente PCR (62 °C) erlaubt dann nur noch die exponentielle Vermehrung bereits amplifiziert vorliegender DNA (Telenius et al., 1992b).

Tabelle 17: DOP-PCR Programm nach (Telenius et al., 1992b)

94 °C	3 Minuten	5 Zyklen
94 °C	1 Minute	
30 °C	1.5 Minuten	
30 °C-72 °C	Anstieg in 3 Minuten	
94 °C	1 Minute	35 Zyklen
62 °C	1 Minute	
72 °C	3 Minuten +1s / Zyklus	
72 °C	10 Minuten	
4 °C	∞	

- Für die genomische Vervielfältigung der dritten Generation von DNA-Pools wird ein vereinfachtes DOP-PCR Protokoll verwendet, das auf eine Temperatur-Rampe verzichtet und hierdurch die Komplexität der DNA nicht beeinträchtigt:

94 °C	3 Minuten	35 Zyklen
94 °C	1 Minute	
56 °C	1 Minute	
72 °C	4 Minuten	
72 °C	20 Minuten	

- Die Markierung der fünf DNA-Pools entweder mit Fluorochrom- oder Hapten-markierten Nukleotiden erfolgt ebenfalls mittels des oben angegebenen, vereinfachten DOP-PCR Protokolls.

Markierung mit FITC-dCTP				Markierung mit DIG-dUTP oder Cy5-dUTP				Markierung mit Biotin dUTP oder Cy3-dUTP			
	1-fach	5-fach	Endkonz.		1-fach	5-fach	Endkonz.		1-fach	5-fach	Endkonz.
10x PCR-Puffer	2.5µl	12.5µl	1x	10x PCR-Puffer	2.5µl	12.5µl	1x	10x PCR-Puffer	2.5µl	12.5µl	1x
50mM MgCl ₂	1µl	5µl	2mM	50mM MgCl ₂	1µl	5µl	2mM	50mM MgCl ₂	1µl	5µl	2mM
5mM AGT	1µl	5µl	0.2mM	5mM ACG	1µl	5µl	0.2mM	5mM ACG	1µl	5µl	0.2mM
5mM C	0.5µl	2.5µl	0.1mM	5mM T	0.5µl	2.5µl	0.1mM	5mM T	0.75µl	3.75µl	0.15mM
1mM Fluo-NTP	2.5µl	12.5µl	0.1mM	1mM Fluo-NTP	2.5µl	12.5µl	0.1mM	1mM Fluo-NTP	1.25µl	6.25µl	0.05mM
100µM DOP-Primer	0.5µl	2.5µl	2µM	100µM DOP-Primer	0.5µl	2.5µl	2µM	100µM DOP-Primer	0.5µl	2.5µl	2µM
ddH ₂ O	15.8µl	79µl		ddH ₂ O	15.8µl	84µl		ddH ₂ O	16.8µl	84µl	
Taq-Pol	0.2µl	1µl	1U	Taq-Pol	0.2µl	1µl	1U	Taq-Pol	0.2µl	1µl	1U
DNA-Pool	1µl	5µl		DNA-Pool	1µl	5µl		DNA-Pool	1µl	5µl	

- Es schließt sich die Fragmentlängenbestimmung der PCR-Produkte auf einem einprozentigen Agarose-Gel an. Hierzu werden 3µl des Markierungsansatzes verwendet. Die Fragmente sollen sich zwischen 200 und 600bp auftrennen. Trennen die Fragmente zu groß auf, so muß ein DNaseI Verdau nachgeschaltet werden. Bei optimaler Fragmentlänge werden die nun markierten DNA-Pools zur Hybridisierung wie folgt zusammen mit Suppressions-DNA (c₀t1) und hochmolekularer Lachssperma-DNA gefällt:

Sonde	c ₀ t1	Lachs DNA	Σ	3M NaOAc	Ethanol
Bio-Pool	11µl				
DIG-Pool	22µl				
Cy3-Pool	18µl	40µl	5µl	144µl	15µl
Cy5-Pool	24µl				400µl
FITC-Pool	24µl				

- Die gefällte DNA-Mischung wird dann mit 30µl deionisiertem Formamid versetzt und für eine halbe Stunde bei 37 °C im Schüttler gelöst. In Folge wird der Hybridisierungs-Mix mit 30µl 4xSSC / 30% Dextransulfat versetzt und mindestens weitere 30 Minuten auf dem Schüttler belassen.

- Die markierte und aus den fünf DNA *Pools* kombinierte DNA wird für 7min bei 75 °C denaturiert und 30 min bei 42°C prähybridisiert. Die erhöhte Prähybridisierungstemperatur erklärt sich aufgrund der höheren Viskosität der M-FISH Sonde gegenüber konventionellen FISH- und CGH-Sonden. Pro denaturiertem Objektträger (vgl. Kap. 3.7.3.1) werden 8.5 µl denaturierte DNA aufgetragen. Es wird jeweils mit einem 18 x 18 mm Deckgläschen eingedeckt, mit Fixogum versiegelt und zur Hybridisierung zwei Tage in einer feuchten Kammer bei 37 °C inkubiert.
- Die Behandlung der hybridisierten Objektträger und die Detektion der indirekt markierten Sonden erfolgt analog des konventionellen FISH Protokolls (vgl. Kap. 3.7.2.3). Aufgrund direkt markierter DNA ist bei der Behandlung von M-FISH Präparaten darauf zu achten, daß alle Schritte nach der Hybridisierung möglichst lichtgeschützt durchgeführt werden.

3.7.3.3 Auswertung der M-FISH

Die Bilderfassung erfolgt mit eine hochauflösenden, gekühlten CCD („charge coupled device“)-Kamera Sensys (PHOTOMETRICS, Tucson, Arizona). Die Kühlung des CCD-Chips ist notwendig zur Erfassung der nahe infraroten bis infraroten Emission der Fluorochrome Cy5 und Cy5.5 (siehe Tabelle 18). Kamera und Leica DMRXA-Mikroskop werden gesteuert von der Leica Q-FISH Software Version Y2.3.1.beta (Leica, Cambridge, England) die in einer Windows-Umgebung auf einem Standard PC installiert ist. Das Leica DM RXARF8-Mikroskop ist mit einem automatischen acht Positionen Filterrad ausgestattet, so daß für jedes in der M-FISH eingesetzten Fluorochrome ein separater Anregungs- und Emissionsfilter sowie Strahlteiler zur Verfügung steht. Die Bildanalyse ist in die Leica MCK (*Multi colour karyotyping*) Software eingebunden. Erst durch eine im Rechner abgelegte Farbkode-Tabelle wird eine automatisierte Analyse der spektralen Charakteristika einzelner Chromosomen möglich.

Tabelle 18: Optische Charakteristika der verbauten Filterblöcke. Aus (Eils et al., 1998)

Komponente	DAPI	FITC	Cy3	Cy3.5	Cy5	Cy5.5	Cy7
Anregungsfilter	360±20nm	475±15nm	564±5.5nm	580±5nm	602±19nm	682±6nm	740±17.5nm
Strahlteiler	400nm	497nm	557nm	593nm	647nm	697nm	765nm
Emmissionsfilter	460±20nm	522±20nm	567±7.5nm	612±15nm	667±15nm	720±20nm	790±20

3.7.4 Auswertung der Hybridisierung mit digitaler Bildbearbeitung

Der überwiegende Teil der Auswertungen dieser Arbeit erfolgte auf einem Leica DM RBE Fluoreszenz-Forschungsmikroskop mit 63x Plan APO und 100x Fluoreszenz-Objektiven und 100W Quecksilberdampf-UV-Lampe (OSRAM HBO100/W) sowie dem angeschlossenen Bilderfassungssystem (Hersteller: Applied Imaging Corp., USA). Zur Auswertung der FISH und CGH Analysen wurde das Analyseprogramm CYTOVISION Version 3.1 (Applied Imaging Corp., USA) verwendet. Die Steuerung der Anregungswellenlänge erfolgt über das Rechnersystem und ein angeschlossenes Filterrad. Die Bilderfassung übernimmt eine KOHU-Graustufen CCD-(charge coupled device) Videokamera. Strahlteiler und Emmisionsfilter befinden sich im Mikroskop. Benutzt wurden die Filter DAPI, TRITC, FITC, FITC/TRITC und DAPI/FITC/TRITC. Aufgrund eines breitbandigen Emmissionsfilters konnten alle angeregten Wellenlängen mit diesem Filter erfasst werden. Die Dokumentation erfolgt über einen Thermosublimations-Farbdrucker Mitsubishi S-3600-30D. Die Sicherung der anfallenden Daten erfolgt auf magneto-optischen Medien.

3.7.4.1 Besonderheiten im CGH Modus

Im Anschluß der Aufnahme jeder einzelnen Metaphase ermittelt das System eine Reihe von Bildparametern, die mit Referenzwerten einer internen Datenbank verglichen werden . Bei Abweichung von den im Programm abgelegten Referenz-Parametern, wird das System die Metaphase als ungeeignet zur CGH-Analyse kennzeichnen.

Diese Form der Qualitätskontrolle ist für die bei der CGH zugrundeliegende, quantitative Messung von Fluoreszenz-Signalen notwendig (du Manoir et al., 1995; Piper et al., 1995; Lundsteen et al., 1995). Nach der Auswahl aller für die CGH-Analyse in Frage kommenden Metaphasen schließt sich die Karyotypisierung der Metaphasen an.

Die Software bedient sich bei der halbautomatischen Karyotypisierung dem Invertbild der DAPI-Graustufenaufnahme. Die Invertdarstellung weist ein der GTG-Bandierung (Giemsa-Bandierung durch Trypsin) ähnliches Bandenmuster auf.

Das Rechnersystem berechnet nach der Karyotypisierung das Fluoreszenzprofil für jedes Chromosom und verrechnet es mit den Profilen der zuvor klassifizierten Chromosomen zu einem Ratio-Profil. Hierzu müssen die in unterschiedlichen Kondensationsstadien aufgenommenen Chromosomen durch die Software auf eine einheitliche Länge gebracht werden

4 Ergebnisse

4.1 CGH Untersuchungen

Im Verlauf dieser Arbeit wurden 91 primäre Nierentumoren vier unterschiedlicher histopathologischer Subtypen sowie 6 Zelllinien mit vergleichender genomischer Hybridisierung (CGH = „*comparative genomic hybridization*“) untersucht.

4.1.1 Klarzellige Nierenkarzinome

46 primäre klarzellige Nierenkarzinome wurden untersucht (Störkel et al., 1997). Das Patientenalter am Operationstag lag zwischen 31 und 90 Jahren, mit einem Altersmedian von 62 Jahren. Das Kollektiv setzte sich aus 28 Männern und 18 Frauen zusammen. Von allen Patienten liegen pathologische Bewertungen des Tumorstadiums und des Differenzierungsgrades des Tumors zum Zeitpunkt der Operation vor. Die Tumorgroße variierte zwischen 3 bis 13.5 cm mit einer durchschnittlichen Tumorgroße von 6.8 cm.

4.1.1.1 Genomische Imbalanzen

Innerhalb der Gruppe der klarzelligen Nierenkarzinome (kzNZK) wurde als prominenteste Aberration (mit 63% aller untersuchten Tumoren) der Komplet- oder Teilverlust (im Besonderen des kurzen Armes) von Chromosom 3 nachgewiesen. In absteigender Häufigkeit fanden sich dann die Verluste der Chromosomen 14 (30%) und 9 (26%), Chromosom 1 und 6 (zu je 17%), 4 und 8 (je 15%), Chromosom 22 (11%), Chromsom 2 und 19 (jeweils 9%) sowie Chromosom 7q, 10, 16, 17, 18 und Y (7%). Schließlich konnten die Chromsomen 5, 11, 13, 15, und 21 (jeweils zu 4%) als im Tumorgewebe unterrepräsentiert identifiziert werden.

Als häufigste chromosomalen Zugewinne im Tumorgewebe waren die Chromosomen 5 (63%), 7 (35%), 1q (33%) 2q (24%), 8q, 12 und 20 (jeweils 20%), 3 (17%), 16 (15%), , 19 (13%), 6, 17 (11%) sowie die Chromosomen 4, 10, 11, 21 und Y mit jeweils 9 % zu verzeichnen. Die Imbalanzen sind zur besseren Übersichtlichkeit im Folgenden tabellarisch sowie grafisch dargestellt.

Tabelle 19: Chromosomale Zugewinne und Verluste in klarzelligen Nierenkarzinomen (kzNZK) entsprechend „An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN 1995)“ mit klinischen und pathologischen Parametern Differenzierungsgrad und Tumorstadium (rev ish= „reverse in-situ hybridization“; enh / dim = „enhanced“=zugewonnen / „diminished“=verloren; n.i.=keine Imbalancen identifiziert; M = Mann; F = Frau).

Tumor- Nummer	Kopienzugewinne	Kopienverluste	Alter bei OP [Jahre]	Tumor- durch- messer [cm]	Grad	T	N	M	Geschlecht
561	Rev ish enh (1q, 2, 5q21q35, 7, 8p21q24.3, 12, 20)	rev ish dim (3, 9, 14)	60	8,5	2	1	0	x	F
583	Rev ish enh (2, 5, 18)	rev ish dim (1p31p36.3, 3p, 4, 8, 9, 10q23q26, 14, 22)	55	12	2	3b	x	x	F
587	Rev ish enh (1q, X)	rev ish dim (3p, 6q21q27, 16q)	75	5,5	3	1	x	x	F
589	Rev ish enh (5p, 7, 12, 17q22q25)	rev ish dim (3p, 4q24q35, 13q11q31, 14, 17p)	70	7	3	3b	x	x	M
603	Rev ish enh (4q22q28, 5q, 12q11q22, 16p12q24.3, 20, 21)	n.i.	66	10	2	3°	x	x	M
611	Rev ish enh (4q26q28, 7, 21)	rev ish dim (3p26q13.3, 5q21q23, 6q24q27)	62	4,5	1	1	x	x	M
615	Rev ish enh (1q, 3q, 5q21q23, 8q)	n.i.	74	5,5	3	3°	x	x	M
102	Rev ish enh (2q, 5)	rev ish dim (3p, 7q32q36, 9)	83	5	3	1	x	x	F
114	Rev ish enh (3q24q26.3, 5p13q22, 6q11q22, 13q22q31)	rev ish dim (1p32p36.3, 1q22, 1q41q44, 2p23p25, 9p, 16p, 18p11.3, 19q)	55	5	1	1	x	x	F
116	n.i.	rev ish dim (3p, 9q, 10q, 11q, 12q, 14q, 22q13)	58	6,5	3	3a	1	x	M
24	Rev ish enh (2q24q34)	n.i.	62	3	2	1	x	x	M
29	Rev ish enh (1q, 2q24q34, 5q23q35, 7, 8q21.3q22)	rev ish dim (6q)	45	7	2	1	x	x	M
70	Rev ish enh (1q, 5q, 7, 8q, 11, 12, 19, 20, 21)	rev ish dim (1p33p11, 3, 8p)	75	6,5	2	1	x	x	M
76	Rev ish enh (5, 7, 20)	n.i.	59	4	2	1	x	x	M
78	n.i.	n.i.	70	11	2	3b	0	x	M
80	Rev ish enh (5, 7, 16)	rev ish dim (8, 14)	50	7	2	1	x	x	M
86	rev ish enh (1q, 2, 3q, 5q13q35, 5p14p15.2, 6, 7p22q31, 8q22q24.1, 10q, 11, 12q13q24.1, 13q21.3q31, 15q, 17q21, 18q11.2q21)	rev ish dim (1p32p36.3, 3p14p26, 4, 7q34q36, 8p, 9, 14q, 21q)	65	12,5	2	2	x	x	M
96	Rev ish enh (1p34.2q44, 5, 12p)	rev ish dim (2q34q37, 3p26q24, 4, 14)	62	6,3	2	2	x	1	M
134	Rev ish enh (Xq22q28)	rev ish dim (3p14p26)	44	11	2	3b	x	x	M
138	Rev ish enh (1p33p36.3, 5q23q35, 7, 19, 20q, 21, 22)	rev ish dim (3p, Y)	57	5	2	1	x	x	M
142	Rev ish enh (5)	rev ish dim (3p, 3q13.3q23, 22q13)	63	6	2	1	x	x	F
164	Rev ish enh (2p25q32, 3q11q29, 5q22q35, 7q21q36, 8q, 16)	rev ish dim (3p12p26, 8p, 9, 10, 13, 14, 15, 17p, 18, 19)	69	13	2	2	1	x	F
172	Rev ish enh (8, 10, 11p15q22, 12q11q23)	n.i.	76	13,5	4	3°	x	x	M
200	Rev ish enh (1q, 3q13.3q24, 10, 17, 19)	rev ish dim (3p22p26, 3p12, 4)	76	7	3	3b	0	0	M
400	Rev ish enh (5)	rev ish dim (2q36q37, 3p)	64	10	1	2	0	x	F
493	Rev ish enh (5, 9p)	rev ish dim (3p, 6p23p25, 6q21q27, 9q)	65	6,5	3	1	x	x	F
495	Rev ish enh (5q31q35, 19p, 20q12q13.3, Y)	rev ish dim (3p, 3q11.1q13.3, 6q22q27, 9, 14q, 15q12q21)	68	6	2	3b	0	x	M
499	Rev ish enh (1, 2, 4q23q35, 5, 7, 8q24.1q24.3, 9q, 12, 13q, 15, 16, 17, 19, 20)	rev ish dim (3p24p26, 6, 9p22p24)	71	7,5	2	3a	0	x	F
503	Rev ish enh (7, Xq26q28)	rev ish dim (3p21p26)	84	4	2	1	x	x	M
507	Rev ish enh (5)	rev ish dim (3p26q13.3)	37	11	1	2	x	x	M
509	Rev ish enh (1q21q23, 4q28q35, 5q31q35)	rev ish dim (3p21 3p26, 7q31 7q36)	31	5,5	2	1	x	x	F
511	n.i.	n.i.	65	8	2	2	0	x	M
759	Rev ish enh (2, 3, 5, 7, 8, 11, 12, 16, 17, 19, 20)	n.i.	69	4,3	2	1	0	x	F
533	Rev ish enh (2q36q37, 7q32q36)	rev ish dim (3p21p26)	63	4	1	1	x	x	F
673	Rev ish enh (5q23q35)	rev ish dim (3p14p26, Y)	44	6,5	2	1	x	x	M
677	Rev ish enh (3q, 5, 7, 12, 16)	rev ish dim (1p36.1p36.3, 4q, 9, 14q31q32)	55	12	3	3b	0	x	M
707	Rev ish enh (1q21q41, 2q24q33, 6p, 7, 8q21.1qter, 9p13q34, 10q, 16p, 17q, 19, 20q)	rev ish dim (3p14p26, 4p15.1p16, 4q, 5p15.1p15.3, 8p23q13, 9p21p24, 14q, 17p, 18, Y)	38	7,5	3	3b	0	x	M
727	Rev ish enh (5q)	rev ish dim (3p22p26)	72	4,5	2	1	x	x	F
741	Rev ish enh (3p, 6p)	rev ish dim (6q)	87	7	3	3a	0	x	F
763	Rev ish enh (5, 7, 11, 16, 20)	n.i.	66	5	2	1	0	x	M
773	Rev ish enh (5p13q32, 6p21.1q24)	rev ish dim (19)	54	6,3	2	3b	0	x	M
775	n.i.	rev ish dim (1q21, 16p, 19, 22)	82	5	3	3a	2	x	F
777	Rev ish enh (1q21, 3q12q21, Y, X)	rev ish dim (1p31p36.3, 2q34q37, 3p21p26, 14q24, 22q13)	81	6	2	1	0	x	M
783	Rev ish enh (1, 5, 22q13)	rev ish dim (3p13p26, 6q13q27, 14q, 21q)	78	4,5	2	1	x	x	F
785	Rev ish enh (1q23q44, 2q14.1q33, 5p15.3q23)	rev ish dim (1p, 3p26q24, 3q27q29, 8p, 11p, 14q22q32)	88	8	2	3	0	x	M
793	n.i.	n.i.	90	5,5	3	3	x	x	F

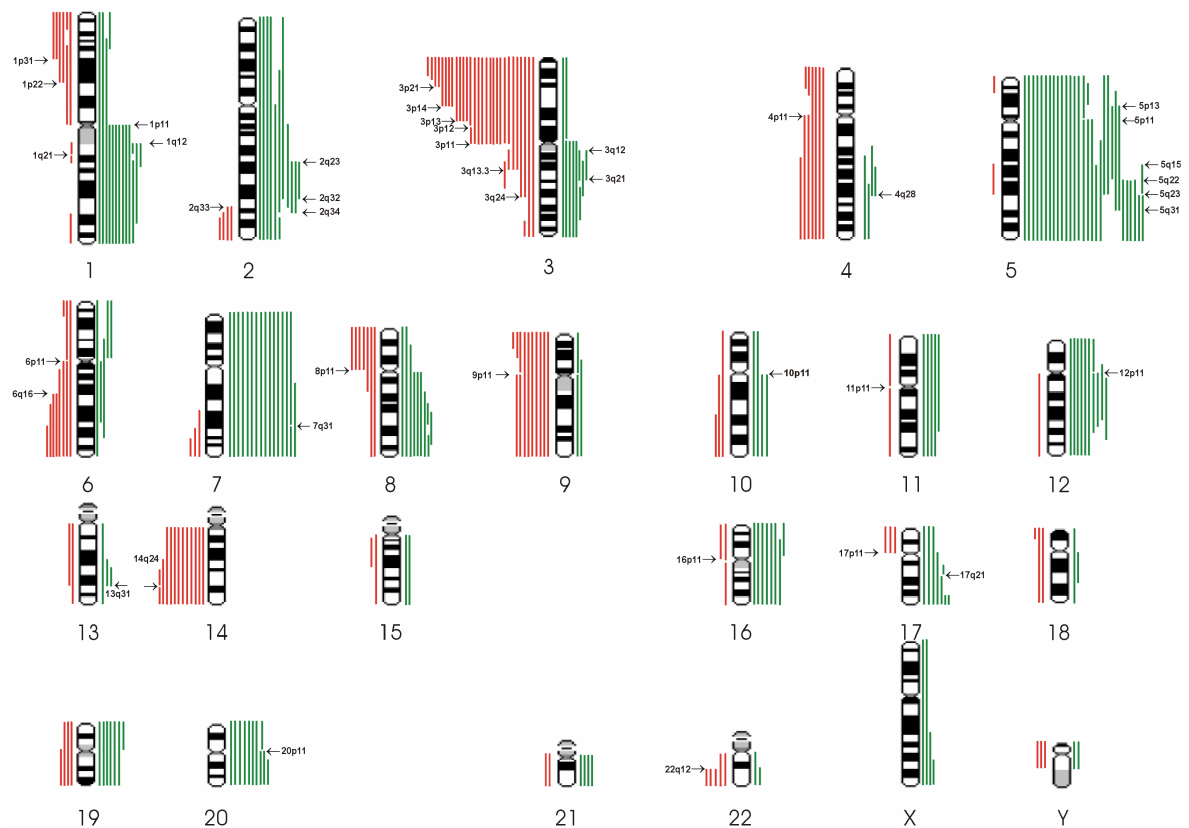


Abbildung 5: Zusammenfassende Darstellung der mittels CGH in 46 klarzelligen Nierenkarzinomen beobachteten Genomimbilanzen. Jeder Balken gibt die in einem Tumor beobachtete Über- oder Unterrepräsentation genetischen Materials an: rot zeigt einen Verlust, grün einen Zugewinn an. Am häufigsten fanden sich Verluste verschiedener 3p Regionen und der Chromosomen 14, 9 und 4, sowie Zugewinne der Chromosomen 5, 7, 12, 16 und 20. Pfeile geben die Bruchpunktregionen an, die in mindestens zwei unabhängigen Fällen gefunden wurden. Aus (Reutzel et al., 2001)

4.1.1.2 Lokalisierung von Bruchpunktregionen

Die in Abbildung 5 dargestellten Verluste und Zugewinne zeigen, dass sich, neben numerischen Veränderungen, Bruchpunkte an definierten Chromosomenabschnitten häufen. Weicht die Fluoreszenz-Ratio vom Normalwert ($1:1=1$) ab oder findet ein Vorzeichenwechsel des Fluoreszenzquotienten statt, muß ein Bruchereignis gefolgert werden. Eine wenigstens in zwei unabhängigen Tumoren an identischer Stelle festgestellte Auffälligkeit des Fluoreszenzquotienten wird in dieser Arbeit als Bruchregionhäufung gewertet. Auffallend ist, dass derartige Häufungen oft in Zentromerregionen der Chromosomen lokalisieren, die sich hauptsächlich aus repetitiver Satelliten-DNA konstituieren. Hervorzuheben sind hier die Bruchpunktregionen in den Zentromeren der Chromosomen 1, 3, 8 und 17.

4.1.1.3 Korrelation pathologischer Parameter mit Imbalanzen

Zu allen untersuchten klarzelligen Karzinomen lagen pathologische Daten und Patientendaten vor. Es zeigte sich, dass spezifische Imbalanzen mit bestimmten Parametern assoziiert sind (Reutzel et al., 2001). Im Einzelnen korrelierte der Zugewinn von Chromosom 10 signifikant mit fortgeschrittener Dedifferenzierung des Tumors ($p=0.0044$). Der Zugewinn des Chromosoms 17 korrelierte ebenfalls mit hohem Entdifferenzierungsgrad, die Signifikanz war hier im Vergleich zu Chromosom 10 sogar höher ($p=0.0182$). Der Zugewinn des Chromosoms korrelierte signifikant mit guter Differenzierung des entsprechenden Tumorgewebes ($p=0.0441$). Außerdem konnte ein spätes Tumorstadium mit dem Verlust des Chromosoms 4 ($p=0.0326$) assoziiert werden. Dem entgegen konnten Geschlecht, Alter des Patienten, Lateralität und Tumorgröße nicht mit chromosomalen Imbalanzen in Verbindung gebracht werden.

Tabelle 20: Kontingenztabelle zur Korrelation pathologischer Parameter. Die Berechnung der p-Werte erfolgte mit dem Fisher's Exact Test. Abgebildet sind Korrelationen chromosomaler Imbalanzen mit pathologischen Parametern. G=Tumorgrad; S=Tumorstadium (Guinan et al., 1997; Goldstein, 1997).

	Zugewinn Chromosom 10	Kein Zugewinn Chromosom 10
G1/G2	0 (0%)	33 (100%)
G3/G4	4 (31%)	9 (69%)
	$p=0.0044$	

	Zugewinn Chromosom 5	Kein Zugewinn Chromosom 5
G1/G2	24 (73%)	9 (27%)
G3/G4	5 (38%)	8 (62%)
	$p=0.0441$	

	Zugewinn Chromosom 17	kein Zugewinn Chromosom 17
G1/G2	1 (3%)	32 (97%)
G3/G4	4 (31%)	9 (69%)
	$p=0.0182$	

	Verlust Chromosom 4	kein Verlust Chromosom 4
SI/SII	1 (4%)	25 (96%)
SIII/SIV	6 (30%)	14 (70%)
	$p=0.0326$	

Eine Korrelation eines Chromosom 14 Verlustes mit hohem Grad oder Stadium des Nierenkarzinoms wie von Beroud et al. vorgestellt (Beroud et al., 1996) konnte anhand der CGH Daten nicht bestätigt werden.

4.1.1.4 Korrelation klinischer Parameter mit Imbalanzen

Setzt man das Gesamtüberleben mit den gefundenen Alterationen in Beziehung, so wurde der Zugewinn des Chromosoms 8q mit einer hochsignifikant schlechteren Überlebenswahrscheinlichkeit als in der Vergleichsgruppe ohne Chromosom 8 Zugewinn gefunden (Logranktest: $p<0.0001$). Zehn Patienten erlitten einen Krankheitsrückfall in Form von Lokalrezidiven oder Metastasen. Vier Patienten entwickelten erneut Nierenzellkarzinome. Metastasebildung und ungünstiger Krankheitsverlauf korrelierten erwartungsgemäß ($p=0.0515$). Eine drastische Prognosedifferenz der beider Gruppen (mit/ohne Metastase) war erst nach 5-jährigen Beobachtungszeitraum festzustellen.

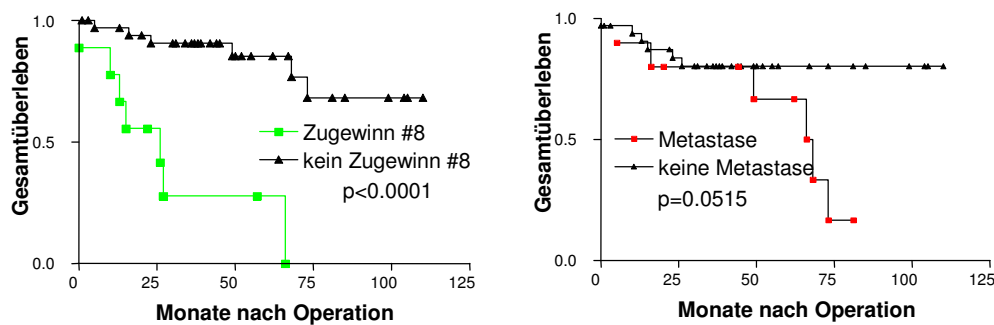


Abbildung 6: Kaplan-Meier Überlebenskurve der beiden Patientenkollektive (Kaplan und Meier, 1999). Die schlechtere Überlebenswahrscheinlichkeit der Gruppe mit Chromosom 8 Zugewinn wird deutlich. Der Logranktest beider Kurven belegte einen signifikanten Unterschied ($p < 0.0001$). Metastasierung korreliert mit ungünstiger Prognose ($p = 0.0515$). # = Chromosom Nummer.

4.1.2 Papilläre Nierenkarzinome

15 papilläre Nierenkarzinome (Störkel et al., 1997) wurden untersucht. Das Patientenalter zur Zeit der Operation variierte zwischen 29 und 81 Jahren mit einem Altersmedian von 58 Jahren. Dabei unterschreitet er deutlich den Altersmedian der untersuchten Patienten mit klarzelligen Nierenkarzinom (62 Jahre). Das Patientenkollektiv setzte sich aus 11 Männern und 4 Frauen zusammen. Die Tumorgößen variierten zwischen 2.5 und 12 cm mit einer durchschnittlichen Tumorgöße von 5.3 cm, die damit ebenfalls unter der der untersuchten klarzelligen Karzinome liegt. Die unterschiedlichen Durchschnittswerte von Tumorgöße und Patientenalter erreichen keine Signifikanz, was wahrscheinlich auf die geringe Fallzahl der untersuchten papillären Karzinome zurückzuführen ist.

4.1.2.1 Genomische Imbalancen

Papilläre Nierenkarzinome (pNZK) unterscheiden sich deutlich vom Profil klarzelliger Nierenkarzinome. Auffällig ist hier vor allem die Repräsentation des Chromosoms 3. An Stelle der Chromosom 3 Verluste wie sie im klarzelligen NZK auftreten, sind beim papillären Karzinom kombinierte Zugewinne der Chromosomen 3, 7, 12 (kleinste gemeinsame Überlappung 12q24.1-q24.3), 16, 17 und 20 zu beobachten. Strukturelle Anomalien, resultierend aus einem Bruchereignis mit anschließendem Zugewinn oder Verlust betroffener Chromosomenanteile, sind bei diesem Subtyp deutlich seltener zu finden als beim klarzelligen Subtyp. In einem Fall eines papillären Nierenkarzinoms überstieg der Wert des Fluoreszenzquotienten in vier Bereichen den Fluoreszenzquotienten von 1.5. Der Fluoreszenzquotient der Chromosomenregion 2q22-q33 wurde daher als stark zugewonnen definiert. Die Chromosomenarme 16q, 17y und das X-Chromosom überschritten den Quotienten 2.0 und wurden daher als amplifiziert definiert (Reutzel et al., 2001).

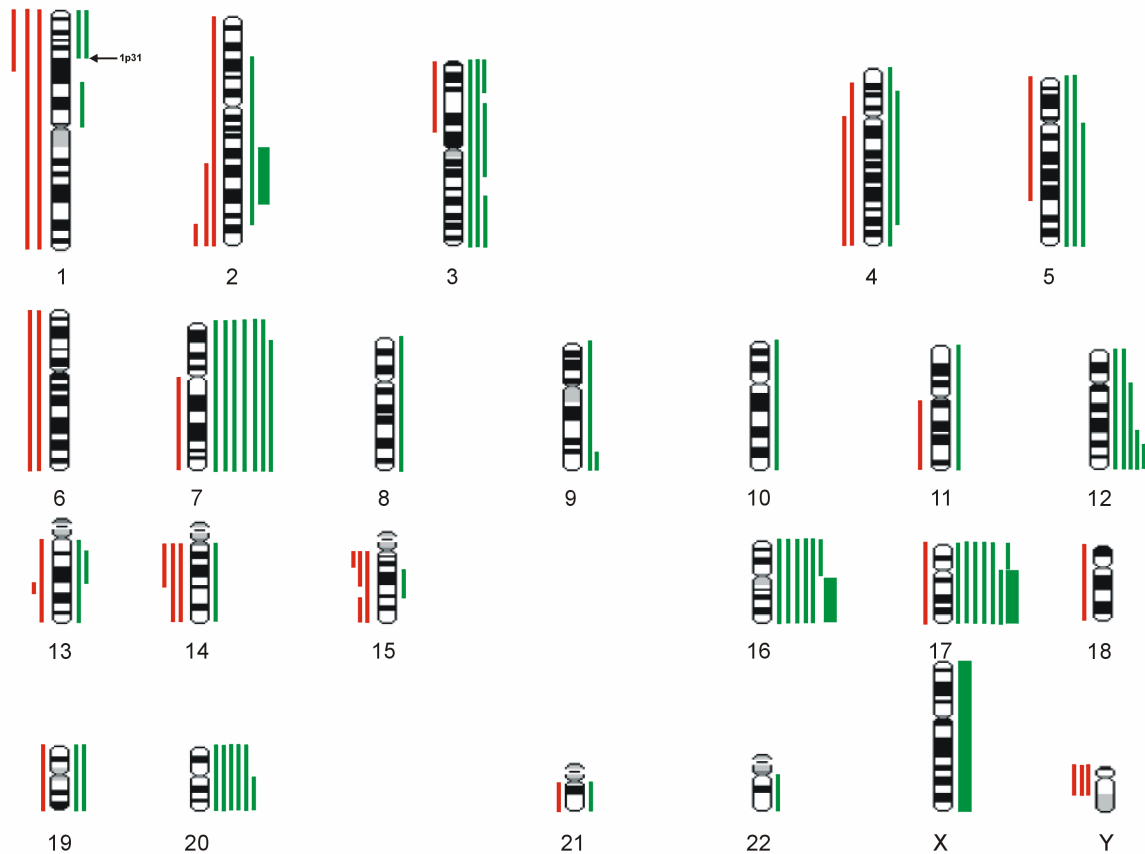


Abbildung 7: Zusammenfassende Darstellung der mittels CGH in 15 papillären Nierenkarzinomen beobachteten Genomimbilanzen. Jeder Balken gibt die in einem Tumor beobachtete Über- oder Unterrepräsentation genetischen Materials an: rot zeigt einen Verlust, grün einen Zugewinn an. Pfeile geben die Bruchpunktregionen an, die in mindestens zwei unabhängigen Fällen gefunden wurden. Auffallend sind die Zugewinne der Chromosomen 7, 12 (12q24.1-q24.3), 16, 17 und 20. Die Region des Chromosoms 2, in der der Fluoreszenzquotient den Schwellenwert 1.5 überschritt; wurde als stark zugewonnen definiert. Der Fluoreszenzquotient der Chromosomenarme 16q, 17q sowie des X-Chromosoms überschritt den Quotienten 2.0 und erfüllte daher die Kriterien einer Amplifikation (Dohna et al., 2000). Derart stark zugewonnene Chromosomenregionen sind mit einem breit gezeichneten, grünen Balken abgebildet. Aus (Reutzel et al., 2001).

Tabelle 21: Chromosomale Zugewinne und Verluste in papillären Nierenkarzinomen (pNZK) entsprechend ISCN 1995 „*An International System for Human Cytogenetic Nomenclature*“ mit klinischen und pathologischen Daten Differenzierungsgrad und Tumorstadium (rev ish= „*reverse in-situ hybridization*“; enh / dim = „*enhanced*“ / „*diminished*“; n.i.=keine Imbalanzen identifiziert; M = Mann; F = Frau).

Tumor Nummer	Kopien Zugewinne	Kopien Verluste	Alter bei OP [Jahre]	Tumor Durchmesser [cm]	Grad	T	N	M	Geschlecht
565	rev ish enh (3, 4, 5, 7, 9, 11, 14, 16, 19, 20)	rev ish dim (1, 2, 6, 13, 17, 21)	53	6,5	3	3a	x	x	M
569	rev ish enh (5q, 7)	rev ish dim (3p13p26)	52	3,7	1	1	x	x	M
613	rev ish enh (7, 17q)	n.i.	65	7,5	3	3	x	x	M
627	rev ish enh (12)	rev ish dim (1, 14, 15, Y)	70	8,5	2	2	x	x	M
639	rev ish enh (7, 16, 21)	n.i.	61	3,2	2	1	x	x	F
82	rev ish enh (3q24q29, 12q22q24.3, 16, 17, 20)	rev ish dim (14q)	81	4	2	1	x	x	F
84	rev ish enh (7p15q36, 12q, 17, 20)	n.i.	62	3,2	2	1	x	x	M
88	rev ish enh (1p32p36.3, 17)	n.i.	45	5	1	1	x	x	M
140	rev ish enh (3, 7, 10, 12, 13, 16, 17, 20)	rev ish dim (4q, 5p15.3q23, Y)	51	6,5	3	1	x	x	M
156	rev ish enh (1p11p22, 3p22p26, 3p21.2q13.3, 16)	rev ish dim (1p31.3p36.3, 6, 11q, 14q11.2q24.1, 15q11.1q14, Y)	62	6	3	3	2	x	M
273	rev ish enh (7, 17, 20)	n.i.	29	2,5	2	1	x	x	F
276	n.i.	n.i.	49	5,5	3	1	x	x	M
745	rev ish enh (1p32p36, 8, 9q34, 12q24.1q24.3, 15q21q23, 16p, 17p, 19, 20q, 22q) rev ish amp (2q22q33, 16q, 17q, X)	rev ish dim (2q34q37, 4p15.3q35, 7q, 13q22, 15q11.1q21, 15q24q26)	69	5	3	1	0	x	F
789	rev ish enh (2p16q35, 4p15.1q32, 5, 13q14q21)	rev ish dim (18, 19)	49	4,5	2	3	x	x	M
791	n.i.	n.i.	73	12	2	2	0	x	M

4.1.2.2 Lokalisierung von Bruchpunktregionen

Papilläre Karzinome sind gekennzeichnet von überwiegend gesamtschromosomalen Zugewinnen. Lediglich auf Chromosomenbande 1p31 findet sich eine Häufung.

4.1.2.3 Korrelation pathologischer Parameter mit Imbalanzen

Bei papillären Nierenkarzinomen konnte keine signifikante Korrelation pathologischer Parameter (Tumorgrad und –stadium) mit spezifischen Imbalanzen gefunden werden. Zusammenhänge von Imbalanzen mit der Lateralität der Tumoren, Tumorgroße sowie dem Geschlecht oder Alter der Patienten waren gleichfalls nicht feststellbar.

4.1.2.4 Korrelation klinischer Parameter mit Imbalanzen

Das papilläre Nierenkarzinom weist im Gegensatz zum klarzelligen Karzinom der Niere (siehe 4.1.1) hinsichtlich der Chromosom 14 Verluste einen signifikanten Prognoseunterschied auf ($p=0.0361$). Andere beobachtete Chromosomenimbalanzen zeigten bei diesem Subtyp des NZK keine signifikanten Korrelationen mit der Prognose. Ein Wiederauftreten der Erkrankung konnte in fünf Fällen der 15 papillären NZK beobachtet werden. In einem Fall handelte es sich um ein Lokalrezidiv. Die vier verbleibenden Rückfälle bildeten Metastasen in Herzmuskel, Knochen, Lunge bzw. para-aortal aus. Das Überleben der Patienten mit post-operativ wiederauftretenden papillären Nierenkarzinoms variierte von 14 Monaten (Knochenmetastase) bis zu 76 Monaten (Nierenbefall). Wie beim klarzelligen NZK zeigte sich eine ungünstigere Prognose der Patienten mit Metastasierung, der Prognoseunterschied ist hier sogar signifikant ($p=0.0196$). Drei von fünf metastasierenden Tumoren zeigten in ihrem CGH Profil Zugewinne des Chromosoms 3. Aufgrund der niedrigen Fallzahlen erreichte die Korrelation von Metastasierung und dieser Chromosomen-Imbalanz keine Signifikanz.

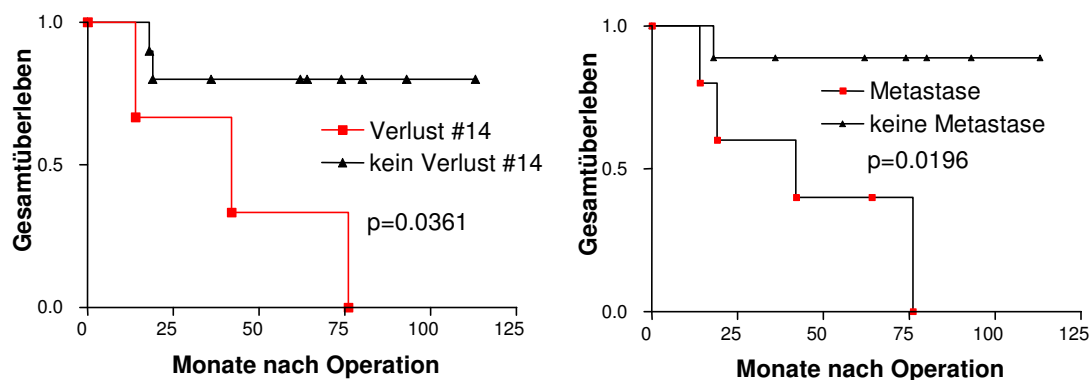


Abbildung 8: Prognosedifferenzen in den mit CGH untersuchten papillären NZK in Abhängigkeit eines Chromosom 14 Verlustes (Logranktest: $p=0.0361$) sowie Darstellung der Prognose in Abhängigkeit einer Metastasierung (Logranktest: $p=0.0196$). # = „Chromosom Nummer“

4.1.3 Chromophobe Nierenkarzinome

14 chromophobe Nierenkarzinome wurden mit CGH untersucht. Der Altersdurchschnitt der Patienten am Tag der Operation lag bei 63 Jahren, die Altersverteilung reichte von 29 bis 86 Jahren. Die Tumorgröße lag im Mittel bei 6.8 cm und reichte von 3 bis 11 cm. Die Geschlechterverteilung war 11/3 (Männer /Frauen).

4.1.3.1 Genomische Imbalancen

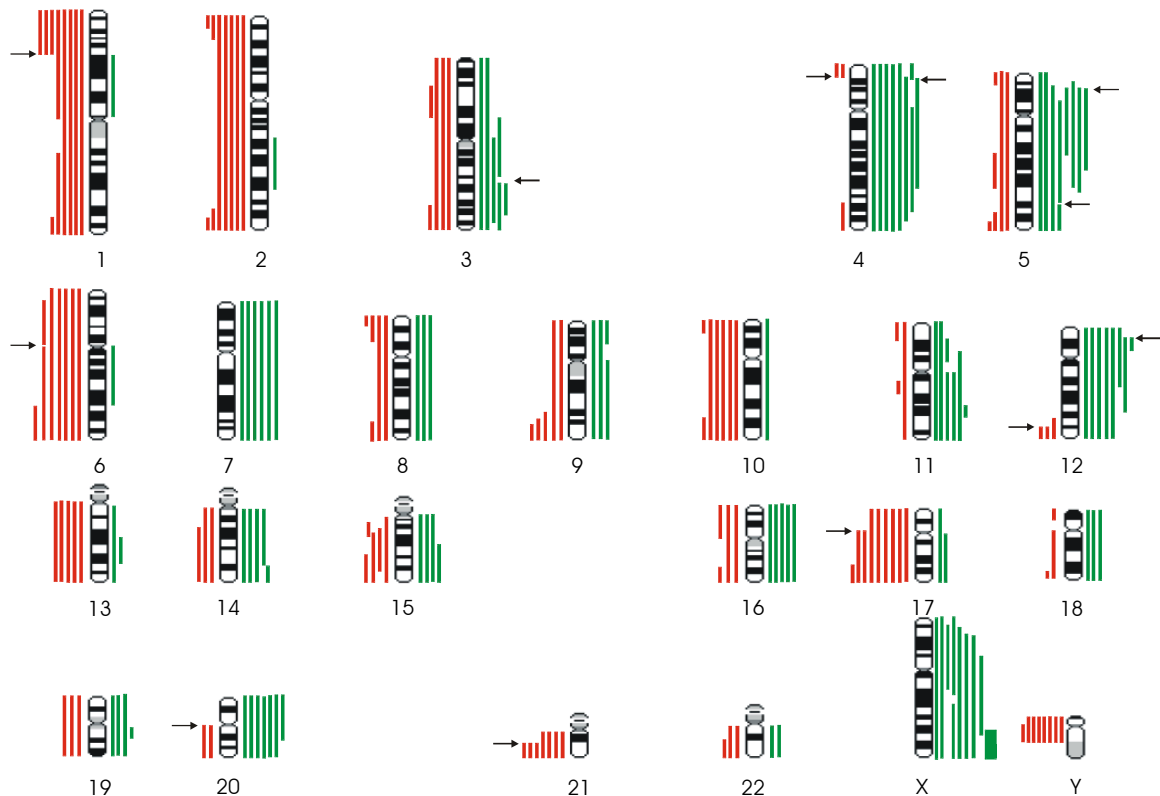


Abbildung 9: Zusammenfassende Darstellung der mittels CGH in 14 chromophoben Nierenkarzinomen beobachteten Genomimbalancen. Jeder Balken gibt die in einem Tumor beobachtete Über- oder Unterrepräsentation genetischen Materials an: rot zeigt einen Verlust, grün einen Zugewinn an. Pfeile geben die Bruchpunktregionen an, die in mindestens zwei unabhängigen Fällen gefunden wurden. Charakteristisch für die chromophoben NZK ist der Verlust genomischen Materials der Chromosomen 1, 2, 3, 6, 10, 13, 17 und 21 (Kovacs und Kovacs, 1992; Speicher et al., 1994). Hinzu kommen Verluste der Chromosomen 5, 8, 9, 15, 19, des Y-Chromosoms sowie Zugewinne der Chromosomen 3, 4, 5, 7, 6, 11, 12, 18, 20 und des X-Chromosoms. Die Region Xq26q28, in der die Fluoreszenz-Ratio den Schwellenwert von 1.5 überschreitet, somit einen starken Zugewinn darstellt, ist mit einem breit gezeichneten, grünen Balken abgebildet.

Tabelle 22: Chromosomale Zugewinne und Verluste in chromophoben Nierenkarzinomen (chNZK) entsprechend ISCN 1995 „An International System for Human Cytogenetic Nomenclature“ mit klinischen und pathologischen Daten (rev ish= „reverse in-situ hybridization“; enh / dim / amp = „enhanced“ / „diminished“/ „amplified“; n.i.=keine Imbalanzen identifiziert; M = Mann; F = Frau).

Tumor Nummer	Kopien Zugewinne	Kopien Verluste	Alter bei OP [Jahre]	Tumor Durchmesser [cm]	Grad	T	N	M	Geschlecht
581	rev ish enh (3, 4, 5, 7, 10, 11q, 12, 14, 15, 16, 18, 19, 20, 22)	rev ish dim (6q , 8 , 9 , 13 , 17q , Y)	66	3	2	3a	x	x	M
595	rev ish enh (4, 7, 9, 11, 12, 15, 16, 18, 20, 22, X)	rev ish dim (1, 2, 3, 5, 6, 8, 10, 13q, 14q, 17, 21q, Y)	42	5	3	2	x	x	M
599	rev ish enh (4, 7, 8, 9, 12, 14q, 16, 19, 20, 22, X)	rev ish dim (1p, 1q23q44, 2, 3, 5, 6, 10, 11, 13, 15q15q26,17, 21q21, Y)	86	9	2	3a	x	x	M
623	rev ish enh (4q32q35)	rev ish dim (1, 2, 6, 10p15q25, 13q12q33)	56	11	3	3a	0	1	F
633	rev ish enh (3, 4, 5, 7, 8, 9q, 11q, 12, 14, 15, 18, 19, 20)	rev ish dim (1, 2, 6, 10, 13q, 17, 21q, 22q13, Y)	40	11	2	2	0	0	M
94	rev ish enh (4p15.3q28, 5p14q31.1, 11p13q12, 12p12q22, 14q11.1q24, 20p13q12)	rev ish dim (1p32p36.3, 2p23p25, 3q26.2q29, 4p16, 4q32q35, 5q34q35, 6q23q27, 8p21p23, 8q24.1q24.3, 9q31q34, 10p14p15, 10q25q26, 12q24.3, 15q15q25, 16p, 16q, 17q23q25, 18p11.3, 19, 21, 22, Y)	65	10	3	3a	x	x	M
182	rev ish enh (4, 5p14q13, 5q32q35, 7, 8, 11p13q25, 12, 13q, 15q22q26, 16, 20, Xq21q25) rev ish amp (Xq26q28)	rev ish dim (1, 2, 3, 5q15q23, 6, 9, 11p15, 14q21q32, 15q12q15, 17, 18q, 21q22, Y)	57	10	2	3a	x	x	M
272	rev ish enh (7, 17)	rev ish dim (1q42q44, 5p15.2p15.3, 8p23)	29	7,1	2	2	x	x	F
305	rev ish enh (4p16, 4p13q35, 5p13q31, 7p12q22, 8p11.1q23, 12p13q14, 18, 19p, X)	rev ish dim (1p, 1q23q25, 1q42q44, 2, 3, 6p11.1p23, 6q25q27, 10, 15q24q26, 17, Y)	82	3	2	2	x	x	M
362	n.i.	n.i.	72	6,5	2	2	x	x	M
396	rev ish enh (1p11p31.3, 2q22q32, 3p13q21, 3q24q26.3, 4p15.3q34, 5p15.2q23, 6q11q22, 11p12p14, 11q22, 12q12, 13q21.3q31, Xp21q28)	rev ish dim (1p34.1p36.3, 2q36-q37, 4p16, 5q35, 9q33q34, 11q13, 12q24.1q24.3, 15q23q26, 16, 17, 19, 20q, 21q22, 22q, Y)	77	3	1	2	x	x	M
485	rev ish enh (3q24q29, 4q11q32, 5p15.1q35)	rev ish dim (1p32p36.3, 2p24p25, 2q37, 3p14.3p21, 9q34, 12q24.3, 14q, 15q, 16p, 16q23q24, 17q, 18q23, 19, 20q, 21q)	70	3,2	2	2a	0	x	F
491	rev ish enh (5p14q23, Xp11.2q25)	rev ish dim (Yq11.2)	69	5,5	2	2	x	x	M
779	rev ish enh (3q12q27, 17q)	n.i.	73	8	2	2	x	x	M

4.1.3.2 Lokalisierung von Bruchpunktregionen

Neben den Bruchpunktregionen in Zentromerbereichen von Chromosom 6, 17 und 20 finden sich im chromophoben NZK Bruchpunktregionen in den Chromosomenbanden 1p31, 3q23, 4p15.3, 5p14, 5q32, 12p12, 12q24.2, 14q24 und 21q21.

4.1.3.3 Korrelation pathologischer Parameter mit Imbalanzen

Die Untersuchung chromophober Nierenkarzinome zeigte trotz der geringen Fallzahl eine signifikante Korrelation. Es konnte gezeigt werden, dass ein hohes Tumorstadium innerhalb dieses Subtyps mit dem Verlust von Chromosom 6 signifikant korreliert ($p=0.0316$). Weiterhin konnte eine Beziehung des Chromosom 10 Verlustes mit einem hohen Entdifferenzierungsgrad des Tumors gefunden werden ($p=0.0549$). Assoziationen chromosomaler Zugewinne mit hohem Tumorstadium konnten für die Chromosomen 16 und 20 gezeigt werden. Hier wurde allerdings keine Signifikanz erreicht (siehe [Tabelle 23](#)). Zusammenhänge von Imbalanzen mit der Lokalisation der Tumoren (linke / rechte Niere) oder dem Geschlecht der Patienten waren nicht festzustellen.

Tabelle 23: Assoziationen chromosomaler Imbalanzen der untersuchten chromophoben Nierenkarzinome mit pathologischen Parametern (G=Tumorgrad, S=Tumorstadium (Guinan et al., 1997; Goldstein, 1997)). Einzig die Korrelation des Chromosom 6-Verlustes mit hohem Tumorstadium erreicht Signifikanz ($p=0.0316$). Chromosom 10 Verlust und dessen Korrelation mit hohem Entdifferenzierungsgrad zeigt grenzwertige Signifikanz. Die p-Wert Berechnung erfolgte mit dem Fisher's Exact Test.

	Verlust Chromosom 6	Kein Verlust Chromosom 6		Verlust Chromosom 10	Kein Verlust Chromosom 10
SI / SII	3 (33%)	6 (67%)	G1/G2	3 (27%)	8 (73%)
SIII / SIV	5 (100%)	0 (0%)	G3/G4	3 (100%)	0 (0%)
	$p=0.0316$			$p=0.0549$	

	Zugewinn Chromosom 16	Kein Zugewinn Chromosom 16		Zugewinn Chromosom 20	Kein Zugewinn Chromosom 20
SI / SII	1 (11%)	8 (89%)	G1/G2	2 (27%)	7 (78%)
SIII / SIV	3 (60%)	2 (30%)	G3/G4	4 (80%)	1 (20%)
	$p=0.0949$			$p=0.0909$	

4.1.3.4 Korrelation klinischer Parameter mit Imbalanzen

Bei den chromophoben Nierenkarzinomen konnte eine Assoziation zwischen dem Verlust der Chromosomen 2, 8 und 17 mit der Patientenprognose gefunden werden. Der Verlust des Chromosoms 8 ist mit einer verbesserten Prognose assoziiert. Der Verlust der Chromosomen 2 oder 17 zeigte hingegen eine Assoziation mit einer ungünstigen Prognose. Die Assoziation des Chromosomenverlusts 2 oder 17 erreichte keine Signifikanz ([Abbildung 10](#)). Zugewinne der Chromosomen 9, 12 und X waren

prognostisch relevant. Alle drei Zugewinne konnten mit ungünstiger Prognose in Beziehung gesetzt werden. Auch hier verfehlt der Prognoseunterschied die Signifikanzkriterien.

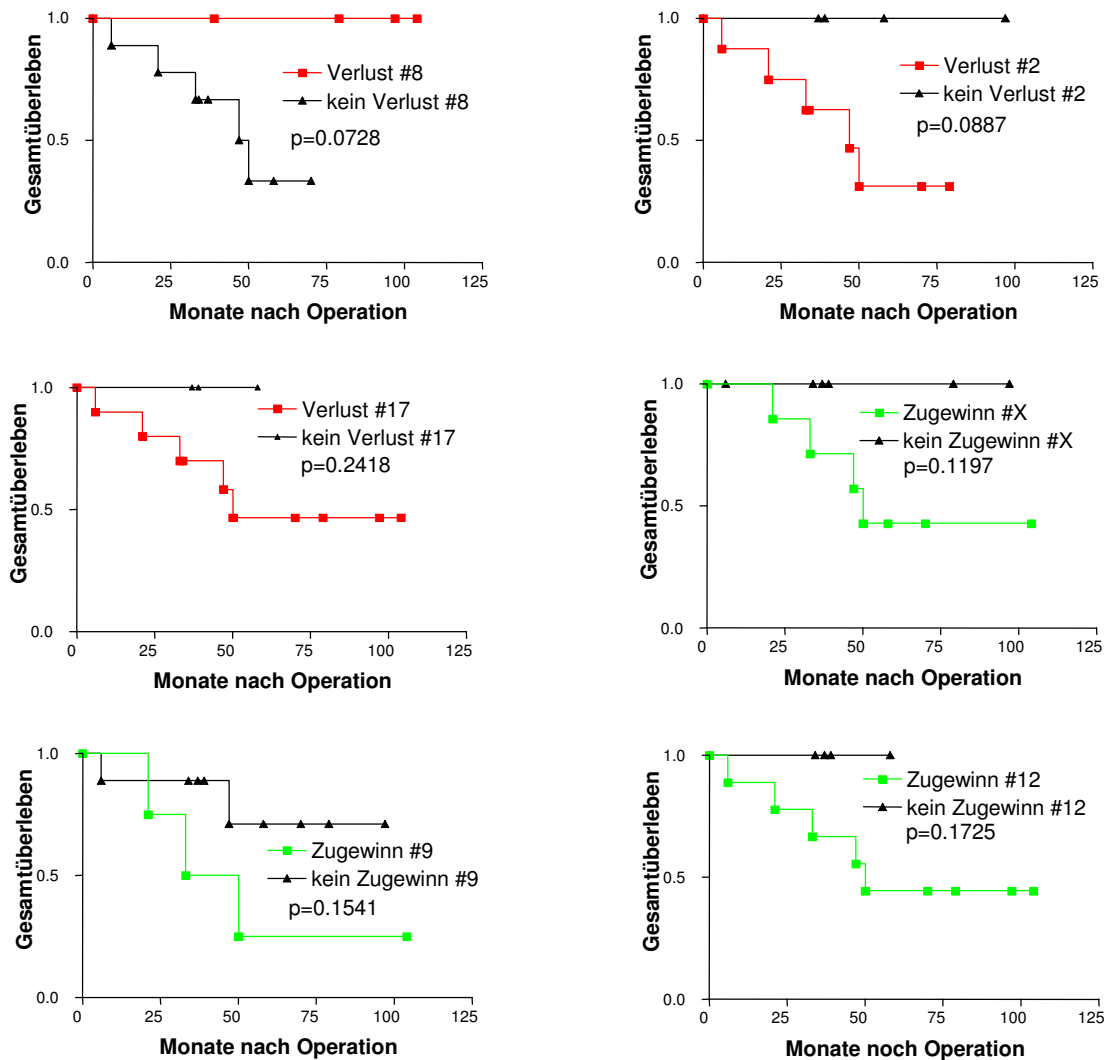


Abbildung 10: Überlebenskurven nach Kaplan-Meier im Kollektiv der Patienten mit chromophoben Nierenkarzinom. Signifikante Prognoseunterschiede wurden bei diesem Subtyp nicht festgestellt (Logranktest).

4.1.4 Onkozytome der Niere

16 Onkozytome der Niere wurden mit CGH untersucht. Das Patientenalter variierte zwischen 44 bis 85 Jahren und zeigte einen Altersdurchschnitt von 61 Jahren. Die Tumordurchmesser variierten von 2.8 bis 11 cm, mit einem Mittelwert von 5.5cm. Das Patientenkollektiv setzte sich aus 11 Männern und 5 Frauen zusammen.

4.1.4.1 Genomische Imbalancen

In 16 Onkozytomen fanden sich in der Gesamtheit der CGH Analyse in 14 der Tumoren vergleichsweise wenige Chromosomenimbilanzen. Zwei der untersuchten Onkozytome wiesen ungewöhnlich zahlreiche Imbalancen auf. Verluste fanden sich meist auf Chromosom 1 und dem Y-Chromosom. Chromosom 7 zeigte sich im Onkozytom in drei Tumoren überrepräsentiert.

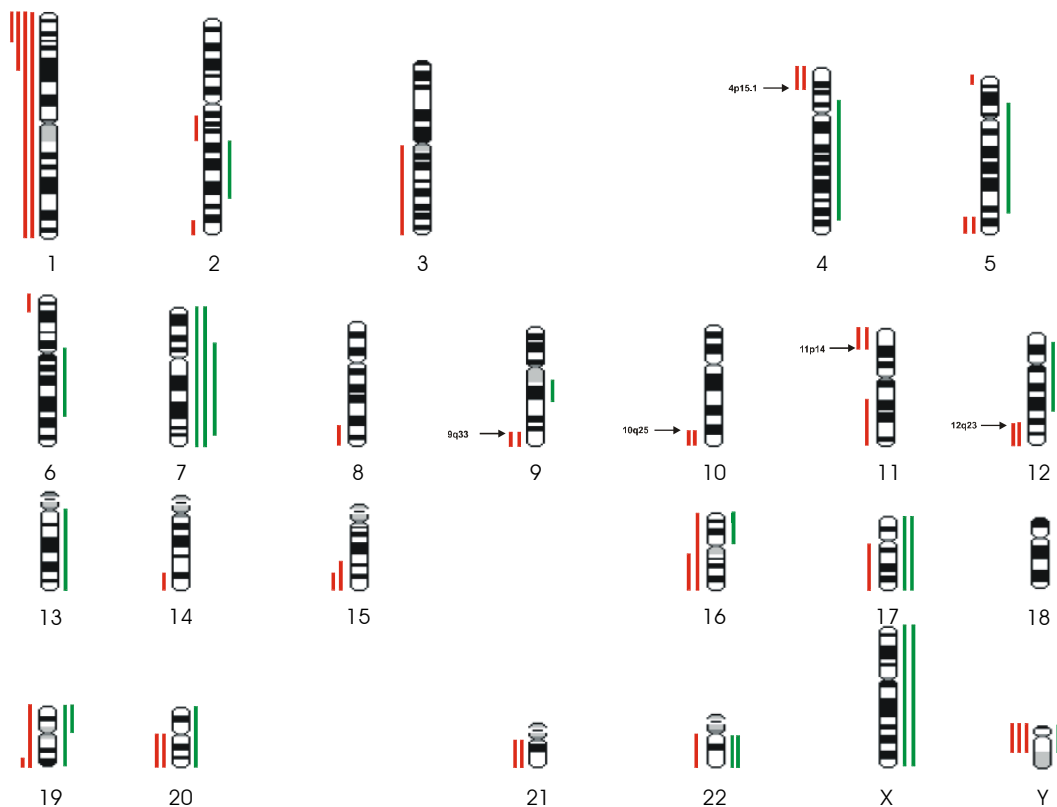


Abbildung 11: Zusammenfassende Darstellung der mittels CGH in 16 Onkozytomen beobachteten Genomimbilanzen. Jeder Balken gibt die in einem Tumor beobachtete Über- oder Unterrepräsentation genetischen Materials an: rot zeigt einen Verlust, grün einen Zugewinn an. Pfeile geben die Bruchpunkte an, die in mindestens zwei unabhängigen Fällen gefunden wurden.

Tabelle 24: Chromosomale Zugewinne und Verluste in Onkozytomen entsprechend ISCN 1995 „An International System for Human Cytogenetic Nomenclature“ mit klinikopathologischen Daten (rev ish= „reverse in-situ hybridization“; enh / dim = „enhanced“ / „diminished“; n.i.=keine Imbalancen identifiziert; n.b.=nicht bekannt ; M = Mann; F = Frau).

Tumor Nummer	Kopien Zugewinne	Kopien Verluste	Alter bei OP [Jahre]	Tumor Durchmesser [cm]	Grad	T	N	M	Geschlecht
559	n.i.	n.i.	n.b.	3	0	x	x	x	M
585	rev ish enh (16p, 17, 19, 20, 22)	rev ish dim (1, Y)	55	2,8	0	x	x	x	M
597	rev ish enh (22)	n.i.	66	2,6	0	x	x	x	M
631	n.i.	n.i.	51	11	0	x	x	x	M
109	n.i.	n.i.	72	3,5	0	x	x	x	F
120	n.i.	n.i.	45	3	0	x	x	x	F
190	rev ish enh (2q31q33, 4p14q27, 5p13q32, 6p11.2q23, 7p12q35, 12p12q21, X, Y)	rev ish dim (1p34.2p36.3, 4p16, 5p15.3, 5q34q35, 6p23p25, 9q34, 10q26, 11p15, 14q31q32, 15q25q26, 16, 19q13.4, 20q, 21q)	58	6	0	x	x	x	M
192	n.i.	rev ish dim (3q)	63	3,5	0	x	x	x	F
685	n.i.	n.i.	50	9,5	0	x	x	x	M
252	rev ish enh (7, 9q21, 13q)	rev ish dim (1p31.2p36.3, 2q13q21, 2q37, 4p16, 5q34q35, 8q24.1q24.3, 9q34, 10q26, 11p15, 11q14q25, 12q24.1q24.3, 15q23q26, 16p, 16q, 17q, 19, 20q, 21q, 22q)	81	2,7	0	x	x	x	F
266	rev ish enh (7, 17, X)	rev ish dim (Y)	44	6	0	x	x	x	M
321	n.i.	rev ish dim (1, Y)	85	4,5	0	2	x	x	M
378	rev ish enh (19p)	n.i.	58	6,5	0	x	x	x	M
501	n.i.	n.i.	65	6	0	x	x	x	M
525	n.i.	n.i.	67	6,5	0	0	0	0	M
529	n.i.	n.i.	62	5,2	0	x	x	x	F

4.1.4.2 Lokalisierung von Bruchpunktregionen

In Onkozytomen konnten mittels CGH in den Chromosomenbanden 4p15.1, 9q33, 10q25, 11p14 und 12q23 Bruchpunktregionen detektiert werden.

4.1.4.3 Korrelation pathologischer Parameter mit Imbalanzen

Aufgrund durchgängig gut differenzierter Nuklei wird bei Onkozytomen keine Einteilung in (Ent-)Differenzierungsgrad bezogen auf die Kernmorphologie durchgeführt (Amin et al., 1997b; Medeiros et al., 1997). Somit ist eine Korrelation chromosomaler Imbalanzen mit dem Tumorgrad nicht möglich. Da alle untersuchten Onkozytome durchgängig niedrige oder nicht feststellbare Tumorstadien nach TNM Nomenklatur präsentierten (Tabelle 24), entfällt gleichfalls die Möglichkeit der Korrelation mit dem Tumorstadium.

4.1.4.4 Korrelation klinischer Parameter mit Imbalanzen

Die Patientenprognose ist beim Onkozytom der Niere äußerst günstig. Von den mit CGH untersuchten Patienten war in 15 von 16 Fällen eine zensierte, postoperative Überlebensberechnung nach Kaplan-Meier möglich. Innerhalb eines Beobachtungszeitraumes von bis zu 10 Jahren nach Operation verstarb nur einer der Patienten und dies nicht anhand einer tumorassoziierten Ursache. Lokalrezidive oder Metastasen wurden nicht beobachtet.

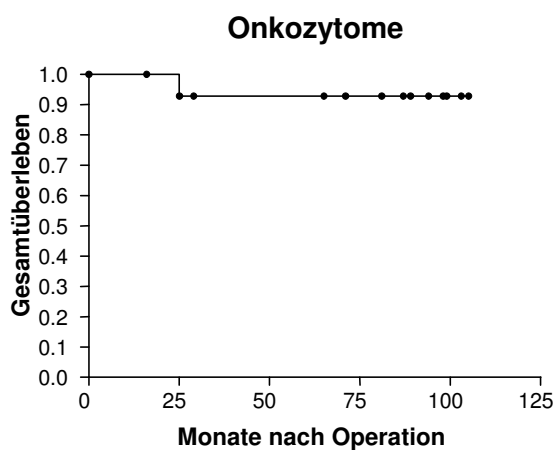


Abbildung 12: Postoperatives Überleben der am Onkozytom der Niere behandelten Patienten. Über 90% der operierten Patienten überlebten die Resektion bis zu zehn Jahre.

4.1.5 Untersuchungen von Zelllinien

Die im Labor verwendeten renalen Zelllinien wurden mit CGH untersucht, um Imbalancen genetisch möglichst homogener Zellpopulationen zu studieren. Von Interesse war, inwieweit die Zelllinien als Repräsentanten hoher Tumorprogression einheitliche chromosomale Imbalancen aufweisen (Vergleich der klarzelligen Zelllinien untereinander und mit einer mesenchymalen Nierenzelllinie). Weiterhin sollte untersucht werden, ob die in Zelllinien gefundenen Imbalancen in primären Nierentumoren wiederzufinden sind, und ob Zelllinien das geeignete Modell zu Untersuchung tumorprogressions-assoziiierter Chromosomenveränderungen sind (Vergleich der Zelllinien-CGH mit Primärtumor-CGH).

Es wurde deutlich, dass zahlreiche in Primärtumoren gefundene Veränderungen auch in den untersuchten Zelllinien auftreten. Am Beispiel der Zelllinien 786-O, CaKi-1 und CaKi-2 (klarzellige Nierenkarzinome) ließen sich zahlreiche, mit CGH darstellbare Imbalancen aufzeigen, die auf eine weit fortgeschrittene Progression der Linien hindeuten. Die beiden aus klarzelligen Karzinomen etablierten Linien KTCTL-26A und A498 weisen ein weniger imbalanziertes Genom auf. Die aus embryonaler Niere etablierte und kommerziell verfügbare, nicht aus Karzinomgewebe etablierte Linie HEK293 zeigte vergleichsweise geringe Genomveränderungen.

4.1.5.1 Klarzellige Nierenzelllinie 786-O

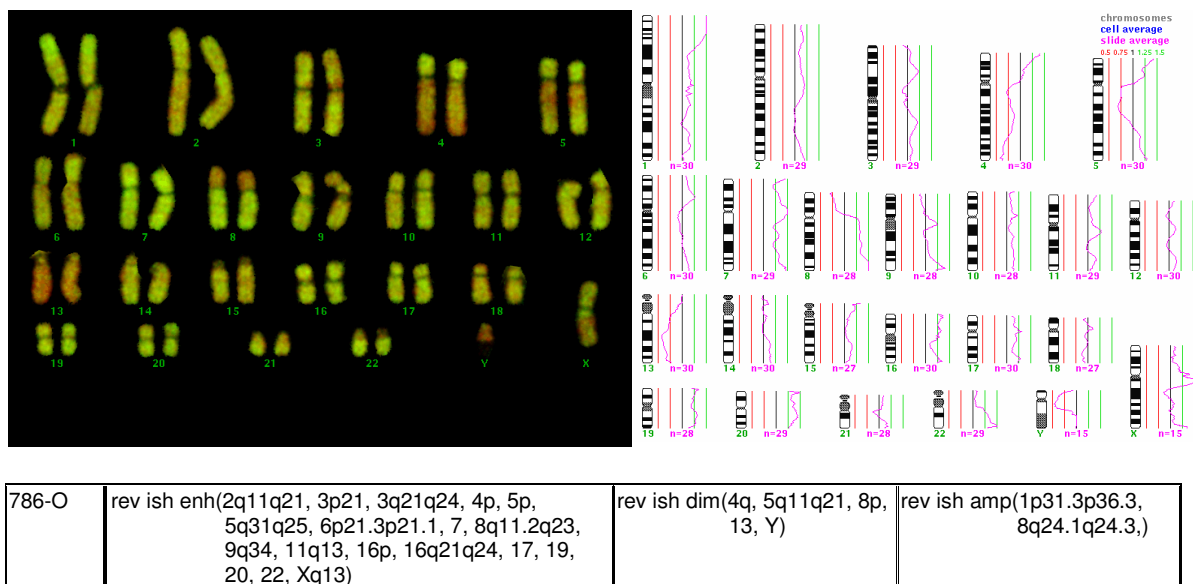
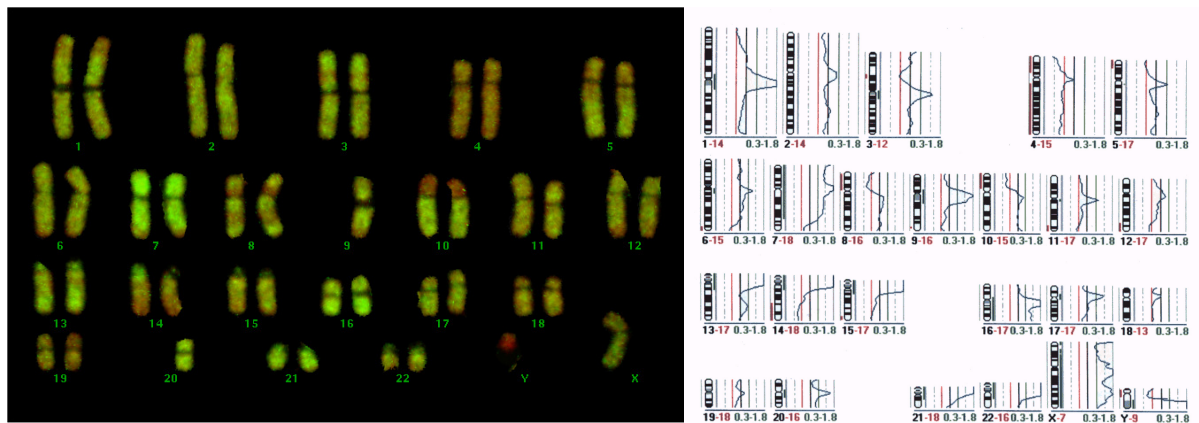


Abbildung 13: CGH-Hybridisierungsergebnis der Zelllinie 786-O. **Links:** Karyogramm von Normalchromosomen 46,XY mit überlagerten Referenz- und Test-Fluoreszenzen (rot bzw. grün). **Rechts:** Summationsdiagramm der Analyse (Zahlen unterhalb der Fluoreszenzquotienten geben die Anzahl der jeweils untersuchten Chromosomen wieder). **Unten:** Imbalancen nach ISCN 1995 (enh / dim / amp = „enhanced“=zugewonnen / „diminished“=verloren / „amplified“=amplifiziert).

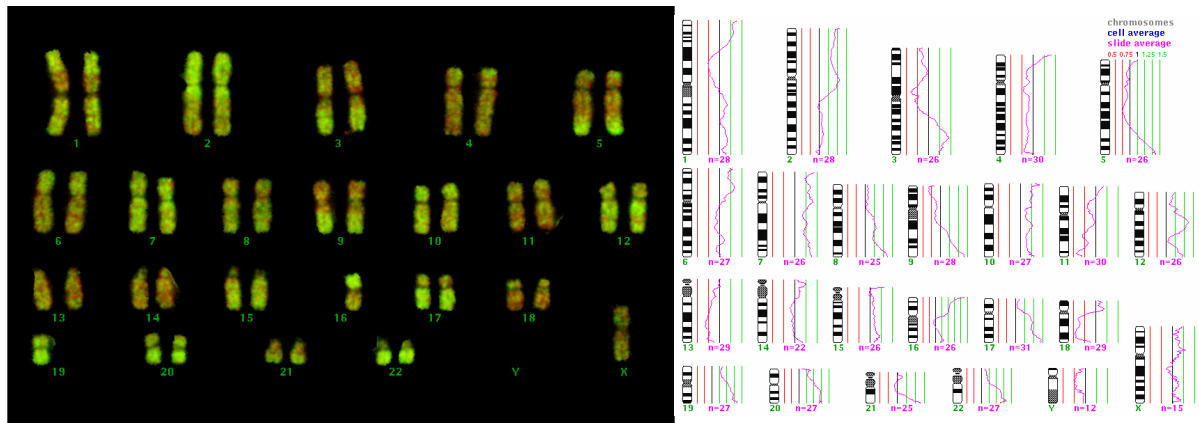
4.1.5.2 Klarzellige Nierenzelllinie CaKi-1



CaKi-1	rev ish enh (1p13q21, 2p11.2q13, 3q12q13.3, 6p12q16, 9p12q21.1, 13q11q14.1, 13q22q31, 14q11.2q12, 16q, 20q, 21q21, 22q11.2q12, X)	rev ish dim (1p31.3p36.3, 1q24q44, 3p13q21, 4, 5p, 5q13q21, 5q24q35, 6q25q27, 7q36, 8p, 9, 10p, 11, 12p12p13, 12q22q24.3, 14q21q32, 15q, 18, 19, Y)	rev ish amp (7p22q32)
--------	---	---	-----------------------

Abbildung 14: CGH-Hybridisierungsergebnis der Zelllinie CaKi-1. **Links:** Karyogramm von Normalchromosomen 46,XY mit überlagerten Referenz- und Test-Fluoreszenzen (rot bzw. grün). **Rechts:** Summationsdiagramm der Analyse (Zahlen unterhalb der Fluoreszenzquotienten geben die Anzahl der jeweils untersuchten Chromosomen wieder). **Unten:** Imbalancen nach ISCN 1995 (enh / dim / amp = „enhanced“=zugewonnen / „diminished“=verloren / „amplified“=amplifiziert).

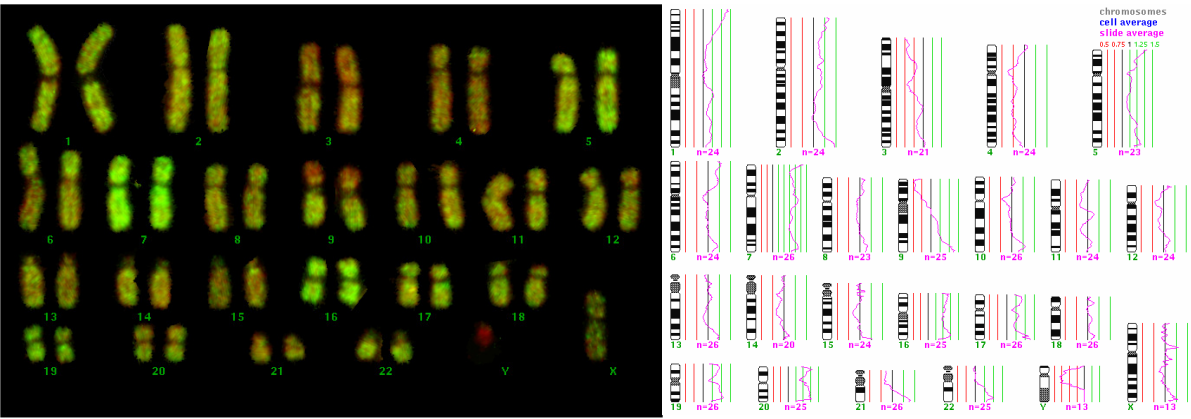
4.1.5.3 Klarzellige Nierenzelllinie CaKi-2



CaKi-2	rev ish enh (1p32p36.3, 2p25q21, 3q23q29, 4p15.1p16, 5q31, 6p, 7, 8q, 9q22q33, 10, 12q13q21, 12q24.1q24.3, 16q22q24, 19p, 20p, 21q22,)	rev ish dim (1p11p31.1, 3p22p26, 3p14q13.3, 4p14q35, 5q14q22, 9p21p24, 11q14q25, 13q, 18q)	rev ish amp (5q32q35, 9q34, 16p, 17q, 19q, 20q, 22q12q13)
--------	--	--	---

Abbildung 15: CGH-Hybridisierungsergebnis der Zelllinie CaKi-2. **Links:** Karyogramm von Normalchromosomen 46,XY mit überlagerten Referenz- und Test-Fluoreszenzen (rot bzw. grün). **Rechts:** Summationsdiagramm der Analyse (Zahlen unterhalb der Fluoreszenzquotienten geben die Anzahl der jeweils untersuchten Chromosomen wieder). **Unten:** Imbalancen nach ISCN 1995 (enh / dim / amp = „enhanced“=zugewonnen / „diminished“=verloren / „amplified“=amplifiziert).

4.1.5.4 Klarzellige Nierenzelllinie KTCTL-26A



KTCTL-26A	rev ish enh (1p31.2p36.3, 1q, 2p25q22, 2q34q37, 5p, 5q11.2q23, 5q31q35, 6p, 9q21q34, 10q25q26, 16, 17, 19, 20, 21, 22)	rev ish dim (3p26q13.3, 3q22q26.3, 4p15.1q35, 9p, Y)	rev ish amp (7)
-----------	--	--	-----------------

Abbildung 16: CGH-Hybridisierungsergebnis der Zelllinie KTCTL-26A. **Links:** Karyogramm von Normalchromosomen 46,XY mit überlagerten Referenz- und Test-Fluoreszenzen (rot bzw. grün). **Rechts:** Summationsdiagramm der Analyse (Zahlen unterhalb der Fluoreszenzquotienten geben die Anzahl der jeweils untersuchten Chromosomen wieder). **Unten:** Imbalancen nach ISCN 1995. (enh / dim / amp = „enhanced“=zugewonnen / „diminished“=verloren / „amplified“=amplifiziert).

4.1.5.5 Klarzellige Nierenzelllinie A498

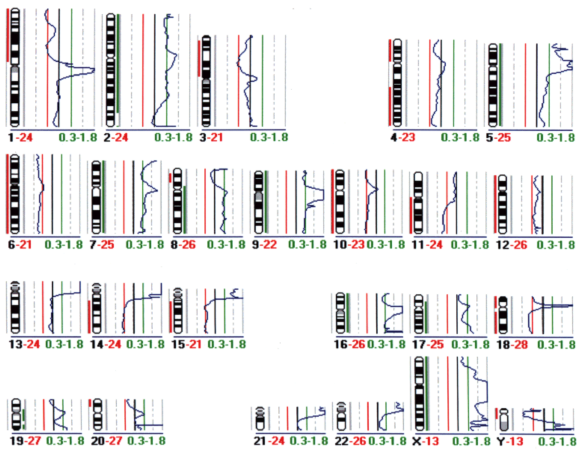


Abbildung 17: **Links:** CGH-Imbalanzprofil der Zelllinie A498. **Unten:** Imbalancen nach (ISCN 1995). (enh/dim/amp: „enhanced“=zugewonnen / „diminished“=verloren / „amplified“=amplifiziert)

A498	rev ish enh (1q21, 2p25q33, 5p, 5q11.1q31, 7, 8q, 9, 16, 17q, 19q13.4)	rev ish dim (1p, 3p11p22, 4p14p15.3, 4q31.1q35, 6, 10, 11q, 12, 14, 15, 18, 20p, Y)	rev ish amp (Xp21q28)
------	--	---	-----------------------

4.1.5.6 Embryonale Nierenzelllinie HEK 293

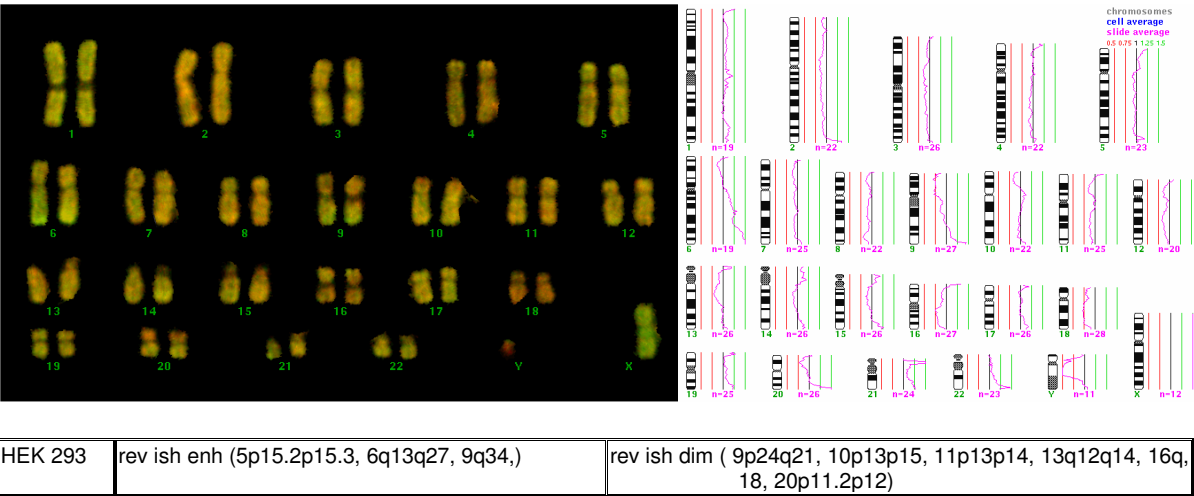


Abbildung 18: CGH-Hybridisierungsergebnis der embryonalen Nieren-Zelllinie HEK293. **Links:** Karyogramm von Normalchromosomen 46,XY mit überlagerten Referenz- und Test-Fluoreszenzen (rot bzw. grün). **Rechts:** Summationsdiagramm der Analyse (Zahlen unterhalb der Fluoreszenzquotienten geben die Anzahl der jeweils untersuchten Chromosomen wieder). **Unten:** Imbalanzen nach ISCN 1995 (enh / dim / amp = „enhanced“=zugewonnen / „diminished“=verloren / „amplified“=amplifiziert).

Die CGH-Profile der klarzelligen Nierenkarzinomlinien CaKi-1, CaKi-2, KTCTL-26A und A498 zeigten einheitliche Imbalanz-Merkmale. So konnten die Zugewinne von Teilen des Chromosoms 2, der Chromosomen 5, 7, 16, 17q, 19 und 22 beobachtet werden. Verloren gingen oft der Chromosomenarm 3p (in CaKi-1 und CaKi -2, A498 auch interstitiell) und und das Chromosom 4 sowie die Chromosomen 8p, 9, 18 und das Y-Chromosom. Amplifikationen waren ausschließlich in den aus Karzinomen etablierten Linien feststellbar, betroffen waren meist die Chromosomen 5 und 7 sowie das X-Chromosom. Die Linie 786-0 zeigt keine mit CGH nachweisbaren Verluste des Chromosomenarmes 3p auf, weist aber den Zugewinn der Chromosomen 7, 16, 17 und 20 auf.

4.1.6 Matrix-CGH

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Lichter (DKFZ; Heidelberg; Molekulare Genetik; Dipl.Biol. Björn Fritz) wurden durch 20 mit konventioneller CGH vorcharakterisierte Tumoren des klarzelligen NZK mit Matrix-CGH untersucht. Bei der Matrix-CGH ersetzt ein Raster von immobilisierten DNA-Fragmenten in Form genomischer PAC-, BAC- oder Cosmid-Klone die Metaphase-Chromosomen. Somit können Zugewinne oder Verluste an genetischem Material mit einer Auflösung in der Größenordnung von Cosmiden, BACs oder PACs nachgewiesen werden, was der Matrix-CGH ein gegenüber der konventionellen CGH deutlich gesteigertes Auflösungsvermögen verleiht. Im vorliegenden Fall liegt das Auflösungsvermögen der Matrix-CGH aufgrund 2464 immobilisierter BAC und PAC-Klone bei etwa 1.5 Mb. Somit wird gegenüber konventioneller CGH (Auflösung ≥ 10 Mb) eine Verbesserung der Auflösung um den Faktor sieben erreicht. Die so erzielten Resultate wurden mit den zuvor mit konventioneller CGH erhobenen Imbalanzprofilen verglichen. Der zusammengefasste Ergebnisvergleich ist in nachfolgender Abbildung dargestellt. Eine detaillierte Gegenüberstellung der Matrix-CGH /CGH Resultate ist im Anhang zu finden.

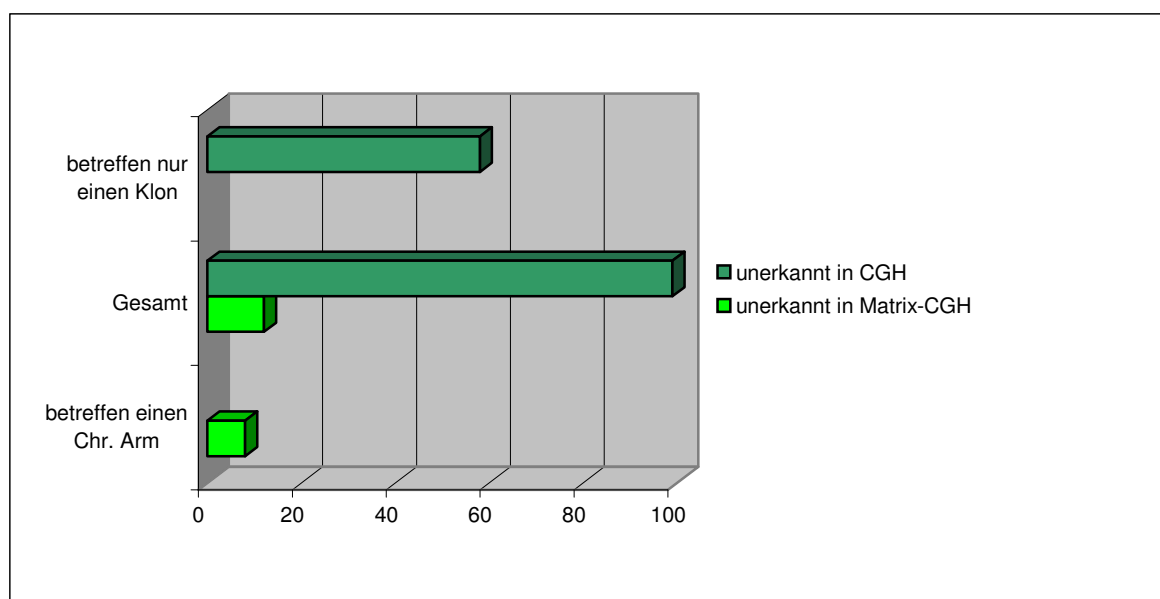


Abbildung 19: Vergleich der Ergebnisse zwischen Matrix-CGH (Auflösung ca 1.5 Mb; 2464 genomische Klone) und konventioneller, chromosomenbasierter CGH (Auflösung ca ≥ 10 Mb). Vergleichsdaten wurden in 20 klarzelligen Nierenkarzinomen erhoben. In der mittleren Doppelsäule ist die Gesamtzahl der jeweils von den unterschiedlichen Methoden unerkannten Imbalanzen dargestellt. Von Matrix-CGH wurden 12 Imbalanzen nicht detektiert. Hiervon betrafen acht ganze Chromosomenarme (untere Säule). Der CGH entgingen insgesamt 99 Imbalanzen, die in der Matrix-CGH detektiert wurden. Von den 99 mit konventioneller CGH nicht detektierbaren Imbalanzen betrafen 58 Einzel-Klone, betrafen also Genombereiche, die kleiner als 1.5 Mb groß sind und somit der konventionellen CGH entgehen (obere Säule).

4.2 Molekulargenetische Untersuchungen

4.2.1 Mikrosatellitenanalysen auf Chromosom 14

Die CGH Analyse der untersuchten Tumoren hat gezeigt, dass ein Verlust des Chromosoms 14 in klarzelligen Nierenkarzinomen nach dem Verlust von Chromosom 3 die zweithäufigste Aberration darstellt. In einigen Fällen zeigten sich in den CGH Profilen auch in papillären und in chromophoben Karzinomen der Niere genomische Verluste des Chromosoms 14. In einem parallelen Ansatz zur Deletionskartierung von Chromosom 14 wurden im Verlauf der Diplomarbeit von Sabine Kleikamp insgesamt 44 Tumoren drei unterschiedlicher Subtypen mit Mikrosatelliten-Analysen untersucht. Die verwendeten 15 polymorphen Marker wurden so gewählt, dass der lange Arm des Chromosoms 14 repräsentativ analysiert wurde (Kleikamp, 1999).

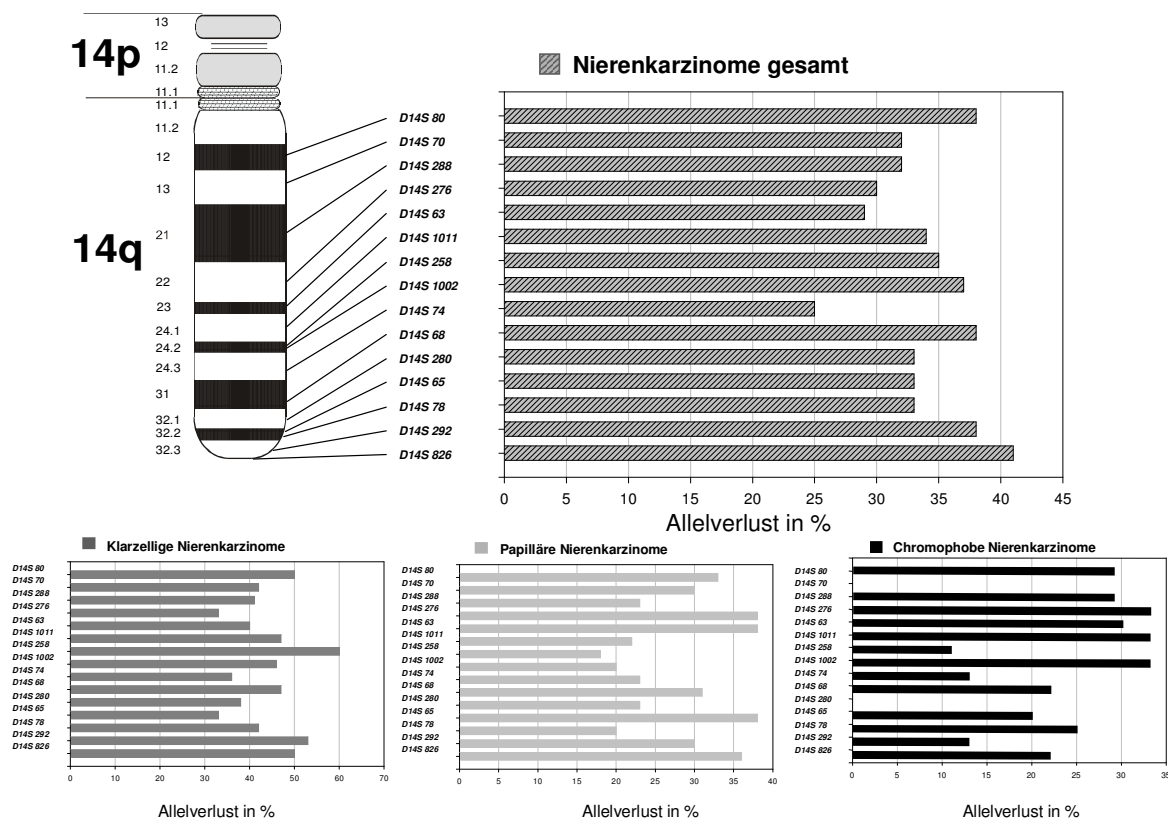


Abbildung 20: Prozentuale Allelverluste von 44 Nierenkarzinomen (klarzellige, papilläre und chromophobe NZK) sowie Zuordnung zu korrespondierenden polymorphen Markerloci (oben). Subtypspezifische Zuordnung der Allelverluste in 20 klarzelligen (unten links), 13 papillären (unten Mitte) und 11 chromophoben Nierenkarzinomen (unten rechts). Verändert aus (Wimmer-Kleikamp et al., 2003).

Die eigene MSA zeigte, dass in keinem der untersuchten Tumoren signifikante Deletionshäufungen gefunden werden konnten. Meist fand sich durchgängige Allelimbalanz entlang des gesamten langen Armes des Chromosoms 14.

Der Verlust des Chromosoms 14 ist in dieser Studie mit einer schlechten Prognose assoziiert. Die Berechnung der Überlebenskurven zeigte sowohl für klarzellige als auch für papilläre Karzinome einen deutlich ungünstigeren Verlauf für die Patientengruppe mit einem Chromosom 14q Verlust. Bei Patienten mit chromophoben Nierenkarzinom spiegelte sich der Verlust von Chromosom 14q nicht in einer schlechteren Prognose wider. Die Kaplan-Meier Überlebenskurven aller Tumorsubtypen (siehe [Abbildung 22](#) oben links) wiesen der Patientengruppe ohne Verlust des Chromosoms 14q eine signifikant bessere Überlebenswahrscheinlichkeit zu

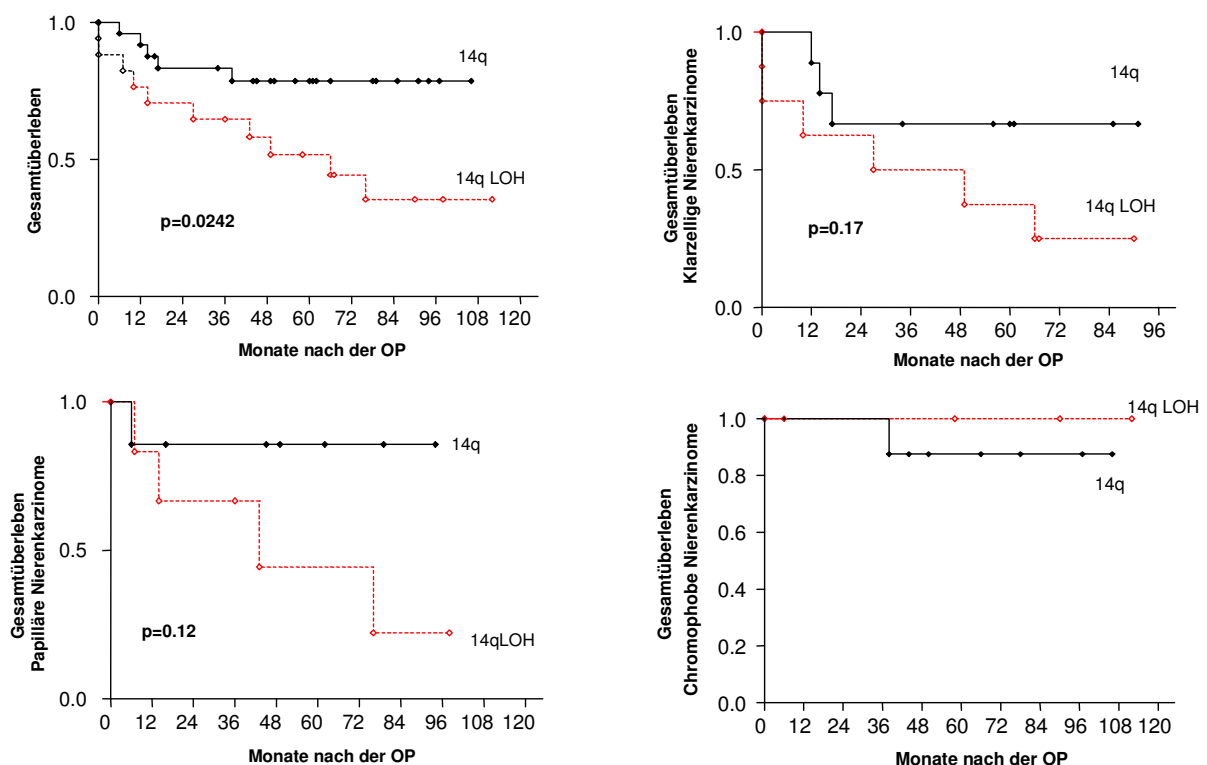


Abbildung 22: Kaplan-Meier Überlebenskurven des mit Mikrosatellitenanalysen untersuchten Patientenkollektivs in Abhängigkeit eines Allel-Verlustes (LOH) des Chromosomenarms 14q. Oben links: Summation aller untersuchten Tumorsubtypen; oben rechts: Klarzellige Nierenkarzinome; unten links: Papilläre Nierenkarzinome; unten rechts: Chromophobe Nierenzellkarzinome. Es fällt auf, dass die klarzelligen und papillären Karzinome trotz eindeutig schlechtem Prognostetrend bei einem Allelverlust auf 14q keine Signifikanz erreichen. Erst die Summation der Ergebnisse ungeachtet einer Subtypzuordnung erreicht eine statistisch abgesicherte Differenz der Überlebenskurven ($p < 0.05$). In chromophoben Karzinomen der Niere scheinen keine Prognoseunterschiede zwischen der Gruppe mit und ohne 14q Allelverlust zu bestehen. Verändert nach (Kleikamp, 1999).

Das vergleichsweise niedrige Auflösungsvermögen und die grundsätzlich verschiedene Methodik der CGH gegenüber der Mikrosatellitenanalyse warf die Frage auf, inwieweit

sich die beiden Methoden durch Aufklärung von Allelverlusten bei der Tumorsuppressorgen-Suche komplementieren. Hierzu wurden in einem Doppelblindversuch 20 Tumoren sowohl mit CGH- als auch mit Mikrosatelliten-Analysen untersucht. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein großes Maß übereinstimmender Ergebnisse beider Methoden besteht (Tabelle 26)(Wimmer-Kleikamp et al., 2003).

Tabelle 26: Ergebnisvergleich zwischen MSA und CGH des Chromosomenarms 14q in 20 Nierenkarzinomen. Entgegengerichtete Resultate der Analysetechniken sind rot hervorgehoben. (□ = Heterozygotie (MSA) / CGH Normalbefund; ■ = Verlust der Heterozygotie (MSA) / Verlust genetischen Materials; ■ = Homozygotie (nicht informativ); ⊞ =unbestimmt (1.3<Allel Ratio<1.5); - = nicht erfolgreich).

		Tumornummer																			
Lokus		587	601	603	611	615	80	134	164	172	200	70	613	627	639	82	88	140	276	553	581
D14 S80	CGH	□	■	□	□	□	■	□	■	■	□	□	□	■	□	■	□	□	□	□	□
	MSA	■	■	□	□	□	■	□	■	■	□	□	□	■	⊞	■	□	□	□	■	□
D14 S70	CGH	□	■	□	□	□	■	□	■	■	□	□	□	■	□	■	□	□	□	□	□
	MSA	□	■	□	□	□	■	■	■	■	■	■	□	■	□	■	□	■	■	■	□
D14 S288	CGH	□	■	□	□	□	■	□	■	■	□	□	□	■	□	■	□	□	□	□	□
	MSA	□	■	□	□	■	■	□	■	■	□	□	□	■	□	■	□	■	□	□	□
D14 S276	CGH	□	■	□	□	□	■	□	■	■	□	□	□	■	□	■	□	□	□	□	□
	MSA	□	■	□	□	□	■	■	■	■	□	□	■	■	■	■	□	■	□	□	■
D14 S63	CGH	□	■	□	□	□	■	□	■	■	□	□	□	■	□	■	□	□	□	□	□
	MSA	□	■	■	□	□	■	□	■	■	□	□	□	■	□	■	□	□	□	□	□
D14 S1011	CGH	□	■	□	□	□	■	□	■	■	□	□	□	■	□	■	□	□	□	□	□
	MSA	□	■	□	□	□	■	□	⊞	■	□	□	□	■	□	■	□	□	□	□	□
D14 S258	CGH	□	■	□	□	□	■	□	■	■	□	□	□	■	□	■	□	□	□	□	□
	MSA	□	■	□	□	□	■	■	■	■	■	□	□	■	□	■	□	□	□	□	□
D14 S1002	CGH	□	■	□	□	□	■	□	■	■	□	□	□	■	□	■	□	□	□	□	■
	MSA	□	■	□	□	□	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	□	■	□	□	■
D14 S74	CGH	□	■	□	□	□	■	□	■	■	□	□	□	■	□	■	□	□	□	□	□
	MSA	⊞	■	□	□	□	■	□	■	■	-	□	□	■	□	■	□	□	□	□	■
D14 S68	CGH	□	■	□	□	□	■	□	■	□	□	□	□	■	□	■	□	■	□	□	□
	MSA	□	■	□	□	□	■	□	■	□	□	□	■	■	□	■	□	■	□	□	□
D14 S280	CGH	□	■	□	□	□	■	□	■	■	□	□	□	■	□	■	□	□	□	□	□
	MSA	□	■	■	□	□	■	■	-	■	□	□	■	■	■	■	■	□	□	□	□
D14 S65	CGH	□	■	□	□	□	■	□	■	□	□	□	□	■	□	■	□	□	□	□	□
	MSA	■	■	□	□	□	■	□	■	□	□	□	■	■	□	■	■	■	□	□	□
D14 S78	CGH	□	■	□	□	□	■	□	■	□	□	□	□	■	□	■	□	□	□	□	□
	MSA	□	■	□	□	□	■	□	■	■	□	□	□	■	□	■	□	□	□	□	□
D14 S292	CGH	□	■	□	□	□	■	□	■	■	□	□	□	■	□	■	□	□	□	□	□
	MSA	□	■	□	□	□	■	□	■	■	□	■	□	■	⊞	■	□	□	■	■	□
D14 S826	CGH	□	■	□	□	□	■	□	■	■	□	□	□	■	□	■	□	□	□	□	□
	MSA	□	■	□	□	□	■	□	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	□

Aus Tabelle 26 wird ersichtlich, dass die Ergebnisse der MSA-Feinkartierung und der CGH von Chromosom 14 weitgehend übereinstimmen. Ein Tumor zeigte in der CGH entlang des gesamten Chromosomenarmes keine Auffälligkeit, während die Mikrosatellitenanalyse durchgängig den Verlust der Heterozygotie (LOH = „loss of heterozygosity“) detektierte. Im Tumor 172 muss daher von einem Fall der uniparentalen Disomie (UPD) ausgegangen werden, einem Spezialfall des LOH. Vier Tumoren zeigten in jeweils einem der untersuchten Loci einen Allelverlust, wohingegen die CGH ein

unauffälliges Imbalanzprofil des Chromosoms 14 aufwies. In keinem Fall, in dem die CGH einen Verlust genomischen Materials detektierte, wurde mit MSA Heterozygotie gefunden. In zahlreichen Loci war der CGH-Befund unauffällig, während die MS-Analyse in einzelnen Loci einen homozygoten Zustand (zwei identisch vorhandene Allele) aufzeigte. In diesen Fällen ist eine Aussage hinsichtlich eines Allelverlustes basierend auf MSA-Daten prinzipiell nicht möglich, da kein informatives Ergebnis der MSA vorliegt.

4.2.2 Molekulare Untersuchung der *VHL* flankierenden Region

Aus einer aus Blut hergestellten, systematisch geordneten humangenomischen PAC-Klon Bibliothek konnten durch PCR- und Southern-Untersuchungen zwei Klone isoliert werden, welche den gesamten genomischen Lokus von *VHL* (14.9kb) beinhalten (Düsterhöft, 2002). Im Einzelnen wurden hierzu mit Exon-spezifischen Primern für alle drei Exons von *VHL* die hierarchisch angeordnete Klon-DNA der PAC- (*P1 derived artificial chromosome*) Bibliothek durchsucht (Munroe et al., 1995). Nach weiterer Einengung der zu untersuchenden, hierarchisch nach Reihen und Spalten geordneten Klonplatten, sogenannter „superpools“ durch PCR konnten zwei Klonplatten, sogenannte „platepools“ identifiziert werden, auf denen jeweils mindestens ein PAC Klon enthalten sein musste, der alle drei *VHL* Exons enthielt. Durch Koloniefilter-Hybridisierung der beiden PCR-positiven 384-Loch Platten mit einer $\alpha^{32}\text{P}$ -markierten Exon-3-Sonde für *VHL* war es dann möglich, den in Frage kommenden Einzelklon auf jeder Platte zu identifizieren. Die beiden entsprechenden Klone wurden daraufhin in Kultur genommen und die Plasmide isoliert.

Die weitere Charakterisierung durch Pulsfeld-gelelektrophoretische Auftrennung der beiden *NotI* restringierten PAC-Plasmide (85E19 und 102L11) zeigte, dass die genomische Ausdehnung der Plasmid-Integrate aufgrund weitgehend verschiedener Fragmentmuster minimale Überlappung aufwies. Nachfolgende Sequenzierung der PAC-Enden lieferte die notwendigen Informationen zur DNA-Datenbankrecherche, die eine exakte Kartierung der beiden PAC-Klone erlaubte. Die Suche nach bekannten Genen innerhalb der eingegrenzten Bereiche bestätigte die Vermutung, dass der gesamte genomische Lokus von *VHL* in beiden Klonen vorhanden ist.

Auf Klon 102L11 kartiert zudem das 74 kb große Gen *FANCD2* (*fanconi anemia complementation group D2*), wohingegen der kleinere Klon 85E19 zusätzlich zu *VHL* die ersten drei Exons von *IRAK2* (*interleukin-receptor associated kinase type 2*) umfasst. Beide Klone überspannen ein genomisches Segment von 207.2kb, das von den polymorphen Markern D3S3950 und D3S1317 flankiert wird.

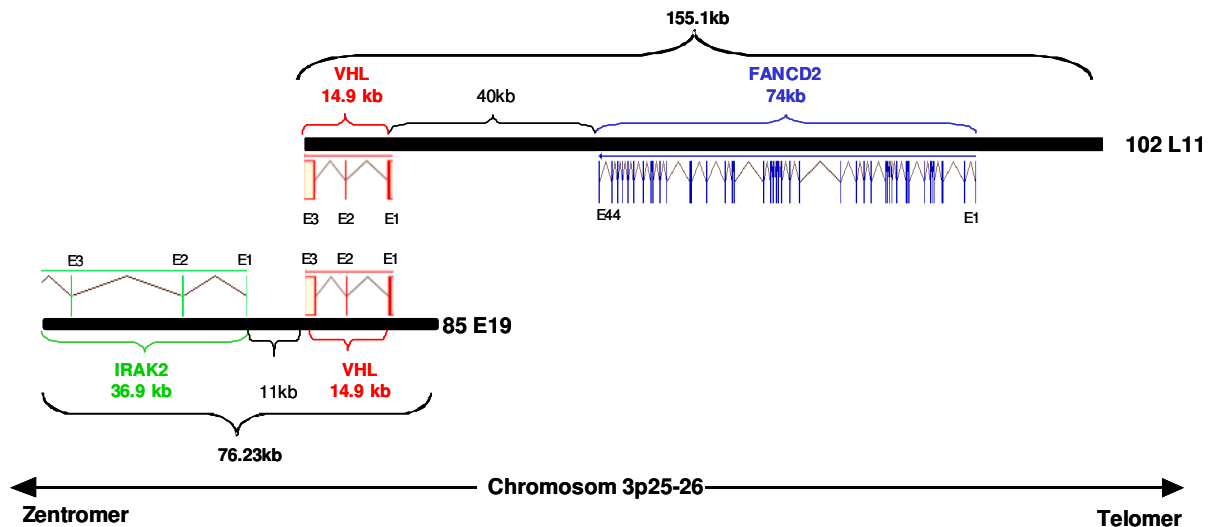


Abbildung 23: Maßstabsgerechte Schemadarstellung der genomischen Lage der PAC-Klone 85E19 und 102L11 zueinander. Die Exons der eingezeichneten Gene sind mit E gekennzeichnet. Farbige Balken stellen die genomische Lokalisation und Ausdehnung der enthaltenen Gene dar. *IRAK2* ist auf Klon 85E19 nur mit den ersten 3 Exons vertreten, während *FANCD2* vollständig auf Klon 102L11 enthalten ist (nur erstes und letztes Exon sind beschriftet). Verändert nach (Düsterhöft, 2002).

4.3 Strukturelle Chromosomenveränderungen

4.3.1 Ergebnisse der M-FISH Studien

M-FISH diente zur Untersuchung eines primären, klarzelligen Nierenkarzinoms und einer klarzelligen Zelllinie (KTCTL-26A). Das primäre Karzinom ST-763 zeigte numerische Zugewinne der Chromosomen 5, 7, 11, 16 und 20. Das Ergebnis deckt sich mit den Befunden der CGH Analyse, die den Zugewinn dieser Chromosomen ebenfalls detektierte. Verluste von Chromosomen oder Chromosomenregionen wurden nicht nachgewiesen. Das Karzinom zeigte den folgenden Karyotyp: 51,XY,+5,+5,+7,+16,+20 [7].

In der klarzelligen Nierenzelllinie KTCTL-26A fanden sich die Translokationen [t(3;13)], [t(3;4)] und [t(5;9)] und numerische Zugewinne der Chromosomen 7 und 16. Verloren gingen die Chromosomen 21 und 22 sowie das Y-Chromosom. Die mit M-FISH identifizierte Translokation [t(3;4)] ist bisher unbeschrieben. Die Translokationen [t(3;13)] und t(5;9)] konnten mit zytogenetischen Analysen nachgewiesen werden (Högemann et al., 1994). Die chromosomale Struktur wurde durch Analyse der DAPI (Diaminophenylindol)- Bandierungsbuster der Chromosomen überprüft.

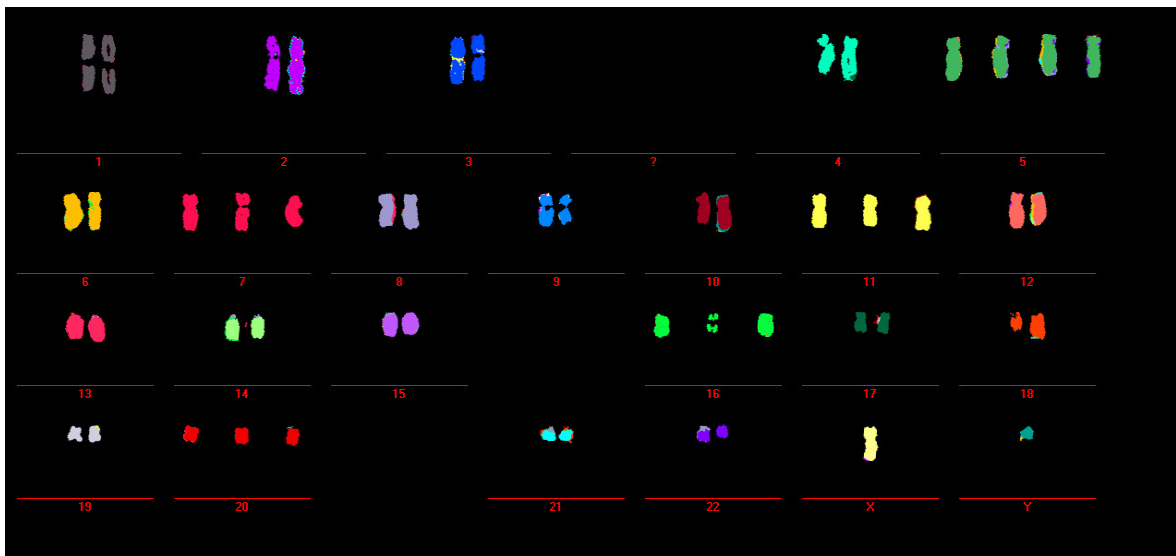


Abbildung 24: M-FISH Ergebnis des klarzelligen primären Nierenkarzinoms. Dargestellt ist ein vollständiger Karyotyp, präpariert aus kurzzeit-kultivierten Zellen des Primärtumors ST-763. Für diesen Tumor lagen CGH Daten vor. In Übereinstimmung mit der M-FISH Analyse fanden sich die Zugewinne der Chromosomen 5, 7, 11, 16 und 20.

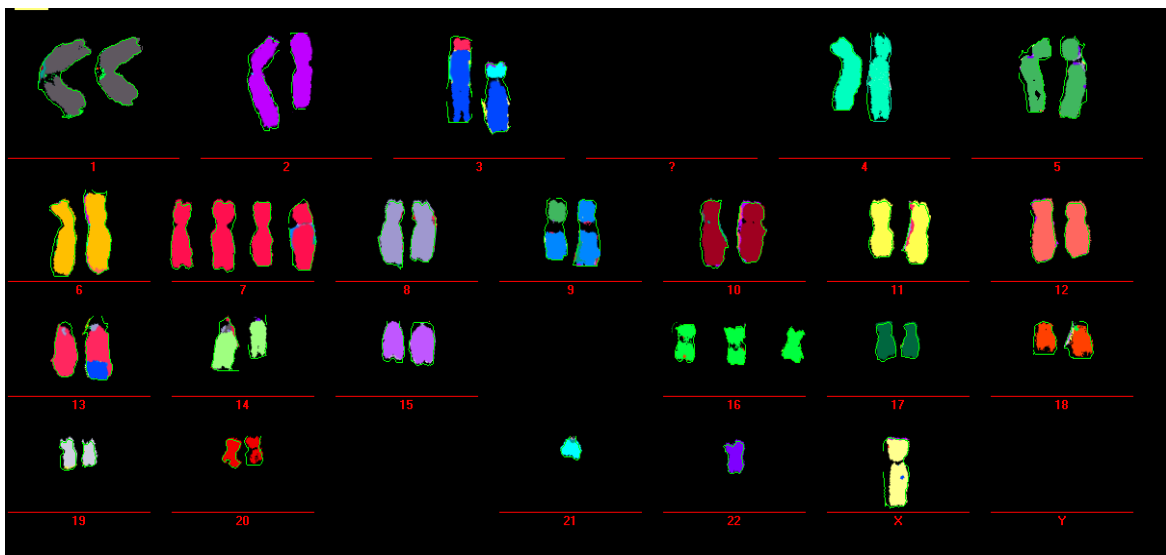


Abbildung 25: M-FISH Ergebnis der klarzelligen Zelllinie KTCTL-26A. Abgebildet ist ein hyperdiploider Karyotyp. Translokationen [t(3;13)], [t(3;4)] und [t(5;9)] sind zu erkennen. Die Chromosomen 7 und 16 sind vierfach bzw dreifach vorhanden. Die Chromosomen 21 und 22 sind nur einfach vorhanden. Das Y-Chromosom geht verloren. Das Chromosom 2 erscheint verkürzt. Zytogenetische Analysen (G-Bandierung) belegten in der Stammlinie die del(2)(p21) (Högemann et al. 1994).

4.3.2 Untersuchungen am familiären Nierenkarzinom

Bei zwei am klarzelligen Nierenkarzinom erkrankten Mitgliedern einer für das Nierenkarzinom prädisponierten Familie konnte durch Sequenzanalyse der Verlust des *VHL* Tumorsuppressorgens ausgeschlossen werden. Die Sequenzdaten des kodierenden Bereichs von *VHL* zeigten bei beiden Patienten die wildtypische *VHL*-Sequenz.

Aus peripherem Blut beider Patienten wurden Metaphase-Präparate gewonnen und mit konventioneller Zytogenetik (GTG-Bandierung) analysiert. Resultat dieser Analysen war die Identifikation einer reziproken Translokation zwischen den Chromosomen 3 und 8 und Auffälligkeiten des derivativen Chromosoms 3.

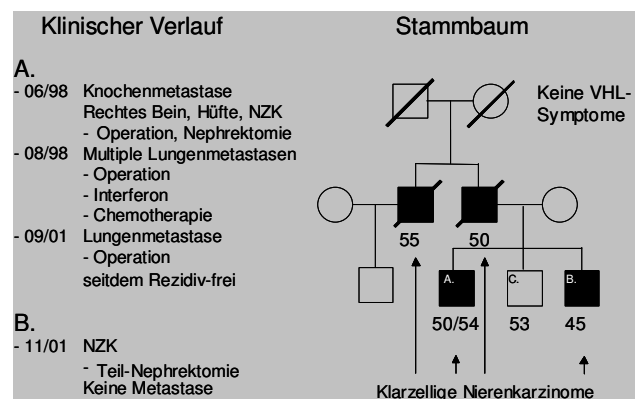


Abbildung 26: Familienstammbaum und klinischer Verlauf der drei untersuchten Patienten. Patient A und B sowie der nicht erkrankte Bruder C konnten zytogenetisch untersucht werden. Vater und Onkel der drei Brüder erkrankten und verstarben an einem Nierenkarzinom. Die Tumorerkrankung geht mit der Translokation $t(3;8)$ einher und zeigt keine zusätzlichen Symptome einer *VHL*-Erkrankung (geändert nach Decker et al., 2002).

Die Häufung des klarzelligen Nierenkarzinoms innerhalb der untersuchten Familie und die Kopplung der gefundenen chromosomalen Alteration mit der Erkrankung legt den Schluß einer ursächliche Beteiligung der Chromosomentranslokation an der Erkrankung des Vaters und Onkels der Patienten nahe ([Abbildung 26](#)).

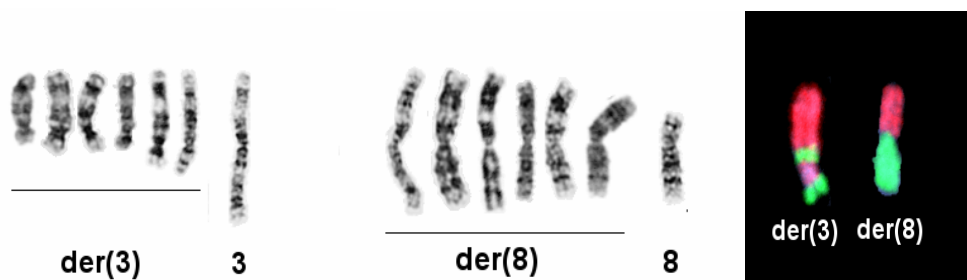


Abbildung 27: Die in beiden Patienten konstitutionell vorhandene Translokation $t(3;8)(q13;p21)$ wurde mit Giemsa-Bandierung nachgewiesen. $der(3)$ und $der(8)$ unterschiedlicher Metaphasen sind neben den korrespondierenden Normalchromosomen abgebildet. Die Fluoreszenz-Doppel-Hybridisierung mit „whole chromosome painting“-Sonden für Chromosom 3 (rot) und 8 (grün) bestätigte den zytogenetischen Befund und belegte zudem ein 2-Schritt Translokationsereignis mit nachgeschalteter perizentrischer Inversion des derivativen Chromosoms 3.

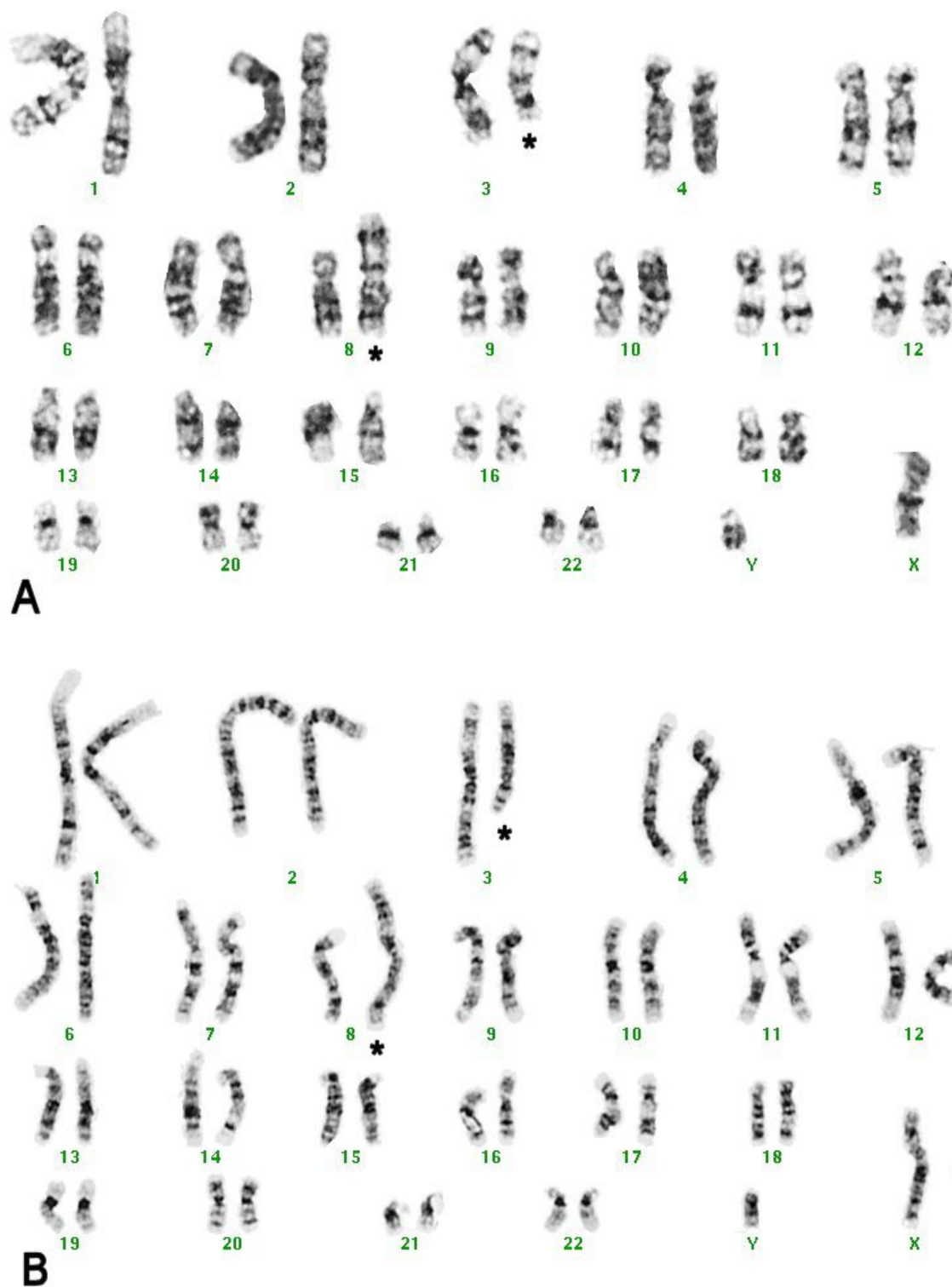


Abbildung 28: Konstitutionelle Giemsa gefärbte Karyotypen (GTG-Bandierung) unterschiedlicher Kondensierungsstadien der beiden am NZK erkrankten Brüder (A und B). Die Isolation der Chromosomen erfolgte aus Phytohämagglutinin (PHA) stimulierten B-Lymphozyten des peripheren Blutes. Die durch reziproke Translokation entstandenen Derivatvchromosomen sind durch einen Stern gekennzeichnet. Der zytogenetisch unauffällige Bruder erkrankte nicht am Nierenkarzinom.

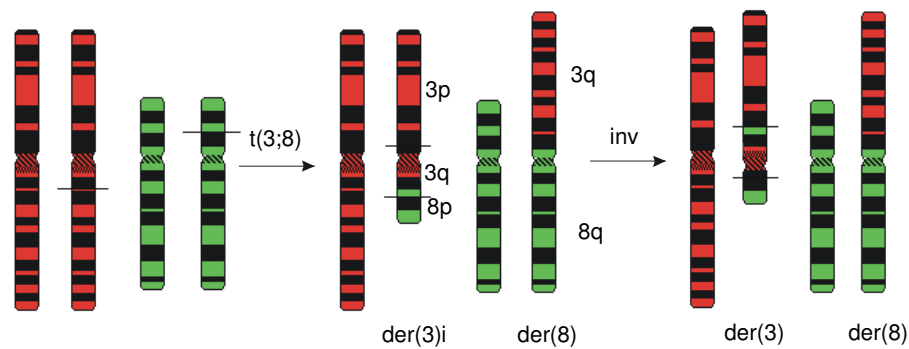


Abbildung 29: Schematische Darstellung des postulierten Rearrangement-Vorganges zwischen Chromosom 3 (rot) und Chromosom 8 (grün). Die initiale reziproke Translokation führt zu einem $der(8)$ und einem intermediären, hypothetischen $der(3)i$, welches nach erneutem Bruch und perizentrischer Inversion das tatsächlich wiedergefundene $der(3)$ bildet.

Ergänzend zu den Untersuchungen mit konventioneller Zytogenetik und FISH-Analytik mit chromosomenspezifischen Sonden konnte durch M-FISH das Rearrangement zwischen den Chromosomen 3 und 8 bestätigt werden. Weitere translozierte Chromosomen wurden, wie auch in der GTG-Bandierung, nicht gefunden.

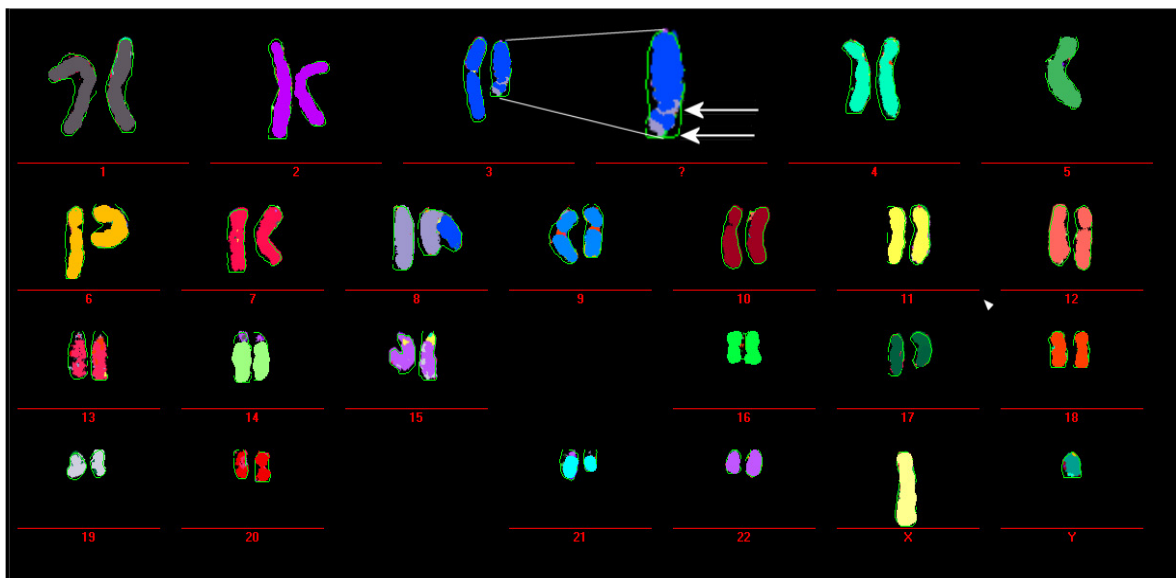


Abbildung 30: Multiplex-FISH Hybridisierung auf Chromosomen des Patienten B. Einzige erkennbare Auffälligkeiten sind die aus der Translokation $t(3;8)$ resultierenden Derivat-Chromosomen. Das nur einfach abgebildete Chromosom 5 resultiert aus der Präparationstechnik der Chromosomen. In anderen Metaphasen der gleichen Präparation waren die Chromosomen 5 stets in zwei Kopien vorhanden (siehe Seite 79). Betrachtet man das Derivatchromosom 3 (siehe Vergrößerung mit Pfeilen), so lässt sich das insertierte und terminale Chromosom 8 Material erkennen.

4.3.3 FISH-Untersuchung auf *VHL*-Allelverlust

Der Verlust des *VHL*-Tumorsuppressors (3p25-26) und dessen Relevanz für die Entwicklung eines klarzelligen Nierenkarzinoms ist vielfach beschrieben (Decker et al., 1989; Yamakawa et al., 1991; Gnarr et al., 1993; Prowse et al., 1997; Moch et al., 1998b). *VHL* Allelverlust könnte durch Hybridisierung mit den in 4.2.2 beschriebenen genomischen Fragmenten in sporadischen Tumoren nachgewiesen werden und in unklaren Fällen der Klassifizierung die Differenzialdiagnostik erleichtern.

Zudem liegt in bis zu 20 % aller *VHL*-Erkrankungen ein monoallelischer Verlust von *VHL* in allen Körperzellen vor (Pack et al., 1999). Bisher wurden in *VHL*-Verdachtsfällen quantitative *Southern*-Untersuchungen (Stolle et al., 1998), SSCP- („*single strand conformation polymorphism*“), RFLP- („*restriction fragment length polymorphism*“), Sequenz- oder LOH-Analysen durchgeführt. Mit Ausnahme der quantitativen *Southern* Untersuchung besitzen diese Methoden bei konstitutionellem Fehlen eines Allels keine Aussagekraft. In Patienten, die Symptome des *VHL*-Syndroms entwickeln, deren *VHL*-Sequenzanalyse aber keinen auffälligen Befund zeigen, könnte eine FISH (Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung)-Sonde zur Detektion monoallelischer *VHL*-Deletionen in konstitutionellen Metaphasen die bestehende diagnostische Lücke schliessen (Pack et al., 1999). Es wurde daher versucht, die isolierten genomischen Sonden des *VHL* Lokus (siehe Kap. 4.2.2) zur Etablierung einer *VHL*-FISH zu nutzen.

Die durch *Nick-Translation* fluoreszenzmarkierten *VHL*-Sonden wurden zur Ermittlung der Spezifität und Sensitivität zunächst auf Normalchromosomen (46, XY) hybridisiert. In 93% aller untersuchten Metaphasen konnten mit der Sonde 102L11 die erwarteten zwei Signale auf Chromosom 3p25-p26 detektiert werden. In Interphasekernen war die Signalauswertung wegen der größeren räumlichen Ausdehnung des Chromatins der Kernpräparate in die Z-Achse aufwändiger. Die Auswertung ergab in normalen Interphasekernen innerhalb einer Fokusebene eine 70 prozentige Nachweisbarkeit von zwei Signalen. Die problematische Nachweisgrenze in Interphase-Chromatin führte dazu, dass in weiteren Analysen von Patientenmaterial ausschließlich Metaphasespreitungen genutzt wurden. Zudem wurden Chromosomen eines zuvor mittels CGH als Chromosom 3p25-26 unterrepräsentiert charakterisierten Nierenkarzinoms als Hybridisierungsobjekt gewählt, um einen Allelverlust darzustellen. Hier war in 70% aller untersuchten Metaphasen ein Allelverlust nachweisbar.

Die Analyse von Interphasekernen der Primärtumorpräparation wies naturgemäß die gleiche Problematik auf, wie sie bei der Analyse unauffälliger Karyotypen bestand. Auch hier trat das Problem auf, dass in der gemittelten fokalen Ebene nicht alle vorhandenen Kernsignale der FISH-Sonde abbildbar waren. Zusätzlich zu den gefundenen zwei Signalen pro Kern konnten bei der Analyse des Nierenkarzinoms noch Kerne detektiert werden, die nur ein oder aber kein Signal besaßen.

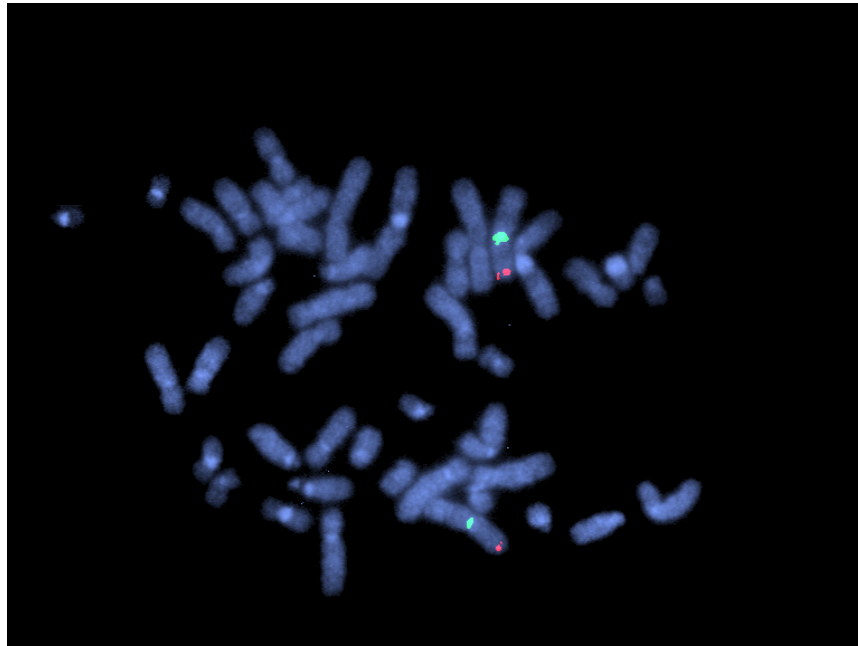


Abbildung 31: Hybridisierungsergebnis fluoreszenzmarkierter *VHL*-Sonde (102L11, 155kb) auf männlichen Metaphasechromosomen (46, XY). Die beiden rot dargestellten Signale der Sonden-DNA sind auf der mit DAPI gegengefärbten Metaphase deutlich auf der Chromosomenregion 3p25-p26 zu erkennen. Ko-hybridisiert wurde grün markierte alpha-Satelliten DNA (CEP3, *chromosome enumeration probe chromosome 3*). In 93% aller so erfassten Metaphasepräparate wurden zwei Signale detektiert.

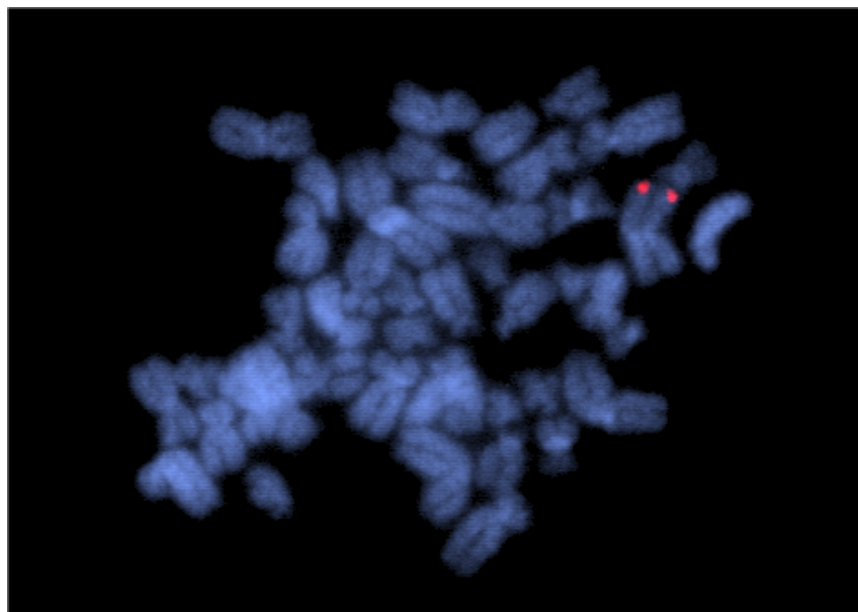


Abbildung 32: FISH mit *VHL*-Sonde 102L11 auf primäre Nierentumorzellen mit bereits bekannter Chromosom 3p25-p26 Defizienz. Die Zellen wurden mit DAPI gegengefärbt. Das Ausbleiben des zweiten Signals auf Chromosom 3p wird ersichtlich. Die Hybridisierung diente zum Nachweis des Detektionsvermögens von Deletionen.

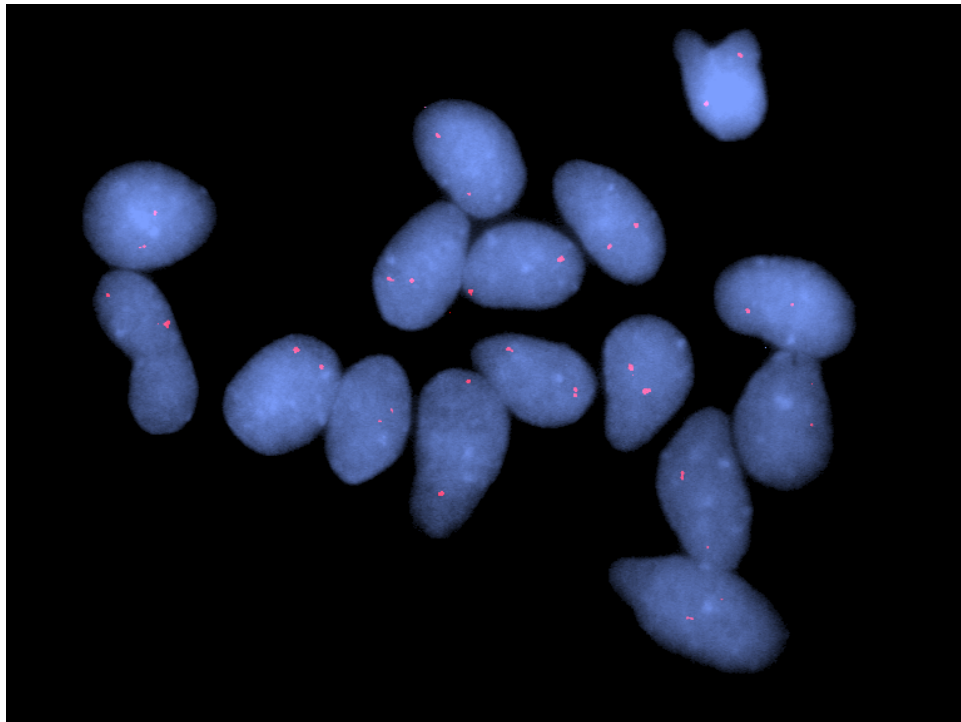


Abbildung 33: Hybridisierungsergebnis fluoreszenzmarkierter *VHL*-Sonde (102L11, 155kb) auf männlichen Interphasekernen (46, XY). Beide rot dargestellten Signale der Sonden-DNA sind auf den mit DAPI gegengefärbten Zellkernen zu erkennen. Die Auswertung von Interphasekernen war nicht immer derart eindeutig. Die Erkennungsrate zweier Signale in gemittelter Fokusebene lag bei normalen Interphasekernen (46, XY) durchschnittlich bei etwa 70%.

4.3.4 Analyse von Patientenmaterial

Patienten, die die Symptome der VHL-Erkrankung entwickeln und in der Sequenzanalyse von *VHL* unauffällig sind, stellen das Kollektiv dar, das mit der hergestellten Sonde auf eine konstitutionell-monoallelische Deletion von VHL untersucht werden sollte. Zu diesem Zweck konnten bisher von mehreren potenziellen VHL-Patienten Blutlymphozyten in Kultur genommen und Metaphasechromosomen geerntet werden. Die Blutchromosomen wurden dann mittels *VHL*-FISH analysiert. Die Deletion des genomischen Segments des *VHL*-Allels und der benachbarten Gene wird sich anhand nur eines Hybridisierungssignals darstellen.

Von bisher untersuchten zwölf VHL-Syndrom verdächtigen Patienten konnte bisher bei einer Patientin ein Mosaik für *VHL*-Allelverlust detektiert werden. Bei den restlichen untersuchten Patienten wurden Normalbefunde (zwei Signale) nachgewiesen.

5 Diskussion

Zur Erfassung genetischer Veränderungen von Tumoren stehen verschiedene Methoden zur Auswahl (siehe Abbildung 34). Jede Methode eignet sich zur Beantwortung sehr spezieller Fragestellungen. Gegenstand der vorliegenden Arbeit war die Suche nach tumorassoziiert auftretenden Genomveränderungen. Als Ausgangspunkt der Untersuchung stand niedergefrorenes Tumormaterial zur Verfügung und die Analyse genomischer DNA aus diesem Material sollte im Mittelpunkt der Arbeit stehen. Als zentrale genetische Methode wurde in dieser Arbeit die komparative genomische Hybridisierung (*comparative genomic hybridization*, CGH) gewählt. Dieses Analyseverfahren besitzt zwei Eigenschaften, die es als ideal geeignet zur Klärung der vorliegenden Problemstellung kennzeichnet: 1.) es ist unabhängig von vitalen Tumorzellen und ist 2.) in der Lage, genomweit chromosomale Zugewinne oder –Verluste zu detektieren.

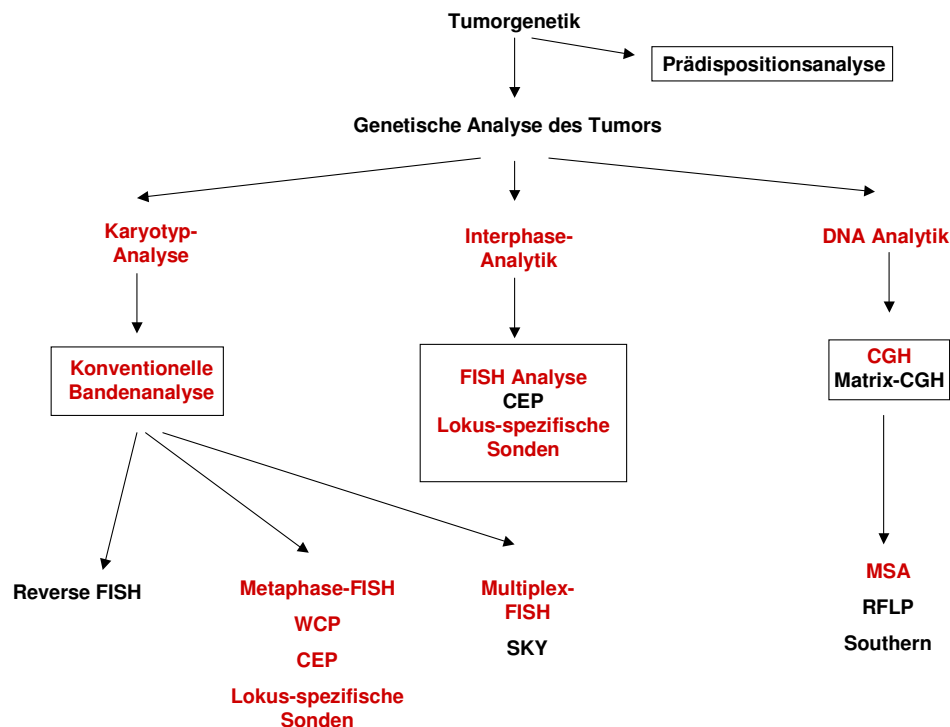


Abbildung 34: Unterschiedliche Möglichkeiten der Untersuchung des Tumorgenoms. In dieser Arbeit durchgeführte Techniken sind farblich hervorgehoben. MSA = Mikrosatellitenanalyse, WCP = *whole chromosome paint*, CEP = *chromosome enumeration probe*, RFLP = *restriction fragment length polymorphism*, FISH = *fluorescence in situ hybridization*.

Die CGH Untersuchung der vorliegenden Arbeit lieferte eine Vielzahl subtypspezifischer Zugewinne oder Verluste des Tumorgenoms. Bei dem Bestreben, Regionen von Interesse

zu definieren, die eine weitere Eingrenzung tumorrelevanter Gene aussichtsreich erscheinen ließen, sind zwei Genombereiche besonders hervorzuheben:

Eine Region, die durch initiale CGH Charakterisierung in den Fokus der Untersuchung rückte, ist die Region 3p25-26. Dieser Chromosomenbereich befindet sich in 63% aller untersuchten klarzelligen Nierenkarzinome innerhalb einer kleinsten gemeinsam deletierten Region auf 3p24-pter. Diese Region beinhaltet das für die Tumorinitiation des klarzelligen Karzinoms wesentliche *VHL* Tumorsuppressorgen. In der Literatur besteht weitgehend Übereinstimmung, dass weitere tumorsuppressiv wirkende Gene auf Chromosom 3p lokalisieren, denen in der Tumorentwicklung des klarzelligen Karzinoms Bedeutung zukommen muss.

Fakten, die für einen *VHL* unabhängigen Mechanismus der Nierentumorentwicklung sprechen sind

- der in sporadischen / familiären klarzelligen Karzinomen feststellbare, ausgedehnte Verlust des Chromosoms 3p,
- der Befund, dass 30% der untersuchten sporadischen Tumoren keine *VHL*-Veränderung aufweisen (für die restlichen etwa 70% der Tumoren wurden *VHL*-Genmutationen oder eine epigenetische Inaktivierung des *VHL* Promotors festgestellt).
- Die Tatsache, dass das biologische Verhalten der klarzelligen Karzinome mit und ohne *VHL*-Mutation identisch ist.

Zur genaueren Charakterisierung des *VHL* umgebenden Genombereichs wurden zusammen mit Silke Düsterhöft genomische Fragmente isoliert und charakterisiert (Düsterhöft, 2002). Diese Fragmente und ihr Einsatz als Sonden erlauben künftig eine Deletionskartierung der Region 3p25-26 sowohl durch Fluoreszenz- wie auch durch Southern-Analytik. Zudem ist es nun möglich, aufbauend auf bestehenden Sonden weitere, Gen-spezifischere Sonden zu entwickeln.

Der zweite Genombereich, dem unser besonderes Interesse galt, war das Chromosom 14, das in 30 Prozent aller klarzelligen Karzinome unterrepräsentiert ist. Der Verlust dieses Chromsoms wurde zuvor mit Tumorprogression und ungünstiger Prognose in Verbindung gebracht (Beroud et al., 1996; Wu et al., 1996). Durch Mikrosatellitenanalyse (MSA) mit fünfzehn eng einander benachbarter polymorpher Marker wurde zusammen mit Sabine Kleikamp (Kleikamp, 2001) der gesamte lange Arm des Chromosoms in feinem Raster auf Allelverluste untersucht. Ziel war hierbei, Regionen kleinsten gemeinsamen Allel-Verlustes einzugrenzen. Solche Regionen enthalten oft Tumorsuppressorgene oder Mutatoren, die mit hoher Wahrscheinlichkeit Relevanz für das untersuchte Tumorkollektiv besitzen.

5.1 Untersuchungsmethoden des Tumor-Genoms und ihre Limitationen

Das Methodenrepertoire zur Untersuchung genomischer DNA reicht von der konventionellen, zytogenetischen Analyse von Metaphasechromosomen über die Analyse von Interphasechromatin bis hin zur molekularen Charakterisierung umschriebener DNA-Abschnitte, die auch ihre Sequenzierung umfassen kann. Die Analyse tumorassoziierter Genomveränderungen bedient sich meist eines vergleichenden Ansatzes, der die DNA von Normalgewebe und die DNA korrespondierenden Tumorgewebes zueinander in Beziehung setzt, um die tumorauslösende Gen-/Genomveränderungen einzugrenzen.

Bei der Chromosomenanalyse erreicht man durch die Darstellung von mehreren hundert Banden an den Metaphasechromosomen unter optimalen Bedingungen ein Auflösungsvermögen von 5-20 Mb. Damit ist die konventionelle Zytogenetik genomüberspannend in der Lage, Chromosomenverluste und -Zugewinne, größere Deletionen und Translokationen zu detektieren. Die Abhängigkeit von sich teilenden Tumorzellen macht die Methode anspruchsvoll, denn bei der Zell-Kultivierung muss auf mitosestimulierende Reagenzien verzichtet werden, um Kultur-Artefakte zu vermeiden. Ferner proliferieren primäre Tumorzellen *in vitro* entgegen ihrem Wachstumsverhalten *in situ* oft weniger stark. Vorteil der Chromosomenanalyse ist die Möglichkeit, in einzelnen Zellen numerische und strukturelle Anomalien darzustellen. Die Erfassung tumorassoziierter Genomveränderungen durch Zytogenetik ist von besonderer Bedeutung. Derart gewonnene, klonale Strukturinformationen sind mit keiner anderen Methode zu erhalten. Die aufgezeigten Limitationen und die geringe Verfügbarkeit von vitalem Tumor-/Normalgewebe sind jedoch Gründe der häufigeren Anwendung molekulargenetischer Methoden gegenüber zytogenetischen Untersuchungen von Tumormaterial.

Die konventionelle Zytogenetik wurde als Methode genomweiter Untersuchung von Tumorzellen durch Vorstellung der CGH („*comparative genomic hybridization*“), einer molekular-zytogenetischen Technik, ergänzt (Kallioniemi et al., 1992). Es wurde so möglich, retrospektiv Genom-Analysen eines großen Reservoirs konservierter, pathologisch gut charakterisierter Tumorproben durchzuführen. Genomimbilanzen in einer Vielzahl solider Tumoren, so auch des Nierentumors, konnten so erfasst werden. Da die Methode auf der quantitativen Analyse von Tumor-DNA basiert, können chromosomale Strukturinformationen des Tumorgenoms verloren gehen. Zudem werden Malignom-spezifische Befunde nur dann erfasst, wenn der Tumoranteil im untersuchten Gewebe hoch genug ist.

M-FISH (Multiplex Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung) oder SKY („*spectral karyotyping*“) stellen mittels Fluoreszenz-kodierter Markierung von DNA interchromosomale, strukturelle Veränderungen an Chromosomen dar, die mit konventioneller Zytogenetik nur schwer aufklärbar sind. Solche komplex aufgebauten Chromosomen werden als Markerchromosomen definiert. M-FISH eignet sich zur Darstellung komplexer, balanzierter und unbalanzierter Rearrangements. Intrachromosomale Umordnungen wie Inversionen, Duplikationen oder Deletionen, sofern sie nicht grundlegend die

Chromosomenmorphologie verändern, entgehen der Detektion durch M-FISH, da die Methode aufgrund des chromosomenspezifischen Markierungskonzeptes nicht in der Lage ist, derartige Veränderungen zu erfassen.

Eine Modifikation der M-FISH stellt die Adaptation des kombinatorischen Markierungsverfahrens auf zytogenetische Banden dar (multibanding FISH) (Chudoba et al., 1999). Durch Mikrodissektion gewonnene, bandenspezifische DNA-Fragmente werden als Grundlage einer kombinatorischen Markierung verwendet. Resultat der Hybridisierung so markierter DNA ist ein Chromosomenbanden-spezifisches Farbmuster interessierender Chromosomen. Für jedes humane Chromosom konnten bandenspezifische Bibliotheken hergestellt werden (Liehr et al., 2002). Voraussetzung für die Anwendung der sogenannten „Multi-banding FISH“ ist die Kenntnis der vom Rearrangement betroffenen Chromosomenanteile. Außerdem wird dieses aufwändige Verfahren - das zwar theoretisch die Limitation der M-FISH bezüglich der Detektion intrachromosomaler Rearrangements aufhebt - bisher nur in wenigen spezialisierten Labors an ausgesuchten Einzelfällen praktiziert.

Die Untersuchungsmöglichkeiten an Interphasekernen sind limitiert. Sie beschränken sich auf die FISH-Analyse zum numerischen Nachweis spezifischer Loci oder Chromosomenbereiche.

Von großer Relevanz für die Erforschung des Tumorgenoms sind RFLP- bzw. Mikrosatelliten-Analysen (MSA) als Mittel zum Nachweis von Allelverlust („*loss of heterozygosity*“, LOH) beim Vergleich korrespondierender Normal-/Tumor-DNA Paare. Die Methoden werden meist nur gezielt zur Untersuchung umschriebener genomischer Bereiche eingesetzt. Eine genomabdeckende Analyse vieler Tumoren ist mit diesen Verfahren möglich, bedeutet aber einen erheblichen zeitlichen und personellen Aufwand. Die Entwicklung genomweit detektierender, chipbasierter Techniken wie Matrix-CGH (Solinas-Toldo et al., 1997; Wessendorf et al., 2003) oder Array-RDA (*representational difference analysis*) (Lucito et al., 2000) sind kennzeichnend für den Bedarf, alternative molekulare Techniken der Genomuntersuchung zu etablieren. Mit beiden genannten Verfahren werden bereits genomische Auflösungen von 1Mb (Matrix-CGH) bis hin zu 100kb (Array-RDA) erreicht. Eine weitere Erhöhung des Auflösungsvermögens befindet sich in Entwicklung.

5.2 Untersuchungen an Zelllinien

Zelllinien dienen in vielen Fällen als Modellsysteme zur Transkriptom- und Proteom-Untersuchung verschiedenster Tumorerkrankungen. Die vorliegende Arbeit befasste sich in erster Linie mit der Analyse primären Tumormaterials. In Ergänzung dazu wurden aber auch Zelllinien charakterisiert. Dabei ließen sich folgende generellen Beobachtungen machen:

Zelllinien des Nierenkarzinoms spiegeln, obwohl in einem von den *in vivo* Wachstumsbedingungen entfernten System, weitgehend die einmal erworbenen genomischen Veränderungen wider. Beobachtet werden konnte, dass sich Genom-

Repräsentationen von aus Primärtumoren etablierten Zelllinien mit fortschreitender Passagenzahl verändern (eigene Beobachtung). Expansion von Zellpopulationen, die aufgrund ihrer genetischen Ausstattung Zellkulturbedingungen besser tolerieren können, machen sich im CGH-Profilvergleich von primären Karzinom und passagierten Linien bemerkbar. Dabei sind die Veränderungen oft graduell. Einmal detektierte Imbalancen können sich verstärken oder abschwächen.

Die Tendenz zur Vervielfältigung genomischer Bereiche bis hin zu starken Zugewinnen oder zu Verlusten chromosomaler Regionen ist in den untersuchten Zelllinien des Nierenkarzinoms deutlicher ausgeprägt als in den untersuchten Primärtumoren. Dabei spiegelt sich die durch Selektionsmechanismen hervorgerufene Elimination genetisch heterogener Klone wider. Die in dieser Arbeit untersuchten Zelllinien durchliefen nicht mehr nachvollziehbare Passagierungen und konnten so den best-angepassten Klon mit korrespondierendem Genotyp in der Zellpopulation anreichern. Ein CGH Profil eines Primärtumors, das Genom-Repräsentationen vieler genetisch heterogener Einzelklone integriert, kann demzufolge keine so eindeutigen Imbalanzschwankungen aufweisen, wie sie in klonal konstituierten Zelllinien zu beobachten sind.

Karzinomlinien, die einmal vollständige Differenzierung aufwiesen, konnten im Laufe der Tumorprogression eine variable Zahl chromosomaler Verluste und Zugewinne ansammeln.

Dem gegenüber ist die aus mesodermalem Blastem der Niere etablierte Linie HEK 293 ein Beispiel einer Zelllinie mit wenigen genomischen Veränderungen. Es muss eingeräumt werden, dass aus einer einzelnen mesodermalen Nierenzelllinie keine Regelmäßigkeit hinsichtlich Genom-Stabilität abgeleitet werden kann. Geht man allerdings davon aus, dass der Selektionseffekt von Kulturbedingungen einen weitestgehend gleichbleibenden Parameter darstellt, so muss aufgrund geringer Genom-Imbalancen von HEK293 ein Neuerwerb von Genomveränderungen während der Zellkultur als seltenes Ereignis angesehen werden.

Neuere molekular-zytogenetische Untersuchungen bestätigen den Befund, dass Nierenzellkarzinome fortgeschrittenen Stadiums ihren chromosomalen Status unter Kulturbedingungen verändern können (Pavlovich et al., 2003). Molekulare Sequenzuntersuchungen des *VHL*-Tumorsuppressors sowie des *MET*-Onkogens ergänzten diese Studie. In allen Zelllinien fand sich die Mehrheit der in primären Tumoren gefundenen Veränderungen beibehalten. Die Studie belegte zudem, daß 17 Prozent der in Primärtumoren gefundenen, numerischen Aberrationen in den daraus etablierten Linien (15-25 Passagen) nicht mehr bestätigt werden konnten. In 40 Prozent aller Zelllinien zeigte sich eine Zunahme chromosomaler Imbalancen. Auch dieser Befund ist mit hoher Wahrscheinlichkeit auf einen Selektions-Effekt zurückzuführen, der aggressive Subklone des heterogenen Tumors bevorteilt.

5.3 Untersuchungen epithelialer Nierentumoren

Klassische Verfahren der Klassifikation und Diagnostik von Nierentumoren beruhen auf der Bewertung zytologisch-histologischer Merkmale (Mostofi und Davis, 1998; Thoenes et

al., 1986). Dabei stellen die anzutreffenden Übergangsformen zwischen den definierten Karzinom-Subtypen ein Problem dar. Zugleich erschwert die inter- und intratumorale morphologische Heterogenität eine eindeutige Typisierung. In bis zu 20% der Fälle ist daher eine exakte histologische Diagnose unsicher oder sogar unmöglich (Kovacs, 1999). Aus diesen Gründen wurde versucht, neben morphologischen Kriterien weitere Parameter zu etablieren, die eine eindeutigere Diagnose und Klassifikation zulassen. Immunhistochemische und elektronenmikroskopische Untersuchungen untermauerten die von Thoenes und Störkel aufgrund zytologisch-histologischer Kriterien getroffene Klassifikation und erlaubten zugleich eine histogenetische Zuordnung der einzelnen Subtypen zum Entstehungsort im Nephron (Thoenes et al., 1990a).

Ergänzend konnten zytogenetische Studien belegen, dass es möglich ist, jedem Subtyp ein charakteristisches genetisches Muster zuzuordnen (vgl. Tabelle 4 und Tabelle 5). Die neuen Erkenntnisse flossen dann in eine Klassifikation ein, die morphologische und genetische Merkmale in die Typisierung der Karzinome integriert. Dabei werden Karzinome der Niere als Entitäten gewertet, deren histologische Klassifikation mit aktuellen genetischen Erkenntnissen übereinstimmen (Störkel et al., 1997; Kovacs et al., 1997).

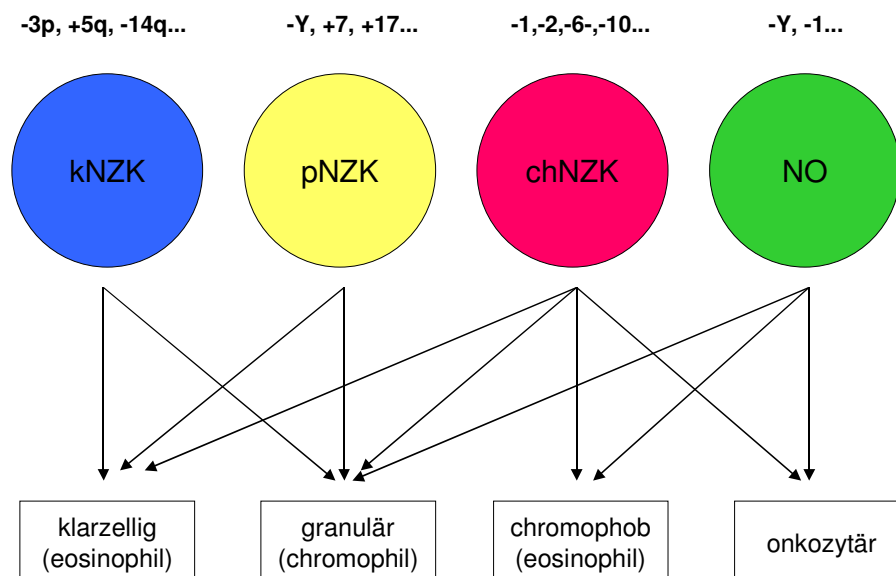


Abbildung 35: Vergleichsweise konstante genetische Charakteristika der einzelnen Nierentumor Subtypen stehen einer oft zu beobachtenden Überlappung morphologischer Charakteristika der Tumoren gegenüber, die eine histologische Typisierung erschweren (kNZK = klarzelliges (konventionelles) Nierenzellkarzinom, pNZK = papilläres Nierenzellkarzinom, chNZK = chromophobes Nierenzellkarzinom, NO = Onkozytom der Niere) Verändert nach (Kovacs, 1999).

Tabelle 27: Gegenüberstellung der Nierentumor-Klassifikationen. Die in dieser Arbeit verwendete Nomenklatur orientiert sich an der UICC/AJCC oder Heidelberg Klassifikation.

WHO 1981	WHO 1998 ⁴	UICC/AJCC (1997) ⁵	Heidelberg Klassifikation ⁶ (1997)
Nierenadenome	Metanephrisches Adenom Tubulo-papilläres Adenom Onkozytom	Metanephrisches Adenom Papilläres Adenom Onkozytom	Metanephrogenes Adenom Papilläres Adenom Onkozytom
Nierenkarzinome	Klarzelliges Karzinom Papilläres Karzinom Chromophobes Karzinom Sammelgang Karzinom Granuläres Karzinom Spindelzell-Karzinom Zysten-assoziiertes Karzinom	Klarzelliges (konvention.) Karzinom Papilläres (chromophiles) Karzinom Chromophobes Karzinom Sammelgang Karzinom Unklassifiziertes Karzinom	Konventionelles Karzinom Papilläres Karzinom Chromophobes Karzinom Sammelrohr Karzinom Nicht klassifizierbare Karzinome

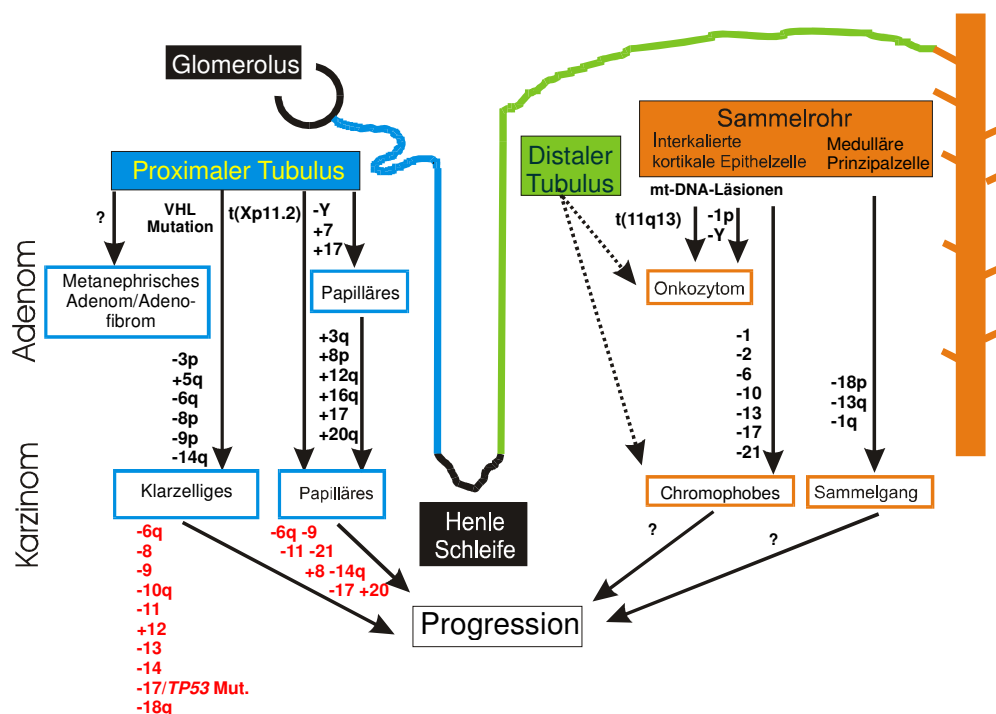


Abbildung 36: Zuordnung der Subtypen der Nierenzell-Adenome und -Karzinome zu definierten Nephronabschnitten. Zugleich sind charakteristische Chromosomenveränderungen nach der Heidelberg Klassifikation angegeben. Das Ursprungsgewebe des Onkozytoms und des chromophoben Karzinoms wird kontrovers diskutiert: Während einige Autoren den distalen tubulären Abschnitt als Entstehungsort dieser Subtypen ansehen, legen ultrastrukturelle und immunhistologische Daten den Ursprung der beiden Tumoren im Sammelrohrsystem nahe (Ortmann et al., 1991; Störkel et al., 1989; Störkel et al., 1988; Thoenes et al., 1990b). Die in der Literatur als Progressions-assoziiert beschriebenen und in der vorliegenden Arbeit ebenfalls identifizierten genetischen Veränderungen sind rot dargestellt. Einzige auch histopathologisch nachweisbare Adenom-Karzinom Sequenz weist der papilläre Subtyp auf. Verändert nach (Bodmer et al., 2002b).

⁴ (Mostofi and Davis, 1998)

⁵ (Störkel et al., 1997)

⁶ (Kovacs et al., 1997b)

Analog zum Modell der Onkogenese des Kolorektalkarzinoms wurden von verschiedenen Autoren onkogenetische Modelle des Nierenkarzinoms entwickelt (Kovacs, 1993a; van den Berg et al., 1997; Störkel, 1999).

Die von van den Berg und Mitarbeitern vorgestellte (zyto-)genetische Klassifikation der Nierentumoren ordnet erstmals genetische Befunde allen vier Karzinomen und dem Onkozytom zu. Zudem betteten van den Berg und Koautoren die genetischen Veränderungen der Karzinome in eine hypothetische Adenom-Karzinom Sequenz ein (van den Berg et al., 1997), die sich bisher allerdings nur im Falle des papillären Karzinoms überzeugend belegen lies. Das Modell wurde später mit aktuellen genetischen Daten ergänzt und behielt dabei wesentliche Charakteristika des ursprünglichen Modells bei (Störkel, 1999).

Die Existenz klarzelliger Adenome, für deren Einteilung einzig die Tumorgroße herangezogen wird, ist Gegenstand der Diskussion. Einige Studien sehen jeden klarzelligen Tumor, ungeachtet dessen Größe, als Malignom an (Fleming, 1993; Miyake et al., 1998). Mikrosatellitenanalysen klarzelliger Karzinome zeigten in niedrigen Stadien Allelverluste auf 3p25-25 und / oder 3p12-14, höhere Stadien zusätzlich einen Allelverlust auf 3p21 (van den Berg, 1997b). Neuere Allel-Deletionsstudien diskutieren diese stadienabhängige Sequenz kontrovers (Alimov, 2000; Sükösd, 2003).

Die aktuelle Klassifikation nach UICC/AJCC oder der Heidelberg Klassifikation unterteilt klarzellige und chromophobe Tumoren nicht in eine prä-maligne und maligne Form (siehe Abbildung 36).

Aus dem proximalen Tubulus leitet sich das metanephrische Adenom ab. Es handelt sich um einen Tumor, der aus embryonalem metanephrischen Gewebe entsteht. Die Inzidenz des Tumors ist gering. Bisher sind nur wenig genetische Daten zu diesem Tumor vorhanden (Stumm et al., 1999).

Sporadische papilläre Tumoren zeigen oft ein multiples, vereinzelt auch bilaterales Erscheinungsbild. Da die vorgefundenen kleinen Adenome aufgrund ihrer übereinstimmenden genetischen Merkmale (+17,+7) klonalen Ursprungs sein müssen, postulierte Kovacs ein Modell, wonach papilläre Adenome aus persistierendem embryonalen Blastem, sogenannten nephrogenen Resten des Metanephros entstehen (Kovacs, 1993a). Das Modell postuliert die Entstehung aneuploider Vorläuferzellen aufgrund mitotischer Fehlverteilung noch bevor eine Ausdifferenzierung zu funktionellen Epithelzellen stattfindet. Die weitere Anhäufung chromosomaler Zugewinne ist dann verantwortlich für die Karzinomentstehung.

Wie bereits beschrieben (siehe Kapitel 1.2.4ff), tritt das Nierenzellkarzinom in der Mehrheit der beobachteten Fälle sporadisch, sehr viel seltener auch familiär auf. Zytologisch-histologisch sind zwischen sporadischen und familiären Tumoren der unterschiedlichen Subtypen keine Unterschiede festzustellen. Eine frühe und meist multifokale und/oder bilaterale Manifestation der Tumoren ist Kennzeichen einer erbten genetischen Vorbelastung, die in allen Körperzellen vorliegt.

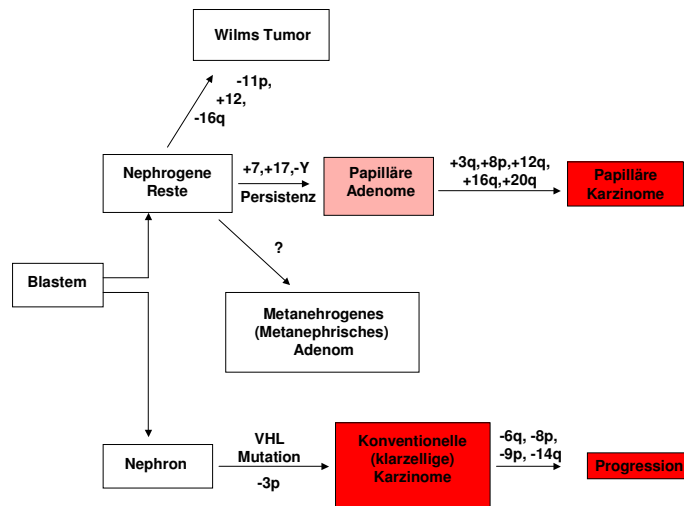


Abbildung 37: Hypothetische Entwicklungswege papillärer und klarzelliger Karzinome der Niere. Im Unterschied zu klarzelligen Karzinomen besteht bei papillären Karzinomen ein Adenomstadium, dass oft in multiplen kleinen, teils bilateralen Tumoren diagnostiziert werden kann. Verändert nach (Kovacs, 1993a).

Patienten des VHL-Syndroms, einer unter anderem für das klarzellige Nierenzellkarzinom prädisponierenden Erkrankung, besitzen in allen bisher untersuchten Fällen Mutationen und Deletionen des *VHL*-Tumorsuppressorgens. Es ist sowohl an der Entstehung hereditärer klarzelliger Nierenzellkarzinome im Rahmen des VHL-Syndroms als auch bei der Genese sporadischer klarzelliger Nierenzellkarzinome beteiligt. Bei über 50 Prozent der sporadischen Karzinome ist das *VHL*-Gen durch Mutation oder Deletion inaktiviert. 20 Prozent der sporadischen Karzinome weisen darüber hinaus eine Abschaltung des Gens durch Methylierung des Gen-Promotors oder des Gens selbst auf (Brauch et al., 2000; Clifford et al., 1998). Weitere Gene, die in den verbleibenden 30 Prozent der Karzinome für die Entstehung und Progression sporadischer Formen des klarzelligen Nierenkarzinoms verantwortlich sind, werden derzeit gesucht.

Auch für das papilläre Nierenkarzinom existieren sowohl sporadische als auch familiäre Formen. Die genetischen Charakteristika der familiären und sporadischen Formen des papillären Karzinoms sind ähnlich. Beide Formen zeigen einen Zugewinn der Chromosomen 7 und 17 und den Verlust des Y-Chromosoms bei männlichen Patienten. Während für das familiäre papilläre Nierenzellkarzinom (HPRCC, „*hereditary papillary renal carcinoma*“) die aktivierende Mutation des Proto-Onkogens *MET* innerhalb dessen Tyrosinkinase-Domäne in bis zu 86 Prozent der Fälle nachgewiesen werden konnte, ist das Gen in sporadischen Karzinomen dieses Subtyps in nur etwa 13 Prozent von Mutationen betroffen. Hier liegen die Mutationen im Bereich der Tyrosinkinasedomäne bzw. der ATP-Bindungsstelle von *MET* (Schmidt et al., 1997; Schmidt et al., 1999a). Häufiger finden sich in sporadischen Äquivalenten papillärer Karzinome allelische Duplikationen des gesamten Chromosoms 7. Für *MET* konnte nachgewiesen werden, dass eine Vervielfältigung der genomischen Kopienzahl des Proto-Onkogens *MET* bereits eine mäßige Aktivierung der Proliferation verursacht, während eine präferenzielle Duplikation eines mutierten Allels eine starke Stimulation der Proliferation zur Folge hat (Zhuang et al., 1998; Inoue et al., 1998).

Anhand des Vergleichs genetischer Läsionen von sporadischen und familiären Nierenzellkarzinomen muss gefolgert werden, dass grundlegende Mechanismen der Tumorgenese in den beiden Formen ähnlich oder identisch ablaufen.

Tabelle 28: Gegenüberstellung genetischer Veränderungen bei familiären und sporadischen Karzinomen der Niere. Die bisher bekannten Läsionen finden sich meist in beiden Formen der Erkrankung.

Subtyp		Prädisponierende genetische Läsion
klarzelliges NZK	familiär	Keimbahnmutation von <i>VHL</i> Balanzierte Translokationen mit Chromosom 3 (siehe Tabelle 33) Keimbahnmutationen von <i>TSC2</i>
	sporadisch	somatische Mutation von <i>VHL</i>
papilläres NZK	familiär	Keimbahnmutation von <i>MET</i> Trisomie 7 und 17 Monosomie Y
	sporadisch	Somatische Mutation von <i>MET</i> Translokationen der Bande X(p11.2) Trisomie 7 und 17 Monosomie Y
chromphobes NZK	familiär	Birt-Hogg-Dubé-Syndrom
	sporadisch	Monosomie 1, 2, 6, 10, 13, 17, 21
Sammelgang-Karzinom	familiär	?
	sporadisch	

Die Überprüfung histopathologischer Befunde eines großen Nierenkarzinom-Kollektivs zeigte, dass die neue Klassifikation auch prognostische Relevanz besitzt (Moch et al., 2000). So hat das klarzellige wie das papilläre Nierenkarzinom gegenüber dem chromophoben Nierenkarzinom eine signifikant schlechtere Prognose. Innerhalb papillärer Karzinome der Niere weist die kleinzellige, basophile Variante (Typ 1) eine günstigere Prognose auf als die großzellige Variante mit eosinophilem Zytoplasma (Typ 2) (Allory et al., 2003; Amin et al., 1997a; Delahunt und Eble, 1997; Moch et al., 2000; Mancilla Jimenez et al., 1976). Das Onkozytom der Niere sticht mit günstigstem Krankheitsverlauf heraus. Die Tumorausdehnung ist für die Prognoseeinschätzung des lokal begrenzten Tumors derzeit wichtigste Kenngröße (Delahunt et al., 2002).

Derzeit existieren außer Differenzierungsgrad und Tumorstadium bei Operation nur wenige statistisch voneinander unabhängige Prognosefaktoren des Nierenkarzinoms. Ergänzend werden zytogenetisch oder molekular-zytogenetisch detektierbare Veränderungen analysiert sowie tumorbiologisch relevante Vorgänge wie Proliferation, Apoptose, Tumorangiogenese, Zell-Zell- / Zell-Matrix- Interaktionen studiert oder auch Moleküle wie Matrix-abbauende Enzyme oder Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren untersucht, um eine Rolle als möglicher Prognosemarker zu klären (Bui et al., 2003; Ramp et al., 2003; Migita et al., 2002; Cheville et al., 2002; Kallakury et al., 2001; Symbas et al., 2000; Sevinc et al., 2000; Wechsel et al., 1999; Ljungberg et al., 1999; Gelb et al., 1997; Shiina et al., 1997; Elfving et al., 1997; Shimazui et al., 1997; Moch et al., 1997; Katagiri et al., 1995; Machtens et al., 1999).

Prognostisch etablierte Marker sind der immunhistochemische Nachweis eines Proliferations-assoziierten Tumorantigens durch den monoklonalen Antikörper Ki-67 und die Detektion des PCNA (*proliferation cell nuclear antigen*). Dabei scheint der Ki-67 Nachweis gegenüber der PCNA Detektion ein verlässlicherer Prognoseindikator zu sein (Hofmockel et al., 1995).

Tabelle 29: Bedeutung biologischer Faktoren für die Tumorprogression. Gleichzeitig abgebildet ist deren potenzieller Wert als prognostischer Marker. Verändert aus (Machtens et al., 1999).

Untersuchter Faktor	Bedeutung für Tumorprogression	Prognostischer Marker
Proliferationsmarker		
Ki67	++	±
PCNA	±	-
AgNOR	±	-
Zytogenetische Faktoren	++	?
Tumorsuppressorgene		
VHL	(++)	++
TP53	±	-
RB	-	-
NM23	±	-
Zell-Adhäsionsmoleküle		
E-Cadherin	±	-
N-Cadherin	-	-
Cadherin 6	-	-
α-Catenin	++	++
β-Catenin	+	-
γ-Catenin	+	-
E-Selectin	-	-
ICAM-1	+	-
VCAM-1	-	-
PECAM-1	+	+
Onkogene		
BCL2	+	-
RAS	-	-
MYC, FOS	-	-
ERBB	+	?
Wachstumsfaktoren		
TGF-α	?	?
TGF-β	+	+
IGF-1	-	-
PDGF-A, PDGF-B	-	-
HGF/SF	?	?
FGF-2 (bFGF)	++	++
VEGF	++	?
Zellzyklus-Proteine		
p15	?	?
p16	+	?
p18	?	?
p19	?	?
p21	-	?
p27	?	?
Proteasen/-Inhibitoren		
MMP-2, MMP-9	+	+
TIMP-1, TIMP-2	+	+
uPA	+	-
uPAI-1	+	+
++ wahrscheinlich; + möglich; ± widersprüchliche Ergebnisse; - unwahrscheinlich; ? nicht untersucht		

5.3.1 Klarzellige Nierenkarzinome

Obwohl eine Ansammlung genetischer Veränderungen als Voraussetzung der Tumorprogression angesehen wird, sind derzeit die Natur und Abfolge der Veränderungen während der Tumorprogression des Nierenkarzinoms weitgehend unverstanden (Moch et al., 1996; Presti, Jr. et al., 1991). Moch und Mitarbeiter konnten in einer CGH Studie zeigen, dass die Gesamtzahl der chromosomalen Verluste eines jeden Tumors mit einer schlechten Prognose korreliert, was bei der selektiven Betrachtung der

Zugewinne nicht der Fall ist. Sie folgerten daraus, dass einem Verlust von Chromosomenteilen essenziellere Bedeutung in der Tumorprogression zukomme als dem Zugewinn und prägten den Begriff des „genetic grade“ (Moch et al., 1996). In eigenen Studien konnte diese Korrelation in keinem der untersuchten Subtypen bestätigt werden. Jiang und Koautoren konnten in ihrem Kollektiv die Gesamtzahl der Aberrationen ebenfalls nicht mit Tumorstadium oder Differenzierung in Beziehung setzen (Jiang et al., 2000). Aufbauend auf mathematischen Simulationen (Desper et al., 1999; Desper et al., 2000) konnten Jiang und Mitarbeiter Baum-Modelle der genetischen Onkogenese für das klarzellige Nierenkarzinom entwickeln.

Basierend vorwiegend auf CGH- und FISH-Daten wurden inzwischen Konzepte entwickelt, die sich mit dem Tumorgeneseprozess beim klarzelligen NZK befassen. Man vermutet, dass dabei folgende Sequenz abläuft (siehe Abbildung 38).

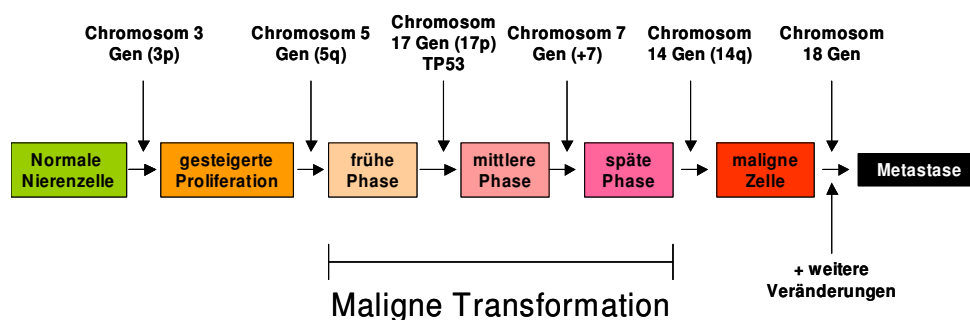


Abbildung 38: Hypothetisches Stufenmodell der Entstehung klarzelliger (konventioneller) Nierenzellkarzinome basierend auf zytogenetischen und molekulargenetischen Befunden. Genetisch relevante Veränderungen während der malignen Transformation sind in deren Abfolge nicht gesichert. Verändert nach (Meloni-Ehrig, 2002).

Vergleichbare aber auch weitergehende Befunde ergeben sich bei der Auswertung der eigenen Untersuchungen. Die 46 mit CGH analysierten klarzelligen NZK zeigten ein charakteristisches Imbalanzmuster. In Analogie zu beschriebenen Studien fiel bei diesem Subtyp vor allem der Verlust des kurzen Arms von Chromosom 3 auf, der in dieser Häufigkeit in keinem anderen der untersuchten Subtypen vorzufinden war und daher als genetisches Merkmal zur Differenzialdiagnostik und der Prognoseabschätzung herangezogen werden kann. Die nachfolgende Tabelle rekapituliert die in dieser Arbeit gefundenen Imbalanzen und verschafft einen Überblick über neu identifizierte und in Literaturdaten beschriebene progressionsassoziierte und prognoserelevante chromosomale Imbalanzen.

Tabelle 30: Übersicht der in dieser Arbeit gefundenen Chromosomenimbilanzen klarzelliger Karzinome und deren Bedeutung als Marker der Progression oder Prognoseindikator. (•) = vorhanden; ■ = in vorliegender Arbeit statistisch abgesichert gefunden; ■ = in vorliegender Arbeit und zugleich in Literatur beschrieben.

Chromosomen/-arm	Gewinn	Verlust	Korrelation	
1q	•		Hohes Stadium	
2	•			
3p		•	Frühes Stadium	
3q	•		Hohes Stadium	
4		•	Spätes Stadium	Frühes Stadium
5	•		Niedriger Grad	Gute Prognose / Frühes Stadium
6q		•	Hoher Grad / Spätes Stadium	
7	•			
8p		•	Schlechte Prognose/	
8q	•		Schlechte Prognose	Hohes Stadium
9		•	Hohes Stadium/schlechte Prognose	
10	•		Hoher Grad	
11	•			
12	•			
14		•	Hoher Grad/spätes Stadium/schlechte Prognose	
16	•			
17q	•		Hoher Grad	Hohes Stadium
19	•			
20	•			
22		•		
X	•			

5.3.1.1 Chromosom 3 Aberrationen

Eine hohe Inzidenz (63%) von Chromosom 3 Verlusten und deren Unabhängigkeit von Tumorstadium und Differenzierungsgrad kennzeichnen den Verlust dieses Chromosoms als frühes, wahrscheinlich initiales Ereignis der Tumorgenese. Beobachtete Aberrationen auf 3p werden durch alle Tumorstadien beibehalten, der Verlust dieses Chromosomenarms tritt in keinem der untersuchten klarzelligen Karzinome alleine auf. Dieses Ergebnis stützt die von Kovacs et al. postulierte These, die anhand zytogenetischer und pathologischer Daten den Chromosom 3 Verlust als initiales Ereignis der Tumorentstehung des klarzelligen Karzinom sieht (Kovacs und Frisch, 1989; Kovacs et al., 1987; van den Berg et al., 1997). Presti et al. konnten innerhalb sehr früher Stadien klarzelliger Karzinome (Durchmesser <2 cm) den Verlust von Chromosom 3, den Zugewinn von Chromsom 5 sowie den Verlust eines Geschlechtschromosoms

nachweisen. Sie werteten diese Veränderungen ebenfalls als initial in der Entwicklung klarzelliger Karzinome (Presti, Jr. et al., 1998).

Bis zu 50 Prozent aller zytogenetisch untersuchten, klarzelligen Karzinome tragen Deletionen des kurzen Arms (Berger et al., 1986; Dal Cin et al., 1988; de Jong et al., 1988; Yoshida et al., 1986). Allel-Deletionsuntersuchungen konnten mit methodisch höherem Auflösungsvermögen darstellen, dass sogar über 90 Prozent aller klarzelligen Nierenkarzinome Deletionen des kurzen Arms von Chromosom 3 aufweisen (Kovacs et al., 1988a; Kovacs et al., 1988b; van der Hout et al., 1988; Bergerheim et al., 1989; Anglard et al., 1991; Ogawa et al., 1991; Presti, Jr. et al., 1991; van der Hout et al., 1991; el Naggar et al., 1993; Sükösd et al., 2003).

Verluste chromosomaler DNA der 3p-Region entstehen meist durch somatische Rekombination nicht-homologer Chromatiden (Kovacs und Kung, 1991a). Als Translokationspartner des kurzen Arms von Chromosom 3 wird dabei häufig Chromosom 5 gefunden (Presti, Jr. et al., 1991; Kovacs et al., 1987). Zytogenetische Analysen solcher Translokationsfälle identifizierten Bruchpunktregionen auf 3p25-26, 3p21 und 3p14-p12 (Carroll et al., 1987; Dal Cin et al., 1989; de Jong et al., 1988; Kovacs und Frisch, 1989; Szucs et al., 1987; Yoshida et al., 1985). Mit CGH der vorliegenden Arbeit erfasste Bruchpunktregionen von Chromosom 3 lokalisieren in den Banden 3p21, 3p14, 3p13, 3p12, 3p11, 3q13.3 und 3q24. Alimov et al. identifizierten mit CGH und Mikrosatellitenanalysen interstitielle Deletionen auf Chromosom 3p (Alimov et al., 2000). Deren Befunde können durch die eigenen CGH Befunde nur zum Teil bestätigt werden. Lediglich ein Tumor wies eine interstitielle Deletion der Bande 3p12 auf. Alle weiteren Imbalanzprofile des Chromosoms 3p bilden den Verlust des gesamten terminalen Chromosomensegmentes ab.

Auf Chromosom 3 lokalisierte Tumorsuppressorgene spielen auf Grund der hohen Inzidenz dieser chromosomalen Aberration in der Tumorgenese klarzelliger Nierenkarzinome eine herausragende Rolle. In Abbildung 42 sind diejenigen Gene dargestellt, die aufgrund ihrer Position und/oder Funktion in den Karzinogeneseprozess des klarzelligen NZK impliziert werden können (siehe Tabelle 34). Das in nahezu allen klarzelligen Karzinomen entweder mutiert, deletiert oder epigenetisch inaktiviert vorliegende VHL-Gen ist das zur Zeit am umfassendsten charakterisierte Nierenkarzinom-spezifische Tumorsuppressorgen (Brauch et al., 2000) (eine Übersicht hierzu in (Richards, 2001)).

Aufgrund von NZK-Fällen ohne Beteiligung dieses Tumorsuppressors werden jedoch weitere Gene in der 3p-Region mit Relevanz für den Karzinogeneseprozess vermutet. Bisherige Versuche, neben dem VHL Tumorsuppressorgen weitere nierenspezifische Tumorsuppressoren auf Chromosom 3 zu identifizieren, blieben wenig erfolgreich. Zwar konnten durch Deletionskartierungen eine Reihe von Kandidatengenen identifiziert werden, ob diese Kandidaten Relevanz für das Nierenzellkarzinom besitzen, ist aber noch Gegenstand weiterer Untersuchungen.

5.3.2 Hereditäre Nierenzellkarzinome

5.3.2.1 VHL-Erkrankung

Die von Hippel-Lindau (VHL)-Erkrankung ist ein seltenes, autosomal dominant vererbtes Tumorprädispositionssyndrom. In Abhängigkeit von Keimbahnmutationen im *VHL*-Gen entwickeln Betroffene hypervaskularisierte Tumoren des zentralen Nervensystems, des Pankreas, der Nebenniere und der Niere. Das klinische VHL-Krankheitsspektrum (Tabelle 31), das mit *VHL*-Genotypen korreliert werden kann, lässt sich grundsätzlich in zwei verschiedene Erscheinungsformen aufgliedern: Typ 1 ohne, Typ 2 mit Auftreten eines Phäochromozytoms.

Tabelle 31: Einteilung der VHL-Erkrankung nach dem Erkrankungsrisiko für die Tumore Hämangioblastom, Nierenzellkarzinom und Phäochromozytom.

Tumor	Typ 1	Typ 2A	Typ 2B	Typ 2C
Hämangioblastom	+	+	+	-
Nierenzellkarzinom (NZK)	+	-	+	-
Phäochromozytom	-	+	+	+

Die Analyse der hereditären Tumoren- oft in Kombination mit Befunden bei entsprechenden sporadischen Malignomen - ist ein wesentlicher Ausgangspunkt zur Aufklärung *VHL* bedingter Tumorgenese-Mechanismen (Übersicht: (Kaelin, 2002)). So ist der Totalverlust der pVHL-Funktion (resultierend z.B. aus Deletionen bzw. *nonsense*-Mutationen des *VHL*-Gens) mit dem Erkrankungstyp 1 (Auftreten von Hämangioblastom und Nierenzellkarzinom; keine Phäochromozytome) assoziiert, während spezifische missense-Mutationen (evtl. mit dominant negativem Effekt) zur Ausprägung des VHL-Erkrankungstyps 2 (Entwicklung von Phäochromozytomen) führen. Die Sub-Gruppierung einerseits in VHL Typ 2A / 2B (bei dem für Betroffene neben dem erhöhten Phäochromozytomrisiko auch die Gefahr für die Entwicklung von Hämangioblastomen bzw. Nierenzellkarzinomen besteht) und andererseits in VHL Typ 2C-Patienten, die ausschließlich Phäochromocytoyme entwickeln (Weirich et al., 2002), legt eine mehr funktionelle Einteilung der VHL-Patienten hinsichtlich der molekularen VHL-Funktionsstörung nahe (Tabelle 32).

Tabelle 32: VHL-Erkrankungstyp, zugrundeliegende VHL-Mutation und resultierende molekulare Funktionsstörung (Ohh, 1998; Clifford,2001; Hoffman,2001).

VHL Typ	VHL-Mutation	Molekularer Defekt
1	Deletionen bzw. Gendefekte mit großen VHL Alterationen	Hochregulation von HIF1A und HIF Zielgenen Fibronectin/Matrix-Bindungsdefekt
2A	Missense Mutation	Hochregulation von HIF1A und HIF Zielgenen Fibronectin/Matrix-Bindungsdefekt
2B	Missense Mutation	Hochregulation von HIF1A und HIF Zielgenen Fibronectin/Matrix-Bindungsdefekt
2C	Missense Mutation	HIF1A Abbau, trotzdem Auswirkung auf HIF-Zielgene, Fibronectin/Matrix-Bindungsdefekt

5.3.3 Translokationsassoziierte Nierenkarzinome

Eine familiäre Veranlagung für das Nierenzellkarzinom ist selten und liegt in weniger als zwei Prozent aller zur Behandlung kommenden Patienten vor (Griffin et al., 1967). In dem in dieser Arbeit vorgestellten Fall konnte gezeigt werden, dass eine zytogenetisch auffällige Chromosomenveränderung der Chromosomen 3 und 8 mit der Erkrankung einhergeht. Durch Hybridisierung bandenspezifisch mikrodissasierter M-FISH-Sonden für die Chromosomen 3 (12 Sonden) und 8 (7 Sonden) konnte (in Kooperation mit Dr. Thomas Liehr, AG Prof. Claussen; Humangenetik, FSU Jena, das in (Abbildung 29) dargestellte Translokationsereignis bestätigt und die Bruchpunktregion näher charakterisiert werden. Die festgestellten Bruchpunkte der komplexen Translokation liegen in 3p12.1 und 3q13.1 sowie in 8p21.1 und 8p21.3. Das durch bandenspezifische M-FISH eingrenzbbare, komplexe Translokationsereignis lies sich wie folgt zusammenfassen:

46, XY
 .ish der(3) t(3;8;3;8)(3pter→3p12.1::8p21.1→8p21.3 oder
 8p21.3 →8p21.1::3q13.1→3p12.1 :: 8p21.3→ 8pter),
 der(8) t(3;8)(q13.1;p21.1)

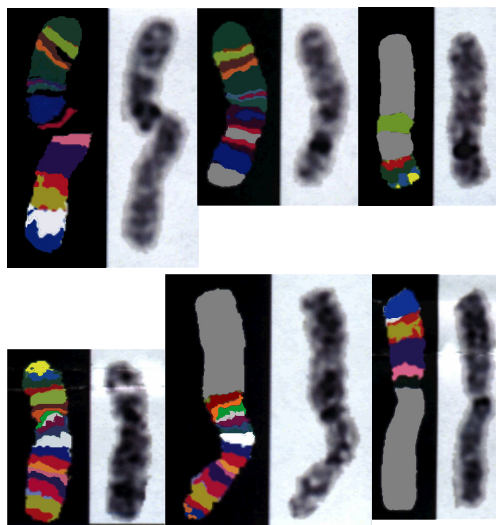


Abbildung 39: Multiplex-FISH mit mikro-dissezierten bandenspezifischen DNA-Sonden auf Chromosomen des Patienten B. Abgebildet jeweils farbkodiert (hellgraue Bereiche sind unmarkiert) und korrespondierende DAPI-Bandierung **Oben links:** Chromosom 3 mit typischem Bandierungsmuster; **Oben Mitte:** Derivat-Chromosom 3 markiert mit Chromosom 3 spezifischen Sonden. Deutlich wird hier die hybridisierungsfreie interstitielle und terminale Region. **Oben rechts:** Derivat-Chromosom 3 markiert mit Chromosom 8 spezifischen Sonden. Der insertierte Anteil besteht aus Material der Bande 8p21. Die terminalen Chromosom 8-Anteile bestehen aus den Banden 8p22→8pter. **Unten links:** Chromosom 8 mit typischem

Bandierungsmuster; **Unten Mitte:** Derivat-Chromosom 8 markiert mit Chromosom 8 spezifischen Sonden. **Unten rechts:** Derivat-Chromosom 8 markiert mit Chromosom 3 spezifischen Sonden (zur Verfügung gestellt von Dr. Thomas Liehr, FSU Jena).

Unter Berücksichtigung des in Abbildung 29 dargestellten Modells wird vorgeschlagen, dass das Translokationsereignis wie folgt ablief:

1.) Reziproke Translokation zwischen Chromosom 3q13.1 und 8p21.

Es entstehen die Derivat-Chromsomen 3 (intermediär) und 8.

der(3)t(3;8)(pter→q13.1::p21→pter) und

der(8)t(3;8)(qter→q13.1::p21→pter)

2.) Perizentrische Inversion des intermediären der(3) mit Bruchpunkt auf 3p12.1 und 8p21.3.

Hieraus resultierend:

der(3)(pter→3p12.1::8p21.3→8p21.1::3q13.1→3p12.1::8p21.3→8pter)

Die Chromosomenbanden 3p12.1 und 3q13.1 sind genarme Regionen. Daher ist die Anzahl an der Tumorgenese involvierter Kandidatengene beschränkt. Die Region 8p21 stellt im Gegensatz hierzu eine sehr genreiche, chromosomale Bande dar. In die Recherche der ENSEMBL Datenbank (www.ensembl.org) wurden Bereiche eingeschlossen, welche beidseits der Bruchpunktregionen lokalisieren. Unter den in Frage kommenden Kandidaten finden sich Gene wie *ROBO1/DUTT1* (3p12.3), das in der sporadischen Karzinomentwicklung der Niere eine Rolle zu spielen scheint (Dallol et al., 2002). Durch Translokation können auch nativ nicht tumorauslösende Genprodukte ein onkogenes Potenzial erlangen. Eine Auswahl möglicher Kandidatengene ist im Anhang abgedruckt.

Zwei Fälle familiärer Nierenkarzinome mit Beteiligung der Chromosomen 3 und 8 sind bereits beschrieben worden (Cohen et al., 1979; Melendez et al., 2003), besitzen aber im Vergleich zu dem hier vorgestellten Fall verschiedene vom Rearrangement betroffene Bereiche. Arbeiten an der von Cohen et al. beschriebenen Translokation identifizierten ein daraus resultierendes Fusionsprodukt der beiden Gene *FHIT* (3p14.2) und *TRC8* (8q24.1) (Gemmill et al., 1998). Dieses Fusionsprodukt ist jedoch spezifisch für die betroffene Familie und spielt bei anderen familiären oder sporadischen Tumoren keine Rolle. Die Betrachtung der bisher beschriebenen Translokationen mit Beteiligung des Chromosoms 3, legen die Vermutung nahe, dass neben der Entstehung chimärer Gene auch andere Bruchpunkt-assoziierte Mechanismen an der Nierentumorentstehung beteiligt sein könnten. So wäre es möglich, dass genomische Verluste im Rahmen des Translokationsereignisses zu einer Defizienz eines essenziellen Tumorsuppressors führen. Ferner könnten Positionseffekte translozierter expressionsregulierender DNA-Elemente ebenfalls bei der Tumorgenese mitwirken.

Tabelle 33: Übersicht familiärer Nierenkarzinome mit Chromosom 3 Translokationen; n.u.=nicht untersucht (verändert und ergänzt nach (Bodmer et al., 2002b)).

Translokation	Anzahl an Patienten	Chromosom 3p Verlust in Tumor	VHL-Mutationen	Referenz
t(3;8)(p14;q24)	10	5/5	2/2	(Cohen et al., 1979)
t(3;6)(p13;q25.1)	1	5/5	n.u.	(Kovacs et al., 1989a)
t(2;3)(q35;q21)	5	7/8	5/7	(Koolen et al., 1998; Bodmer et al., 2002a; Bodmer et al., 1998)
t(3;6)(q12;q15)	4	2/5	1/7	(Eleveld et al., 2001)
t(2;3)(q33;q21)	7	2/2	n.u.	(Zajacsek et al., 1999)
t(1;3)(q32;q13.3)	4	4/4	2/4	(Kanayama et al., 2001)
t(3;8)(p13;q24.1)	1	1/1	2/1	(Melendez et al., 2003)

Träger der im Ergebnisteil dargestellten, konstitutionellen Translokation der Chromosomen 3q und 8p entwickeln in einem Alter von 45 bis 55 Jahren klarzellige Nierenkarzinome. Damit liegt das Erstmanifestationsalter des Karzinoms deutlich unter dem sporadischer Karzinome. Das Patientenalter bei Diagnose ist aber deutlich höher als das von VHL-Patienten.

5.3.3.1 Drei-Schritt-Modell der Entstehung familiärer Nierenkarzinome

Analog zur Knudson Hypothese (Knudson, 1971) wurde auch für die familiären Nierenkarzinome zunächst ein 2-Schritt Modell der Tumorentstehung postuliert. Dabei wurde der sequenzielle Verlust beider VHL-Allele als krankheitsauslösender Vorgang vorgeschlagen (Schmidt et al., 1995). Um der häufigen Beteiligung des Chromosoms 3 in tumorassoziierten Translokationen Rechnung zu tragen und aufgrund der Beobachtung, dass in Fällen, in denen Chromosom 3 an einer Translokation beteiligt ist, im entwickelnden Tumor meist das Chromosom 3p-Material tragende Derivatvchromosom nicht mehr nachweisbar ist, ergänzten Bodmer und Mitarbeiter das bestehende Modell zu einem Dreischritt Mechanismus (Bodmer et al., 1998; Bodmer et al., 2002b) (Abbildung 38). Erster Schritt wäre in diesem Modell die Präsenz einer Translokation des Chromosoms 3 in der Keimbahn. Bei dem zweiten Schritt geht nachfolgend durch mitotische Fehlverteilung (durch *non-disjunction*) im Laufe der somatischen Entwicklung das Chromosom 3p-Material tragende Derivatvchromosom verloren. Der dritte Schritt ist die somatische Mutation eines nunmehr hemizygot vorhandenen, auf Chromosom 3p kartierenden Tumorsuppressorgens, wie z.B. *VHL*. (Clifford et al., 1998).

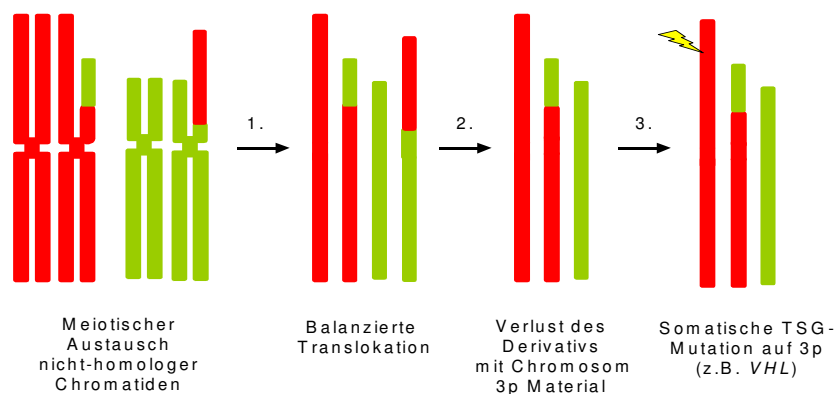


Abbildung 40: Schematische Darstellung des 3-Schritt Mechanismus der Tumorentstehung in familiären Nierenkarzinomen mit Chromosom 3 Translokation (Chromosom 3 (rot)) Verändert nach (Bodmer et al., 2002b).

Der in der vorliegenden Arbeit beschriebene, familiäre Nierentumor mit Translokation [t(3;8)(q13;p21)] zeigt in Chromosomen aus Leukozyten mittels FISH-Analyse weder einen Verlust des Derivativs 3 (der(3)) noch der beiden VHL-Allele (nicht abgebildet). Der Nachweis des Verlusts des der(3) in Tumorzellen steht jedoch, ebenso wie die

Beschreibung der nach dem Dreischrittmodell zu fordernden Inaktivierung von auf 3p lokalisierten Tumorsuppressoren (z.B. *VHL*, vgl. [Abbildung 41](#)), noch aus.

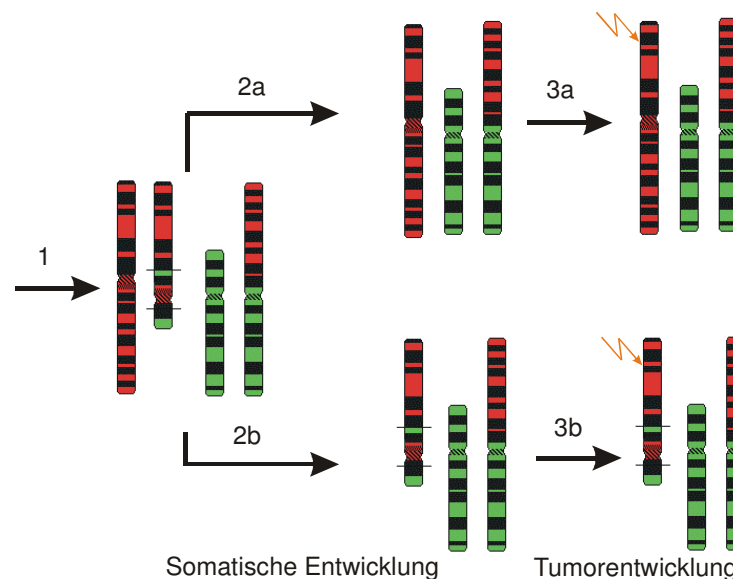


Abbildung 41: Postulierter Alternativ-Mechanismus der Geninaktivierung auf Chromosomenarm 3p in Tumorgewebe des vorgestellten Falles. **1.)** hereditäre Translokation, Verlust entweder des Derivat 3. (**2a**) oder des Normalchromosoms 3 (**2b**). Nachfolgende Inaktivierung hemizygoter 3p-Gene löst die Tumorentwicklung aus. Ein Verlust des Derivat 8 mit dem Fragment 3q13.1qter im Tumor darf ebenso postuliert werden (nicht abgebildet). Tumorsuppressorgene auf den Chromosomenarmen 8p21.1-qter oder 3q13.1-3qter mit Relevanz für die Tumorentstehung des klarzelligen Nierenzellkarzinoms sind nicht bekannt. Ein Verlust des Derivat 8 im Tumor der Patienten scheint daher wenig wahrscheinlich.

Auf Chromosom 3 konnten eine Reihe von Kandidatengenen mit möglicher Relevanz für die Nierenkarzinomentwicklung lokalisiert werden. Eine Aufstellung der Kandidatengene ist in [Abbildung 42](#) und [Tabelle 34](#) zu finden. Verschiedene dieser Kandidatengene werden im Folgenden besprochen und ihre mögliche Rolle im Pathogeneseprozess wird diskutiert.

Wie bei der Pathogenese der VHL-Erkrankungen bereits angedeutet, ist eine wesentliche Funktion von VHL die Vermittlung der schnellen, sauerstoffabhängigen Degradation des Transkriptionsfaktors HIF1A durch das 26S-Proteasom (vgl. [Abbildung 43](#)). Dieses Regulationsprinzip sorgt unter Normoxie für einen niedrigen Titer von HIF1A, das als Transkriptionsfaktor (z.B. im Heterodimer mit dem Protein ARNT) die Regulation Hypoxie-induzierbarer Gene bewirkt. Ein funktioneller Ausfall von VHL führt zur Unterbrechung der HIF1A-Degradation und somit zum Anstieg des HIF1A-Titers in der Zelle. In der Folge kommt es zu einer pathophysiologischen Stabilisierung von HIF1A. Die Folge ist eine von der Sauerstoffspannung entkoppelte Expression Hypoxie-abhängiger Gene. Die dabei entstehenden Genprodukte bewirken eine Vielzahl zellbiologischer Antworten, so z.B. auch solche, die für den Tumorentstehungsprozess charakteristisch sind (z.B. Angiogenese, Proliferation; siehe [Abbildung 43](#)).

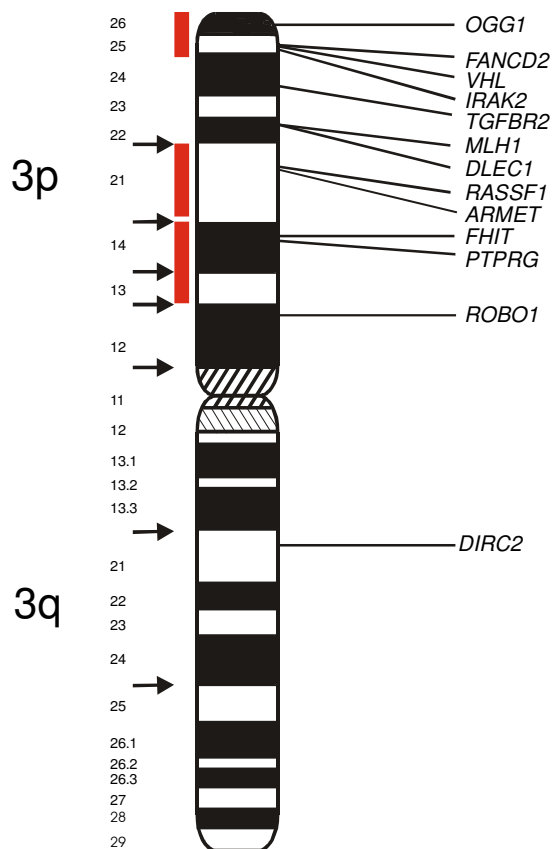


Abbildung 42: Ideogramm des humanen Chromosoms 3 mit Tumorsuppressorgen- / Mutatorgen Kandidaten des klarzelligen Nierenzellkarzinoms und deren zytogenetischer Lokalisation. Rot eingezeichnet sind die mit Zytogenetik nachgewiesenen, an Bruchereignissen beteiligten Regionen. Pfeile kennzeichnen die mit CGH identifizierten Ratio-Wechsel hin zu Genomverlusten.

Tabelle 34: Gene der Chromosomenarme 3p und 3q mit Bezug zur Pathogenese des klarzelligen Nierenkarzinoms.

<u>HUGO ID</u>	Bezeichnung	Lokalisation
<u>OGG1</u>	8-oxoguanine DNA glycosylase	3p26.2
<u>FANCD2</u>	Fanconi anemia, complementation group D2	3p25.3
<u>VHL</u>	von Hippel-Lindau syndrome	3p25.3
<u>IRAK2</u>	interleukin-1 receptor-associated kinase 2	3p25.2
<u>TGFB2</u>	transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa)	3p24.1
<u>MLH1</u>	mutL homolog 1, colon cancer, nonpolyposis type 2 (E. coli)	3p22.3
<u>DLEC1</u>	deleted in lung and esophageal cancer 1	3p22.3
<u>RASSF1</u>	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family 1	3p21.31
<u>FHIT</u>	fragile histidine triad gene	3p14.2
<u>PTPRG</u>	protein tyrosine phosphatase, receptor type, G	3p14.2
<u>FOXP1</u>	forkhead box P1	3p13
<u>ROBO1</u>	roundabout, axon guidance receptor, homolog 1 (Drosophila)	3p12.3
<u>DIRC2</u>	disrupted in renal cancer 2	3q21.1

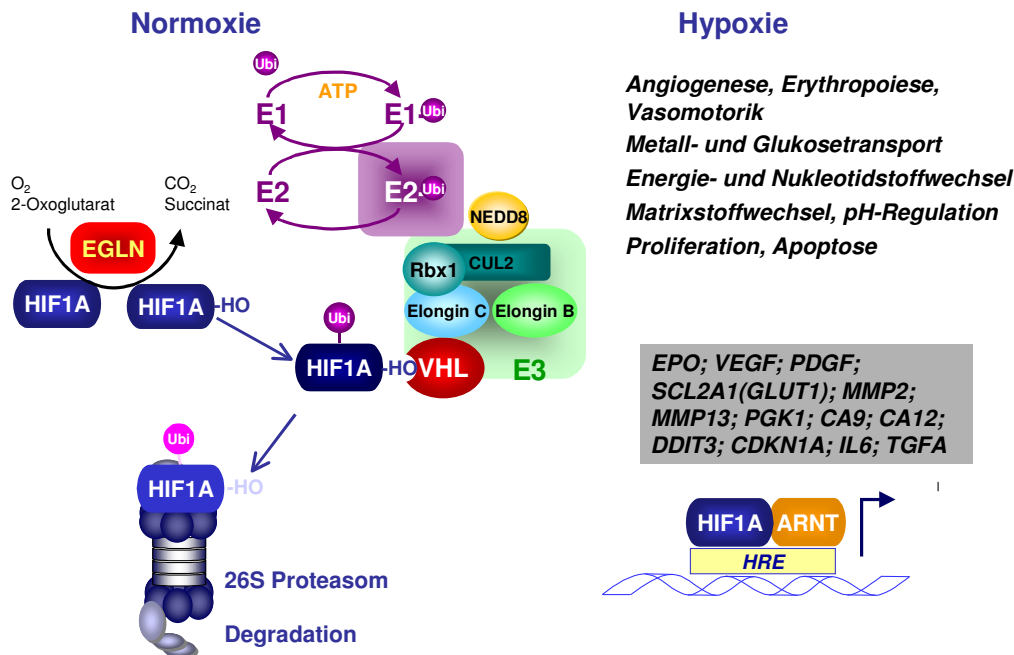


Abbildung 43: Schematische Darstellung der sauerstoffabhängigen Degradation des Transkriptionsfaktors HIF1A. Bei Normoxie steht den Dioxigenasen der EGLN Familie (*egg laying nine homolog* (*C. elegans*)) das Substrat Sauerstoff und Ko-Substrat zur Pro564-Hydroxylierung des HIF1A zur Verfügung. In hydroxylierten Zustand kann HIF1A an VHL, dem essenziellen Adapter des E3-Ubiquitinligase-Komplex koppeln. Die nachfolgende Ubiquitinylierung des HIF1A markiert das Protein für den proteasomalen Abbau. Bei Hypoxie findet der Schlüsselprozess der HIF1A Hydroxylierung sehr viel seltener statt und HIF1A kann mit ARNT/HIF1B (*Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*) als Heterodimer Hypoxie-responsive Elemente (HRE) binden. Dabei werden eine Vielzahl Hypoxie-abhängiger Gene aktiviert, die verschiedenste Funktionen in zellulären Prozessen ausüben (oben rechts).

Neben der Adapterfunktion während der HIF1A Degradation nimmt VHL weitere Aufgaben wahr. So wurde VHL mit der Repression des Zellzyklus, dem Unterdrücken UV-induzierter Apoptose, und der post-transkriptionellen Regulation von Zielgenen durch mRNA-Stabilisierung in Verbindung gebracht. Darüber hinaus wird das VHL-Protein in Prozesse der Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktion (z.B. Fibronectin-Bindung) sowie der zellulären Invasion impliziert (Bindra et al., 2002; Esteban-Barragan et al., 2002; Schoenfeld et al., 2000; Gnarr et al., 1996; Pause et al., 1998; Knebelmann et al., 1998; Ohh et al., 1998). Der kürzlich nachgewiesenen Mikrotubuli-stabilisierenden Funktion von VHL weist man eine Rolle bei der Beeinflussung zellulärer Motorik und chromosomaler Stabilität zu und sieht damit eine Verbindung zur Tumorsuppression (Hergovich et al., 2003).

Trotz dieser zahlreichen Erkenntnisse hinsichtlich zellphysiologischer Aufgaben von VHL, die mit der Tumorgenese in Verbindung stehen, ist noch nicht geklärt, welche

funktionellen Aspekte dieses offensichtlich an der Initiation der Karzinogenese klarzelliger Tumoren beteiligten Genproduktes wirklich relevant sind.

Unmittelbar distal zu *VHL* liegt *FANCD2*. *FANCD2* trägt im Zusammenspiel mit dem nukleären Proteinkomplex FA (von *fanconi anemia*; der Komplex besteht aus den Komponenten FANCA, FANCC, FANCE bis FANCG) zur Genomstabilität bei (Timmers et al., 2001; Garcia-Higuera et al., 1999) (vgl. Abbildung 44). Bei *FANCD2* handelt es sich um ein hochkonserviertes Protein. Es wird durch den FA-Komplex an einem konservierten Lysinrest (Lys561) mono-ubiquityliert und leitet dann, offenbar über den Adaptor FANCA, das Tumorsuppressorprotein BRCA1 zu defekten DNA Sequenzen (Folias et al., 2002; Garcia-Higuera et al., 2001; Joenje und Arwert, 2001). Der Komplex aus *FANCD2* und BRCA1 konnte zudem im Synaptonemalkomplex während der Reifung männlicher Keimzellen gefunden werden. Das Protein schützt die Zelle nach Exposition mit DNA kreuzvernetzenden Agenzien und bewirkt einen Zellzyklusarrest nach ultravioletter Bestrahlung (Nakanishi et al., 2002; Grompe, 2002; Taniguchi et al., 2002).

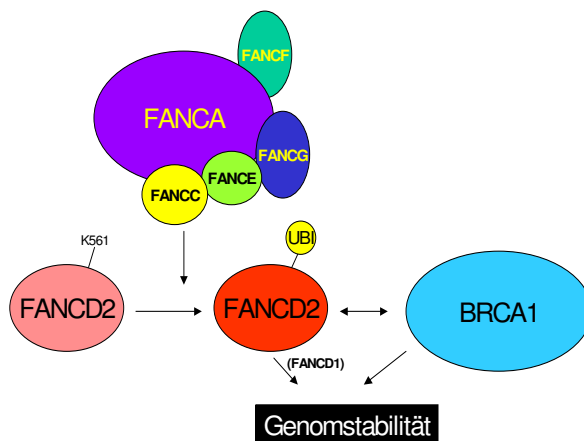


Abbildung 44: Derzeitige Modellvorstellung der Fanconi-Anämie Komplex (FA) moderierten Genomstabilisierung. Die Genprodukte FANCA, FANCC, FANCE - FANCG setzen sich zum nukleären FA-Komplex zusammen. Die FA-Bildung ist essenziell für die Ubiquitylierung des FANCD2-S (*short*) zum aktiven FANCD2-L (*long*). FANCD2-L bindet und kolokalisiert mit BRCA1 in nukleären *Foci*. Ein hier postulierter stromabwärts wirkender Effektor (FANCD1) ist bisher noch nicht identifiziert. Abbildung entnommen aus (Joenje und Arwert, 2001).

Eigene Studien mit CGH und einer Lokus-spezifischen FISH Sonde belegten die gemeinsame Deletion von *VHL* und *FANCD2* in klarzelligen Nierenkarzinomen. In solchen Fällen könnte der Verlust der *FANCD2*-Funktion – und damit einhergehend der Funktionsverlust des FA-Komplexes – zur Akkumulation weiterer chromosomaler Veränderungen, möglicherweise als initiales Ereignis beitragen.

Das *OGG1*- Gen kodiert in Hefe, Maus und Mensch für eine Reparaturglykosylase, die 8-Oxo-Guanin aus dem Genom entfernt (Boiteux und Radicella, 2000; Bruner et al., 2000)]. 8-Oxo-Guanin entsteht durch die Umwandlung von Guanin bei Anwesenheit reaktiven Sauerstoffs (ROS, „*reactive oxygen species*“). In Nierenkarzinomen konnten Mutationen

von *OGG1* in bis zu 85% der untersuchten Tumoren gefunden werden und führen zu verringerter Reparaturaktivität. Derartige Mutationen in *OGG1* sind somit möglicherweise ursächlich an der malignen Entartung beteiligt (Audebert et al., 2000; Chevillard et al., 1998). Die Relevanz von *OGG1* in der Genom-Stabilisierung wird durch Befunde unterstützt, die einen Ausfall von *ogg1* in Hefe mit einem Mutator-Phänotyp, einen starken Anstieg der spontanen Mutationsrate in Verbindung bringen konnten (Thomas et al., 1997). *Ogg1-knockout* Mäuse zeigen in der Leber, interessanterweise jedoch nicht in anderen Organen, eine erhöhte spontane Mutationsrate (Klungland et al., 1999).

Das Gen für den Rezeptor *TGFBR2* kartiert auf 3p22. Dessen Ligand TGF- β fungiert als Zytokin in der Proliferations- und Differenzierungs-Regulation. Die Wirkweise des Liganden TGF- β ist multifunktionell (Perlman et al., 2001). So wurde unter anderem gezeigt, dass eine Signalkaskade in epithelialen Zellen die Proliferation hemmt während mesenchymale Zellen stimuliert werden. Wie im Mammakarzinom, wo durch Herabregulation des *EGFR* die Sensitivität für EGFB supprimiert wird, könnte im Nierenkarzinom aufgrund der Reprimierung von *TGFBR2* die physiologische TGF- β vermittelte Proliferationshemmung ausfallen. Zumindest in Nierenkarzinom-Zelllinien konnte die Reprimierung von *TGFBR2* nachgewiesen werden (Gomella et al., 1989). Die stabile Rekonstitution des Gens in *Tgfbr2*-defizienten Nierenkarzinomzellen der Maus (Renca) unterdrückte die Tumorigenität der Zelllinie. Die Rolle des *Tgfbr2* als Tumorsuppressor konnte so *in vitro* funktionell in Säugerzellen untermauert werden (Engel et al., 1999) und unterstreicht die postulierte Rolle von *TGFBR2* als Tumorsuppressor der Niere im humanen System.

RASSF1 wird durch alternatives Spleissen in drei Isoformen (*RASSF1A-C*) exprimiert und besitzt zu seinem Homolog in der Maus (*Nore1*), das in einem GTP-abhängigen Mechanismus mit Ras assoziiert, 50 Prozent Aminosäureidentität (Tommasi et al., 2002; Ortiz-Vega et al., 2002). Die Funktion übt *RASSF1* über seine RAS Assoziations-Domäne (RA) aus, die in allen drei Isoformen enthalten ist. Das Gen liegt in Karzinomen der Niere, der Lunge, der Brust, des Kolons, der Leber sowie der Schilddrüse und anderen Geweben deletiert und/oder epigenetisch inaktiviert vor (Dammann et al., 2001a; Liu et al., 2002; Schagdarsurengin et al., 2002; van Engeland et al., 2002; Yoon et al., 2001; Dreijerink et al., 2001; Dammann et al., 2001b; Morrissey et al., 2001). Transfektionsexperimente wiesen der Isoform *RASSF1A* als einziger Variante tumorsuppressive Wirkung zu (Ortiz-Vega et al., 2002). Aufgrund der Sequenzhomologien zu *Nore1* und dessen Einbindung in den RAS-Signalweg wird *RASSF1* gleichfalls als RAS-Effektor angesehen. *RASSF1A*-Hypermethylierung und RAS-Mutationen schließen sich wenigstens im Kolonkarzinom gegenseitig aus (van Engeland et al., 2002). Dieser Befund könnte ein Hinweis auf die Funktion von *RASSF1A* als Negativeffektor von RAS in in einem pro-apoptischen Signalweg sein. Ein funktioneller Ausfall von *RASSF1* könnte daher den gleichen zellulären Effekt aufweisen wie eine onkogene Mutation von RAS (Dammann et al., 2003).

PTPRG ist eine Rezeptor-gekoppelte Protein-Tyrosin-Phosphatase und könnte antagonistisch zu den in vielen zellulären Signalwegen eingebundenen Tyrosinkinasen wirken. Viele der bekannten Proteinkinasen stellen Onkoproteine dar. Konsequenterweise könnten Rezeptor-Protein-Tyrosinkinasen als mögliche Tumorsuppressoren wirken (LaForgia et al., 1991). Das Protein wird in Niere und Lungengewebe exprimiert, wogegen sich in einigen Lungenkarzinomen und Nierenkarzinom-Zelllinien keine Expression feststellen lässt (LaForgia et al., 1991). Auf Genomebene konnte der Verlust der Heterozygotie des PTPRG-Lokus in Lungenkarzinomen und Zelllinien des Nierenkarzinoms nachgewiesen werden. Mutationsanalysen in der für die Phosphataseaktivität essenziellen, zytoplasmatischen Domäne blieb in Lungenkarzinomlinien (Tsukamoto et al., 1992) und in Primärtumoren der Niere (Druck et al., 1995) ohne pathologischen Befund.

Die Rolle des FHIT-Gens in der Tumorigenese kleinzelliger Lungenkarzinome, in Karzinomen des Kopf-Hals und Nasenraumes, in Mammakarzinomen sowie in Kolon-Adenomen scheint gesichert (Huebner et al., 1998). FHIT fungiert als Hydrolase der Apoptoseinduktoren Diadenosine-5',5''-P₁,P₃-Triphosphat (AP₃A) und Diadenosine-5',5'''-P₁,P₄-tetrphosphat (AP₄A) (Barnes et al., 1996; Nishimura et al., 1997; Vartanian et al., 1999; Nishimura, 1998). Die tumorsupprimierende Wirkung von FHIT wurde u.a. durch Transfektionsexperimente bestätigt. So konnte gezeigt werden, dass die Komplementation FHIT-defizienter Zellen eine verminderte Tumorigenität bewirkt (Siprashvili et al., 1997). Dabei scheint die Fähigkeit der Tumorsuppression nicht in der AP₃A-Hydrolaseaktivität begründet zu sein, denn Transfektionen mit mutierten Varianten der katalytischen Domäne von FHIT verhinderten die Tumorsuppression nicht. Mausmodelle unterstreichen die Bedeutung von Fhit als Tumorsuppressor (Dumon et al., 2001). In deren Komplementationsversuchen konnte gezeigt werden, dass *Fhit*^{+/-} heterozygote *knockout* Tiere, in denen durch Karzinogengabe sehr effektiv Tumorbildung induziert werden kann, durch Adenovirus-vermittelte Transfektion mit Fhit(wt) die Tumorigenese inhibiert wurde.

Die Relevanz von FHIT für das sporadische Nierenkarzinom wird noch immer diskutiert. Während der Allelverlust der kolokalisierten Bruch-Region FRA3B in zahlreichen Studien beobachtet werden konnte, wurde in RT-PCR Experimenten das intakte Transkript in sporadischen NZK und Zelllinien klarzelliger NZK gefunden (Bugert et al., 1997; Van-Den-Berg et al., 1997; Wang et al., 1998). Gestützt wird die mögliche Rolle von FHIT als Tumorsuppressor in NZK durch genetische und immunhistochemische Untersuchungen. Hier konnte gezeigt werden, dass in etwa der Hälfte der untersuchten sporadischen NZK und NZK-Linien eine Herabregulation des FHIT-Proteins erfolgt (Ramp et al., 2002; Hadaczek et al., 1998; Velickovic et al., 1999). Neuere LOH-Untersuchungen zeigten in 96% der untersuchten klarzelligen NZK einen durchgängigen Verlust der Heterozygotie von 3p25-p14.2. Die Entwicklung der Hemizygotie von VHL und FHIT (und von

dazwischen lokalisierenden Kandidaten) wird als ein frühes Ereignis in der Nierentumorgenese angesehen (Sükösd et al., 2003).

Der in Zellhybrid-Experimenten tumorsupprimierend wirkende Locus *NRC-1* (nonpapillary renal carcinoma 1, (3p12)) (Lott et al., 1998; Lovel et al., 1999) enthält das u.a in Nierentumoren hypermethylierte Gen *ROBO1* (Dallol et al., 2002). Die Rolle von *ROBO1* als Tumorsuppressor wird gestützt von mehreren Befunden. So konnte in einer Lungenzelllinie die homozygote Deletion von Exon 2 gefunden werden. Weiterhin ist ein Verlust der Heterozygotie des *ROBO1* Locus in Karzinomen der Lunge und der Niere nachweisbar. Eine in der Maus untersuchte homozygote Deletion von *Robo1* in Exon 2 verursacht eine verzögerte Reifung der Lungen. Die Entwicklungsstörung verursacht bei 63 Prozent der homozygot betroffenen Nachkommen innerhalb von 24 Stunden nach Geburt den Tod durch respiratorisches Versagen. Überlebende zeigen eine erhöhte Tendenz zur Entwicklung bronchialer Hyperplasien. Die Rolle von *ROBO1* in der Nierentumorgenese wurde durch die *knockout*-Daten nicht gestützt, da eine Entwicklungsstörung oder erhöhte Tumorbildung in diesem Organ bei *Robo1*^(-/-) Tieren nicht feststellbar ist (Xian et al., 2001). Die aktuellen Befunde weisen *ROBO1* vor allem Bedeutung in der Tumorgenese der Lunge zu, wobei die Hypermethylierung des *ROBO1* Promotors in klarzelligen NZK auch ein Hinweis auf eine mögliche Rolle von *ROBO1* in der Progression dieses Malignoms (Dallol et al., 2002) sein könnte.

5.3.4 Deletionsstudien des *VHL*-Locus

Man geht davon aus, dass die Mechanismen, die auf zellulärer Ebene zum *VHL*-Funktionsverlust führen, bei sporadischen und familiären Nierenzellkarzinomen identisch sind (*VHL*-Mutation und -Deletion). Zur Diagnostik genomischer Veränderungen am *VHL* Locus in familiären *VHL*-Fällen - die durch eine Keimbahnmutation die genetische Veränderung in allen Zellen besitzen - sind verschiedene molekulargenetische Techniken in Gebrauch:

Punktmutationen, die in 50% der familiären *VHL*-assoziierten Fälle zu finden sind, werden durch Sequenzierung nachgewiesen - wobei ein SSCP Screening (*single strand conformation polymorphism*) vorgeschaltet sein kann, bei dem sich Sequenzunterschiede von PCR-amplifizierten Genfragmenten durch verändertes Laufverhalten in Polyacrylamid-Gelen nachweisen lassen (Maher et al., 1996).

Deletionen eines Allels des *VHL* Locus, die weitere 10-20 % der Keimbahnmutationen ausmachen, können nicht mit der SSCP-Analyse detektiert werden, da durch das verbleibende *VHL* Wildtyp-Allel ein scheinbarer Normalbefund erhoben wird. Deletionsanalysen werden deshalb mit Methoden durchgeführt, die auch eine quantitative Aussage zulassen, wie die RFLP-Analysen (*restriction fragment length polymorphism*), an die sich quantitative *Southern-Blotting* Untersuchungen anschließen (Crossey et al., 1994; Richards et al., 1994; Stolle et al., 1998; Pack et al., 1999).

Nicht analysierbar bleiben aber immer noch familiäre *VHL* Patienten, die eine Deletion im Mosaikstatus in Ihren Zellen vorweisen (Sgambati et al., 2000). Um diese Patienten

zusammen mit den Fällen, in denen konstitutiv ein Verlust des *VHL* Genlocus besteht, diagnostizieren zu können, bietet sich eine FISH-Analyse mit einer *VHL*-spezifischen Sonde auf Metaphasepräparate an. Sie kann die bisher bestehende diagnostische Lücke schließen, da sie in den meisten fraglichen Fällen einen Allelverlust spezifisch und sensitiv nachweist, was mit einer Sonde demonstriert wurde (Pack et al., 1999), die jedoch für unser Labor nicht verfügbar war. Deshalb wurden in der vorliegenden Arbeit eigene Sonden für den *VHL* Locus generiert (siehe Kap. 4.2.2). Sie zeigten eine zu der bestehenden Publikation vergleichbare Nachweiseffizienz (Pack et al., 1999), wobei aufgrund der Sondengröße nicht nur *VHL*, sondern auch flankierend liegende Gene (Exon 1-3 von *IRAK2* und *FANCD2*) gleichfalls nachzuweisen sind.

Aus Allel-Deletionsstudien an familiären *VHL* assoziierten Tumorfällen, zu denen auch Patienten mit *VHL*-Syndrom zählen, zeigt sich, dass diese Verluste größere Bereiche des Chromosoms 3p betreffen können. Insoweit ist mit großer Wahrscheinlichkeit davon auszugehen, dass in diesen Patienten die *VHL* flankierende Region ebenfalls deletiert ist (Clifford et al., 1998; Richards et al., 1993; Lott et al., 2002). Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit hergestellten Sonden sind daher dazu geeignet; neben konstitutionellen monoallelischen Deletionen von *VHL* selektiv beide benachbarten Kandidatengenregionen zu detektieren. In den meisten der zwölf bisher untersuchten *VHL*-Verdachtsfälle konnten mit den hergestellten Sonden beide Allele des *VHL*-Locus detektiert werden. Zusammen mit den Ergebnissen aus der parallel durchgeführten Gen-Sequenzierung von *VHL* kann daher ein für die Symptomentwicklung ursächlicher konstitutioneller Allelverlust mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden. In einer Patientin konnten in einer ersten Hybridisierung sowohl ein als auch zwei Signale auf Lymphozytenchromosomen nachgewiesen werden. Es muss daher nach einem Mosaik für den *VHL*-Allelstatus weiter gesucht werden, der unter Umständen über die Keimbahn vererbt werden kann (Sgambati et al., 2000).

5.3.4.1 Weitere chromosomale Imbalancen

Im Rahmen der hier durchgeführten Studie konnte die signifikante Korrelationen des Zugewinns von Chromosom 10 ($p=0.0044$) oder Chromosom 17 ($p=0.0182$) mit fortgeschrittener zellulärer/histologischer De-Differenzierung klarzelliger NZK aufgezeigt werden. Publierte CGH Untersuchungen des gleichen Subtyps berichten, dass genomische Zugewinne des Chromosoms 17 mit hohem Tumorstadium assoziiert sind (Bissig et al., 1999; Gronwald et al., 1997). Die hier erstmalig beschriebene Korrelation eines Chromosom 10 Zugewinns mit hoher Entdifferenzierung basiert jedoch auf Beobachtungen basierend auf der relativ kleinen Zahl von 46 Tumoren. Sollte sich der mit CGH aufgezeigte Zusammenhang an einem größeren Kollektiv klarzelliger Tumoren bestätigen lassen, könnte eine Neubewertung von Chromosom 10 Zugewinnen nötig werden.

Zugewinne auf Chromosom 17 und 10 sind aufgrund der festgestellten Progressionsrelevanz Indiz für die Lokalisation potenzieller Onkogene mit Bedeutung für die Nierenkarzinogenese. Eine Diskussion möglicher Kandidatengene dieser

Chromosomen erscheint jedoch verfrüht, da die betroffenen chromosomalen Regionen noch nicht weiter eingegrenzt sind.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Zugewinn von Chromosom 5 in 63% der klarzelligen Nierenkarzinome gefunden (vgl. Tabelle 1). Dieser Befund ist damit gleich häufig wie der Verlust des Chromosomenarms 3p. In den meisten Fällen handelt es sich um einen Zugewinn des gesamten Chromosoms. Bezieht man partielle Zugewinne zur Abgrenzung einer kleinsten gemeinsam zugewonnenen Region ein, so resultiert dieser im 5q22-qter Bereich. Derzeitige Erkenntnisse legen für das klarzellige Nierenkarzinom nahe, dass ein Zugewinn des Chromosoms 5 neben dem Verlust von Chromosom 3 ein frühes Ereignis in der Tumorgenese ist (Kovacs, 1993a; Presti, Jr. et al., 1998).

Die Beobachtung eines Zugewinns von Chromosom 5-DNA bestätigt veröffentlichte Literaturdaten, welche die Duplikation des langen Armes von Chromosom 5 als Resultat einer nicht-homologen, mitotischen Rekombination dieses Chromosomenarms mit Chromosom 3p beschreiben (Kovacs und Kung, 1991b). Neben der Rekombination nicht homologer Sequenzen der Chromosomen 3 und 5 sind die Polysomie 5 oder die Isochromosom 5q-Bildung im klarzelligen Nierenkarzinom beobachtet worden (Kovacs und Frisch, 1989; Dal Cin et al., 1988; van den Berg et al., 1993). Darüber hinaus konnte im Rahmen der hier vorgelegten Studie eine Korrelation des Chromosom 5-Zugewinns mit einer gut ausgeprägten Differenzierung der Karzinome nachgewiesen werden. Ein solcher Zusammenhang wird beim Studium der Literaturdaten ebenfalls deutlich, was die Relevanz der hier vorgelegten Daten untermauert. So finden verschiedene Gruppen einen Zusammenhang zwischen Zugewinn des Chromosoms und niedrigem Tumorstadium sowie gut differenzierten Tumorzellen (Presti, Jr. et al., 1996a; Dijkhuizen et al., 1997). Eine weitere Studie findet eine Beziehung zwischen dem Zugewinn der Region 5q21-qter, in der zahlreiche Zytokin-Gene kartieren, mit morphologischen Merkmalen, die mit einer günstigen Prognose einhergehen (Gunawan et al., 2001; Podolski et al., 1995). Die statistische Auswertung 118 zytogenetischer Befunde klarzelliger Nierenkarzinome ergab hier eine signifikant günstigere Prognose für Patienten mit einem Zugewinn von Chromosom 5. Es konnte jedoch keine Beziehung zwischen Zugewinn des Chromosoms 5 mit Stadium und Grad des Tumors gefunden werden (Gunawan et al., 2001). Die CGH-Analyse von dreizehn klarzelligen Nierenkarzinom-Zelllinien durch Yang et al. zeigte in 85% aller Zelllinien eine Duplikation des Chromosoms 5q. Weitergehende Eingrenzung durch FISH-Analysen identifizierte eine kleinste gemeinsam zugewonnene Region zwischen den polymorphen Markern D5S642 (5q31) und D5S673 (5q33) (Yang et al., 2000).

Auch wenn viele Ergebnisse - so auch die hier präsentierte Studie - auf einen Zusammenhang zwischen dem Zugewinn von Chromosom 5q-DNA und einer günstigen Prognose hindeuten, wird die klinische Bedeutung eines Chromosom 5q-Zugewinns kontrovers diskutiert. So kommt eine FISH-basierte Untersuchung, welche die Polyploidie von Chromosom 5 (nachgewiesen mit einer ko-hybridisierten Sonde für 5p) im Tumormaterial analysiert, zu dem Resultat, dass ein Zugewinn von Chromosom 5 nicht mit einer günstigen Prognose assoziiert ist (Nagao et al., 2002). Eine weitere, molekular-

zytogenetische Studie an zehn Zelllinien aus metastasierten, klarzelligen Karzinomen konnte im Vergleich mit Primärtumoren (durchgängig Stadium IV) ebenfalls keine verminderten Chromosom 5-Kopienzahlen feststellen und unterstützt damit die indirekte Assoziation eines Chromosom 5-Zugewinns mit günstiger Prognose ebenfalls nicht (Pavlovich et al., 2003).

Die Suche nach (einem) auf Chromosom 5 lokalisierten Tumorsuppressorgen(en) erscheint, trotz dieser teilweise widersprüchlichen prognostischen Aussagen, sinnvoll und lohnend. In der Mehrzahl der beschriebenen Fälle (wie auch in der vorliegenden Studie) ist der Zugewinn des Chromosoms 5 ein günstiger prognostischer Faktor. Dem entgegen sind Allelverluste, besonders in proximal der Bande 5q22 gelegenen Bereichen, anscheinend ungünstig gegenüber einem normalen Allelstatus bzgl. Prognose und histopathologischen Parametern. So wurde von Morita und Mitarbeitern beschrieben, dass der Allelverlust dieses Chromosoms (im Bereich 5q21) im Zusammenhang mit einem hohen Tumorgrad bzw. Fernmetastasen steht (Morita et al., 1991b; Morita et al., 1991a). Als Kandidaten kämen Tumorsuppressorgene in Frage, die im Zuge eines Chromosom 5-Zugewinns vermehrt gebildet und dadurch Prozesse wie z.B. die Dedifferenzierung prä-maligner Zellen vermindern. Von den bekannten Genen dieser Gruppe auf Chromosom 5q wird besonders *MSH3* (mutS homolog 3 (E. coli)) diskutiert, da es spezifisch in Tumorgewebe der Niere differentiell herabreguliert ist. So findet man eine signifikante Korrelation der MSH3-Expressionsstärke mit der Ent-Differenzierung der Tumorzellen (Deguchi et al., 2003).

Ein Verlust von Chromosom 4 konnte in dieser Studie klarzelliger Karzinome erstmals mit hohem Tumorstadium in Verbindung gebracht werden. Der Verlust des Chromosoms kommt im Nierenkarzinom selten vor. LOH-Untersuchungen detektierten in fünf bis acht Prozent der untersuchten Tumoren Allelverluste (Thrash Bingham et al., 1995; Morita et al., 1991a). CGH Studien detektierten einen Kopienverlust des Chromosoms in zehn Prozent aller Tumoren (Moch et al., 1996). Der Anteil der Karzinome mit Chromosom 4 Verlust im eigenen Kollektiv liegt bei fünfzehn Prozent.

Unterstützende Hinweise für die These, dass ein Chromosom 4 Verlust im Nierenkarzinom als progressionsrelevant zu werten ist, finden sich in Studien von Jiang et al. (Jiang et al., 1998a). Dort konnte der Verlust dieses Chromosoms in sarkomatoid transformierten Nierenkarzinomen, die sich durch hochgradig entdifferenzierte Zellen und eine überaus schlechte Prognose auszeichnen, gefunden werden. Jiang et al postulierten jedoch aufgrund ihrer CGH Studien und darauf aufbauender, mathematischer Modelle der Onkogenese einen frühen Verlust des Chromosoms 4 (Jiang et al., 2000), was im Widerspruch zur hier gefundenen Assoziation zwischen Chromosom 4-Verlust und hohem Tumorstadium steht. Die statistische Basis dieser Studie ist dabei aufgrund der 116 untersuchten, klarzelligen Karzinome breiter als die der eigenen Studie. Weiterhin ist zu berücksichtigen, dass ein Vergleich histologisch gut charakterisierter, klarzelliger Karzinome mit dem sarkomatoid transformierten Karzinom der Niere mit Vorsicht interpretiert werden muss. Dennoch besteht über die Herkunft karzinomatöser Bestandteile der Tumore Konsens (Störkel et al., 1997; Kovacs et al., 1997; Kovacs,

1993b). Der histologische Ursprung sarkomatoid transformierter Karzinomzellen konnte zudem trotz komplexer Karyotypen durch genetische Typisierung unter Beweis gestellt werden (Dijkhuizen et al., 1997). Andere Studien sehen die genetische Vergleichbarkeit von sarkomatoid transformierten Karzinomen und Karzinomen nicht gegeben (Dal Cin et al., 2002).

Literaturdaten beschreiben den Verlust von Chromosom 6q als Progressionsmarker des klarzelligen Karzinoms. Obwohl der Verlust dieses Chromosomenarms in siebzehn Prozent aller klarzelligen Karzinome in der hier vorgestellten Studie gefunden wurde, konnte eine Beziehung zu Parametern der Progression nicht bestätigt werden.

Im Ergebnisteil der vorliegenden Arbeit ist dargestellt, dass ein Zugewinn des langen Armes von Chromosom 8 in Tumormaterial klarzelliger Karzinome mit einer ungünstigen Prognose für den betroffenen Patienten in Verbindung steht. Diese Korrelation zwischen Chromosom 8q-Zugewinn und verminderter Lebenserwartung ist statistisch hochsignifikant ($p=0.0001$). Der hier aufgezeigte Prognoseunterschied mit klinischer Relevanz ist neu. In CGH-Untersuchungen von Pavlovich et al. wird der Zugewinn des langen Armes neben Verlusten des kurzen Armes ebenfalls gefunden, eine Prognoserelevanz konnte aber dort aufgrund des Untersuchungskonzeptes (ausschließlich Stadium IV Karzinome) nicht festgestellt werden (Presti, Jr. et al., 1996a; Gronwald et al., 1997; Pavlovich et al., 2003). Bissig et al. stellten in 22% der von ihnen mit CGH untersuchten Metastasen des klarzelligen Nierenkarzinoms einen Zugewinn des Chromosomenarms 8q fest (Bissig et al., 1999). In den aufgeführten Studien wurden im Vergleich zur vorliegenden Studie deutlich geringere Fallzahlen des klarzelligen Karzinoms untersucht. CGH Studien mit größeren Fallzahlen konnten keinen Zugewinn des Chromosoms detektieren (Jiang et al., 2000). Ergebnisse zytogenetischer Untersuchungen zeigen zwar, dass strukturelle Rearrangements im Nierenkarzinom oft das Chromosom 8 betreffen. Die Konsequenz der meist unbalanzierten Translokation ist dabei aber häufig der Verlust des kurzen Arms von Chromosom 8 (Elfving et al., 1997). FISH Untersuchungen konnten durch Ko-Hybridisierung einer Zentromersonde und einer Sonde für die Chromosomenbande 8p22 in einigen Karzinomen der Niere (papillären und klarzelligen) den Verlust von 8p und die Polyploidie des verbleibenden Chromosomensegments nachweisen (Moch et al., 1998b). Die hier gefundenen Kopienzugewinne von 8q stellen demzufolge keine isolierte Beobachtung dar, sondern treten ebenso in anderen Studien des klarzelligen Nierenkarzinoms in Erscheinung. Die Häufung chromosomaler Zugewinne des Chromosomenarms 8q in klarzelligen Nierenkarzinomen konnte in anderen Studien jedoch nicht in diesem Ausmaß festgestellt werden. Die Frage bleibt daher zu klären, ob sich die in dieser Arbeit erstmals beschriebene Prognose-Relevanz eines Chromosom 8q Zugewinns in anderen Patientenkollektiven bestätigen lässt. Der in der vorliegenden Arbeit eindeutig feststellbare Prognose-Bezug eines 8q Zugewinns weist auf eine Einbindung dort kartierender Proto-Onkogene in die Pathogenese des klarzelligen Karzinoms hin. Auch in

diesem Fall ist die betroffene Chromosomenregion zu groß um - ohne spezifischere Daten - über mögliche Kandidatengene zu spekulieren.

5.3.5 Papilläre Karzinome

Für die Gruppe der 15 mit CGH untersuchten papillären NZK konnte die prognostische Aussagekraft eines 14q-Zugewinns nachgewiesen werden. Die im Folgenden aufgeführte Tabelle 35 gibt alle der in dieser Arbeit gefundenen Imbalancen bei papillären Karzinomen wieder.

Tabelle 35: Übersicht der in dieser Arbeit gefundenen relevanten Chromosomenimbalancen papillärer Karzinome und deren Bedeutung als Marker der Progression oder Prognoseindikator. (•) = vorhanden; ■ = in vorliegender Arbeit statistisch abgesichert gefunden; ■ = in vorliegender Arbeit und zugleich in Literatur beschrieben.

Chromosomen/-arm	Gewinn	Verlust	Korrelation
1		•	
3	•		Hohes Stadium
5	•		
6		•	
7	•		
12	•		Hohes Stadium
14		•	Schlechte Prognose
16	•		Hohes Stadium
17	•		
20	•		Hohes Stadium
Y		•	

Der wohl interessanteste Befund innerhalb der Gruppe der papillären Nierenzellkarzinome ist der einer prognostischen Relevanz des Chromosom 14q-Verlusts (siehe Kap. 5.3.8). Der Zugewinn des Chromosoms 3 wurde als charakteristisches Merkmal des papillären Karzinoms beschrieben (Renshaw und Fletcher, 1997). Kovacs und Mitarbeiter fanden die Trisomie 3 aufgrund zytogenetischer Daten mit papillären Karzinomen, nicht hingegen mit papillären Adenomen vergesellschaftet (Kovacs, 1994). Drei von fünf Metastaseverursachenden Primär-Karzinomen wiesen in CGH-Untersuchungen der vorliegenden Arbeit Zugewinne des Chromosoms 3 auf. Die Prognoserelevanz eines Chromosom 3 Zugewinns konnte aber nicht statistisch belegt werden.

Ein Verlust von Chromosom 3p wird in papillären Karzinomen sehr selten gefunden. Lediglich eines der fünfzehn untersuchten papillären Karzinome zeigte den Verlust des kurzen Arms von Chromosom 3 (vgl. Abbildung 7). Da der Chromosom 3p-Verlust das herausragende Ereignis in klarzelligen Nierenkarzinomen ist, liegt die Vermutung nahe, dass eine histopathologische Fehltypisierung des als papillär eingestuften Tumors der Grund für diesen außergewöhnlichen Befund sein könnte. Eine solche Interpretation liegt nahe, da Fälle des papillären Nierenkarzinoms beschrieben sind, die zytomorphologische Eigenschaften des klarzelligen Karzinoms aufweisen, wobei jedoch sämtliche zytogenetischen Analysen der Tumorzellen den für klarzellige Karzinome typischen Chromosomenstatus zeigen (Füzesi et al., 1999). Vor einer weiterführenden

molekulargenetischen Analyse wird eine histopathologische Reklassifizierung stehen. Die molekulare Analyse des in der vorliegenden Studie enthaltenen Tumors, z.B. hinsichtlich eines *VHL*-Funktionsverlustes durch Mutation oder epigenetische Inaktivierung könnte weitere Indizien für eine Einstufung dieses Tumors als klarzelliges NZK liefern. Diese Beobachtungen zeigen, dass Fehlinterpretationen des Zelltyps aufgrund unklarer Histologie eines Karzinoms anhand molekular-(zyto)genetischer Charakteristika überprüft werden könnten.

Ein interessanter Aspekt des papillären Malignoms ist der phänotypisch wie genotypisch beschreibbare Adenom-Karzinom Übergang (van den Berg et al., 1997): Während papilläre Adenome in der Regel Zugewinne der Chromosomen 7, 17 und – bei männlichen Patienten – den Verlust des Y-Chromosoms aufweisen, ist das papilläre Karzinom durch zusätzliche Zugewinne der Chromosomen 3, 12, 16, und 20 gekennzeichnet (Presti, Jr. et al., 1991; Kovacs, 1989; Presti et al., 1993; Kovacs et al., 1991). Eine solche Korrelation der Zugewinne der Chromosomen 3, 12, 16 oder 20 mit Tumorprogression konnte in den eigenen Untersuchungen nicht bestätigt werden. Eine interessante Region des kleinsten gemeinsamen Zugewinnes stellt der Bereich 12q24.1-q24.3 dar, in denen potenziell tumorrelevante Proto-Onkogene vermutet werden müssen.

5.3.6 Chromophobe Karzinome

Chromophobe Karzinome der Niere können - neben ihrer ontologisch-histologischen Typisierung - auch aufgrund zytogenetischer Befunde eingruppiert werden: Dieser Nierenkarzinom-Subtyp zeichnet sich insbesondere durch eine ausgeprägte Fehlverteilung ganzer Chromosomen aus, die in bestimmten Kombinationen auftreten.

Tabelle 36: Übersicht der in dieser Arbeit gefundenen relevanten Chromosomenimbilanzen chromophober Karzinome und deren Bedeutung als Marker der Progression oder Prognoseindikator. (●) = vorhanden; ■ = in vorliegender Arbeit erstmals in Bezug zu klinischen /pathologischen Parametern gefunden.

Chromosomen/-arm	Gewinn	Verlust	Korrelation
1		●	
2		●	Schlechte Prognose
4	●		
5	●		
6		●	Hohes Stadium
7	●		
10		●	
11	●		
12	●		Schlechte Prognose
13		●	
17		●	Schlechte Prognose
18	●		
20	●		Hoher Grad
21		●	
X	●		Schlechte Prognose
Y		●	

In Tabelle 36 sind die im Rahmen der vorliegenden Analyse von 14 chromophoben Nierenzellkarzinomen gewonnenen Ergebnisse zusammengefasst dargestellt. Aufgrund der insgesamt geringen Fallzahlen existieren für diesen Subtyp sehr wenige Erkenntnisse hinsichtlich einer Progressions- oder Prognoserelevanz chromosomaler Veränderungen. Das Kollektiv der hier untersuchten chromophoben Nierenkarzinome zeigt mit dem in der Tabelle aufgeführten Imbalanzmuster eine weitgehende Übereinstimmung mit bereits publizierten Daten (Speicher et al., 1994; Kovacs und Kovacs, 1992). So konnten alle für chromophobe NZK charakteristischen Chromosomenverluste ebenfalls beobachtet werden, darüber hinaus wurden zudem weitere Imbalanzen identifiziert. Insgesamt bestätigen die hier vorgelegten molekular-zytogenetischen Analysen zytogenetische Befunde (erstellt an Primärtumoren), wonach der chromophobe Karzinom-Subtyp zur Polyploidisierung neigt (Shuin et al., 1996; Gunawan et al., 1999).

Ein neuer Aspekt, der durch die hier präsentierte Untersuchung erstmals gezeigt werden konnte, war die signifikante Korrelation eines Chromosom 6-Verlusts mit einem hohen Tumorstadium ($p=0.0316$). Im Unterschied zum klarzelligen Karzinom der Niere, bei dem häufig Verluste von 6q zu verzeichnen sind, geht in chromophoben Karzinomen vornehmlich das gesamte Chromosom 6 verloren.

Der Zugewinn von Chromosom 16 findet sich in chromophoben Karzinomen gehäuft in Karzinomen hoher Stadien (SIII/SIV). Auf diesem Chromosom wurden bisher nur wenige Onkogene identifiziert: Überexpression von *MMP2* (*matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A, 72kDa gelatinase, 72kDa type IV collagenase)*; 16q13-q21) konnte in Nierenkarzinomen mit einer ungünstigen Prognose korreliert werden (Kallakury et al., 2001). Die ungünstige Prognose könnte durch eine gesteigerte Invasivität MMP2 überexprimierender Tumorzellen verursacht werden.

Chromophobe Karzinome, die einen Zugewinn von Chromosom 20 aufwiesen, besaßen mehrheitlich hohen Grad (G3/G4). Der Zugewinn stellt daher einen Faktor der Tumorprogression dar. *MMP9* (*matrix metalloproteinase 9 (gelatinase B, 92kDa gelatinase, 92kDa type IV collagenase)*; 20q12-q13) wäre z.B. ein Kandidat, der aufgrund der erhöhten genomischen Kopienzahl dieses Chromosoms onkogen wirken könnte, da es auch in invasiven Formen des Nierenkarzinoms überexprimiert gefunden wurde (Lein et al., 2000; Kallakury et al., 2001). MMP9 und MMP2 sind durch Abbau der extrazellulären Matrix wesentlich an der Umgestaltung des extrazellulären Proteingerüsts beteiligt und könnten daher für eine erhöhte Invasivität und gesteigertes Metastasierungspotenzial der Tumorzellen mitverantwortlich sein.

Hinsichtlich des chromophoben Karzinoms liegen nur sehr wenige Studien vor, die Progression- oder Prognose-assoziierte, genetische Merkmale fanden. Eine Studie an metastasierten chromophoben Karzinomen fand neben charakteristischen Unterrepräsentationen zusätzliche strukturelle Veränderungen der Chromosomen 1, 5, 12, 15 und 18 (Dijkhuizen et al., 1998). Es liegt nahe, derartige mit hohem Stadium in Bezug stehende Veränderungen als Kandidaten der Tumorprogression einzustufen. Aufgrund der geringen Fallzahlen ist eine Einschätzung der gefundenen Veränderungen

hinsichtlich der Relevanz für Progression oder Prognose schwierig. Gleiches gilt auch für die eigenen molekular-zytogenetischen Ergebnisse dieses Subtyps. Die eigenen Untersuchungen konnten sechs chromosomale Imbalancen mit Prognoserelevanz identifizieren.

Der Verlust der Chromosomen 2 und 17, sowie die Zugewinne der Chromosomen 9, 12 und des X-Chromosoms zeigten im chromophoben Karzinom eine ungünstige Prognose. Ein Verlust des Chromosoms 8 ist dagegen in diesem Subtyp durch eine günstige Prognose gekennzeichnet ($p=0.0728$). Die statistische Basis aller hier aufgezeigten Korrelationen ist aufgrund der 14 untersuchten Tumoren gegenüber den klarzelligen Karzinomen vergleichsweise niedrig.

Für alle betroffenen Chromosomenregionen weitere Kandidatengene der Tumorgenese und Progression zu diskutieren erscheint verfrüht, da zu wenig spezifische Daten vorliegen.

Vier der elf mit MSA untersuchten chromophoben Nierenkarzinome zeigten Allelverluste des Chromosomenarms 14q.

5.3.7 Onkozytome

Onkozytome weisen in sehr wenigen Fälle erfassbare genetische Veränderungen auf und heben sich somit deutlich von den untersuchten Karzinomen der Niere ab. Das Onkozytom behält seine ursprüngliche chromosomale, nahezu diploide Ausstattung bei und ist zudem ein Tumor, bei dem die histologische Differenzierung weiterbesteht. Damit scheint ein Zusammenhang zwischen genomischer Stabilität und Wachstumsverhalten *in vivo* gegeben zu sein.

Andere Untersuchungen des Onkozytoms der Niere konnten mittels CGH in etwa der Hälfte der Tumoren genomische Veränderungen beschreiben. Dabei wurde vor allem der Verlust von Chromosom 1 und / oder 14 festgestellt. (Presti, Jr. et al., 1996b). Der Verlust des Chromosom 1 konnte in eigenen Untersuchungen bestätigt werden. Die Region 1p24.2-pter konnte als gemeinsam unterrepräsentiert eingegrenzt werden. Der Verlust des Chromosomenarms 14q wurde allerdings im Onkozytom nicht gefunden. Bestätigt wurde hingegen die von Presti et al gefundene Feststellung, dass etwa 50 Prozent der Onkozytome keinerlei chromosomalen Imbalancen aufweisen. Acht der sechzehn untersuchten Onkozytome stellten sich in der CGH unauffällig dar. Die wenigen chromosomalen Imbalancen beschränkten sich dabei auf den Zugewinn des Chromosoms 7, 17 und des X-Chromosoms. Translokationen mit Beteiligung der Chromosomenbande 11q13 oder 11q12, die in einigen Onkozytomen durch zytogenetische Analysen gefundenen wurden (van den Berg et al., 1995; Füzesi et al., 1998b; Neuhaus et al., 1997; Kovacs et al., 1989b; Presti et al., 1996), entgehen aufgrund derer meist ausgeglichener DNA Bilanz einer Detektion durch CGH (Füzesi et al., 1998b; Rigola et al., 2002).

5.3.8 Untersuchungen von Chromosom 14q

Ein subtypübergreifender Verlust chromosomalen Materials ist für das Chromosom 14 zu verzeichnen. Der Verlust dieses Chromosoms dominiert im klarzelligen NZK, wobei die CGH-Daten keine chromosomalen Subbereiche anzeigen, die ganz besonders häufig DNA-Verluste aufweisen. Zwanzig klarzellige Nierenkarzinome wurden mit Mikrosatellitenanalysen auf Allelverluste des Chromosomenarms 14q untersucht. Zehn der Karzinome (50%) wiesen Allelverluste entlang nahezu aller untersuchten Marker auf (siehe Tabelle 25). Der detektierte Allelverlust des gesamten langen Arms von Chromosom 14 in einem der Karzinome konnte – unter Einbeziehung der unauffälligen CGH-Analyse dieses Tumors - als uniparentale Disomie identifiziert werden (vgl. Tabelle 26). Die festgestellte Assoziation eines 14q Verlusts mit fortgeschrittenem Tumorstadium und Tumorgrad, sowie die ungünstige Prognose, die mit einem Heterozygotieverlust dieses Chromsoms einherzugehen scheint, erreicht jedoch keine statistische Signifikanz (siehe Abbildung 22). Andere Studien diskutieren einen Verlust von Chromosom 14q als Prognosemarker klarzelliger Karzinome (Beroud et al., 1996; Wu et al., 1996).

Der wohl interessanteste Befund innerhalb der Gruppe der papillären Nierenzellkarzinome ist der einer prognostischen Relevanz des Chromosomenarm 14q-Verlusts. Der Verlust dieses Chromosomenarms geht im mit CGH untersuchten Kollektiv mit einem reduzierten postoperativen Überlebensintervall einher ($p=0.0361$). Drei der fünfzehn mit dieser Methode untersuchten Karzinome zeigten den Verlust des Chromosoms 14q. Die kleine Kollektivgröße von fünfzehn papillären Karzinomen muss in die Bewertung der Aussagekraft von Chromosom 14q als prognostischem Marker berücksichtigt werden, jedoch spricht die Tatsache, dass die hier gefundenen Imbalanzmuster weitestgehend mit bereits publizierten Daten anderer Studien des papillären Subtyps übereinstimmen (Bentz et al., 1996; Jiang et al., 1998b; Rigola et al., 2002; Kovacs, 1989; Kovacs et al., 1991; Moch et al., 1998a; Presti, Jr. et al., 1991) für die Relevanz der beobachteten Korrelation.

Die Untersuchung dreizehn papillärer Nierenzellkarzinome mit Mikrosatellitenanalysen (MSA) auf Allelverluste des Chromosomenarms 14q ergab in vier von dreizehn Karzinomen (38%) den Nachweis eines Allelverlustes für alle untersuchten Markern (vgl. Tabelle 25 und (Kleikamp, 1999)). Damit ist der Anteil der Karzinome mit 14q Verlust niedriger als in klarzelligen Karzinomen. Zusammenfassend konnte 14q-Allelverlust mit Tumorstadium und Tumorgrad (Abbildung 21), sowie Chromosomenverlust mit ungünstiger Prognose in Verbindung gebracht werden (siehe auch Abbildung 8 rechts). Lediglich der Befund einer Prognoserelevanz des Chromosom 14 Verlustes erreichte Signifikanz. Ein 14q-Allelverlust bei hohem Stadium, hoher Differenzierung oder subtypspezifischen Überleben erreichten keine statistisch abgesicherte Korrelation, was auf die Größe des untersuchten Kollektivs zurückzuführen sein kann.

Vier der elf chromophoben Nierenkarzinomen zeigten Allelverluste des Chromosomenarms 14q. Dabei konnte in chromophoben Karzinomen eine schwache Korrelation mit

fortgeschrittenem Tumorgrad festgestellt werden. Hohes Tumorstadium und ungünstige Prognose korrelieren in chromophoben Karzinomen im Unterschied zu klarzelligen und papillären Karzinomen der Niere nicht mit dem Allelverlust des Chromosomenarmes 14q (Abbildung 22).

Die 14q-Mikrosatellitenanalysen zeigten, dass keinem der drei untersuchten Karzinom-Subtypen gehäufte Allelverluste zuzuordnen sind. In Tumoren, die einen Allelverlust von Markern des Chromosoms 14 aufwiesen, konnten die CGH Daten des gleichen Gewebes nachweisen, dass eine Deletion Ursache des Allelverlustes ist. Lediglich in einem von zwanzig (5%) der gemeinsam mit CGH und MSA untersuchten Nierenzellkarzinome zeigte sich der LOH auf 14q ohne entsprechenden Deletionsbefund in der CGH. In diesem Falle ergab die Kombination der Ergebnisse beider Methoden einen Befund, der als durch uniparentale Disomie (UPD) maskierter Allelverlust des langen Arms von Chromosom 14 zu interpretieren ist (siehe Tabelle 26). Es hat sich bei der Erstellung der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass sich bei derartig großen LOH Bereichen die Kombination der MSA- und CGH-Techniken anbietet, um die Frage nach einer UPD beantworten zu können. Vereinzelt mit MSA identifizierte, interstitielle Allelverluste, die sich in der CGH unauffällig zeigten, sind durch das ungleich höhere Auflösungsvermögen der Mikrosatellitenanalyse gegenüber der CGH zu erklären. Während das Auflösungsvermögen der konventionellen CGH bei etwa 10-15 Mbp liegt, ist die MSA in der Lage, Deletionen im Bereich der Abstände der Mikrosatelliten (ca. 300 kb, vgl. Kap. 1.3.3.1) zu erfassen.

Innerhalb des mit MSA untersuchten Kollektivs konnte der 14q-Allelverlust mit hohem Grad der Ent-Differenzierung der Tumorzellen in Beziehung gebracht werden. Der Allelverlust auf 14q konnte sowohl in klarzelligen als auch in papillären Karzinomen mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium (Kleikamp, 1999) sowie mit einer deutlich schlechteren Prognose korreliert werden (Abbildung 22). Diese Befunde werden auch durch ähnliche Studien anderer Gruppen unterstützt. So konnten Beroud und Mitarbeiter an einem Kollektiv von 148 Nierenkarzinomen mittels LOH-Analysen demonstrieren, dass in klarzelligen Karzinomen der Verlust von Chromosom 14 mit einem hohen Stadium und Grad der Tumoren korreliert (Beroud et al., 1996). Zeitgleich konnten Wu und Mitarbeiter mittels FISH-Untersuchungen paraffinierter Schnitte mit Chromosom 3p- und 14q-spezifischen Sonden dieselbe Korrelation nachweisen (Wu et al., 1996).

Andere Deletionskartierungen zeigten, dass in klarzelligen Karzinomen die Region 14q24.2-qter am häufigsten von Allelverlusten betroffen ist (Herbers et al., 1997; Schullerus et al., 1997). Andere Studien untersuchten große Fallzahlen und suchten nach Allelverlusten distal der Bande 14q24.2. Man fand dort eine Korrelation zwischen Allelverlust und erhöhter Tumorzell-Proliferation. Mitsumori und Mitarbeiter brachten einen höheren Anteil von Tumorzellen mit 14q Allelverlusten und aggressiverem malignen Potenzial in Verbindung (Mitsumori et al., 2002). Die Lokalisation wenigstens eines Tumorsuppressorgens auf 14q muss daher unverändert vermutet werden. Andere

Methoden als konventionelle CGH oder die Feinkartierung mit MSA müssen hier zur Identifikation beitragen.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass sich mit den in dieser Arbeit vorliegenden Befunden der Verlust von Chromosom 14 als Progressionsmarker des klarzelligen Karzinoms bestätigen lässt. Eine Rolle des Chromosom 14 Verlusts in der Progression auch der papillären Karzinome der Niere kann auch postuliert werden, demgegenüber zeigten chromophobe Nierenzellkarzinome mit einem Verlust von 14q im Vergleich zu den übrigen Karzinomen anderer Subtypen weder einen Prognoseunterschied, noch konnte eine Beziehung zum Tumorstadium gefunden werden.

6 Ausblick

Die mit CGH gefundenen chromosomalen Veränderungen in Nierenzellkarzinomen, die mit Progression und Prognose der einzelnen Tumorsubtypen korreliert werden konnten, müssen in folgenden Studien zunächst weiter eingegrenzt werden, um schließlich bis auf Kandidatengen-Ebene zu gelangen. Von besonderem Interesse sind hier neben den bisher als Progressionsmarkern bekannten Chromosomenabschnitte 6q, 8p, 9p und 14q die durch die vorliegende Arbeit bestimmten Chromosomen(bereiche) 5q, 4, 8q, 10q, 12q, 16, 17 und 20. Dabei werden Festphasen-gekoppelte DNA- *Array* Techniken, wie die Matrix-CGH (Solinas-Toldo et al., 1997; Wessendorf et al., 2002) oder die Matrix-RDA (Lucito et al., 1998) die molekularzytogenetischen Methoden, wie sie in dieser Arbeit vorgestellt wurden, ergänzen. Durch diese neuen Verfahren wird eine höhere Auflösung der Chromosomenveränderungen und ein höherer Probendurchsatz ermöglicht. Ein idealer Ansatzpunkt für diese Untersuchungen ist der Chromosomenarm 3p. Mit den genannten Techniken kann die Rolle dieses Genomabschnittes für die Nierenkarzinom-Entstehung und möglicherweise auch -Progression weiter charakterisiert werden. Zudem müsste versucht werden, den gesamtgenomischen Imbalanzprofilen, wie sie durch CGH oder anderen oben genannten Techniken bestimmt wurden, ergänzende Expressionsanalysen hinzuzufügen. Mit einem solchen Ansatz könnte durch Erstellung und Vergleich Karzinomsubtyp-spezifischer, kombinierter Genom- und Expressionsprofile die Identifikation differenziell repräsentierter und exprimierter Gene ermöglicht werden. So erkannte Gene müssen dann durch funktionelle Untersuchungen validiert werden und könnten danach als diagnostische Faktoren und möglicherweise therapeutisch relevante Ziele von Bedeutung sein.

Auch die in der vorliegenden Arbeit isolierten und etablierten genomischen Sonden für die *VHL* Genregion bilden eine Grundlage für die detailliertere Untersuchung und Charakterisierung von primären Nierentumoren bzw. Verdachtsfällen der *VHL*-Erkrankung. Sie können dabei auch als Ausgangsmaterial für die Generierung von *VHL* Exon-spezifischen Sonden dienen, die bei diagnostischen FISH-Untersuchungen zur Detektion teilweise deletierter *VHL* Genbereiche einsetzbar wären.

Schließlich wird von besonderem Interesse die weiterführende Charakterisierung der konstitutionellen Translokation [t(3;8)(q13.1;p21)] sein, bei der durch FISH-Deletionskartierungen mit Hilfe von BAC-(*bacterial artificial chromosome*) und PAC-(*P1-derived artificial chromosome*) Sonden die Bruchpunkte näher eingegrenzt werden. Zudem wird untersucht werden, welcher der diskutierten Mechanismen des Allelverlusts in Tumorgewebe der Patienten tatsächlich vorzufinden ist. Die Untersuchung wird weiteren Aufschluss darüber geben, welche Regionen des Chromosoms 3 Relevanz in der Inhibition einer Tumorentstehung haben.

7 Literatur

- ISCN 1995. An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (1995)., F.Mitelman, ed. (Basel: Karger/ Cytogenetics and Cell Genetics)
- Abi Aad,A.S., Beldegrun,A.S., und deKernion,J.B. (1991). Renal cell carcinoma: physiology, diagnosis and therapy. *World J. Urol.* 9, 168-172.
- Alam,N.A., Rowan,A.J., Wortham,N.C., Pollard,P.J., Mitchell,M., Tyrer,J.P., Barclay,E., Calonje,E., Manek,S., Adams,S.J., Bowers,P.W., Burrows,N.P., Charles-Holmes,R., Cook,L.J., Daly,B.M., Ford,G.P., Fuller,L.C., Hadfield-Jones,S.E., Hardwick,N., Highet,A.S., Keefe,M., MacDonald-Hull,S.P., Potts,E.D., Crone,M., Wilkinson,S., Camacho-Martinez,F., Jablonska,S., Ratnavel,R., MacDonald,A., Mann,R.J., Grice,K., Guillet,G., Lewis-Jones,M.S., McGrath,H., Seukeran,D.C., Morrison,P.J., Fleming,S., Rahman,S., Kelsell,D., Leigh,I., Olpin,S., und Tomlinson,I.P. (2003). Genetic and functional analyses of FH mutations in multiple cutaneous and uterine leiomyomatosis, hereditary leiomyomatosis and renal cancer, and fumarate hydratase deficiency. *Hum. Mol Genet.* 12, 1241-1252.
- Alimov,A., Kost,A.M., Liu,J., Li,C., Bergerheim,U., Imreh,S., Klein,G., und Zabarovsky,E.R. (2000). Combined LOH/CGH analysis proves the existence of interstitial 3p deletions in renal cell carcinoma. *Oncogene* 19, 1392-1399.
- Allory,Y., Ouazana,D., Boucher,E., Thiounn,N., und Vieillefond,A. (2003). Papillary renal cell carcinoma. Prognostic value of morphological subtypes in a clinicopathologic study of 43 cases. *Virchows Arch.* 442, 336-342.
- Altschul,S.F., Madden,T.L., Schaffer,A.A., Zhang,J., Zhang,Z., Miller,W., und Lipman,D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389-3402.
- Amin,M.B., Corless,C.L., Renshaw,A.A., Tickoo,S.K., Kubus,J., undSchultz,D.S. (1997a). Papillary (chromophil) renal cell carcinoma: histomorphologic characteristics and evaluation of conventional pathologic prognostic parameters in 62 cases. *Am. J. Surg. Pathol.* 21, 621-635.
- Amin,M.B., Crotty,T.B., Tickoo,S.K., undFarrow,G.M. (1997b). Renal oncocytoma: a reappraisal of morphologic features with clinicopathologic findings in 80 cases. *Am. J. Surg. Pathol* 21, 1-12.
- Anglard,P., Tory,K., Brauch,H., Weiss,G.H., Latif,F., Merino,M.J., Lerman,M.I., Zbar,B., und Linehan,W.M. (1991). Molecular analysis of genetic changes in the origin unddevelopment of renal cell carcinoma. *Cancer Res.* 51, 1071-1077.
- Ashida,S., Furihata,M., Tanimura,M., Sugita,O., Yamashita,M., Miura,T., Moriyama,M., und Shuin,T. (2003). Molecular detection of von Hippel-Lindau gene mutations in urine undlymph node samples in patients with renal cell carcinoma: potential biomarkers for early diagnosis undpostoperative metastatic status. *J. Urol.* 169, 2089-2093.
- Ashida,S., Okuda,H., Chikazawa,M., Tanimura,M., Sugita,O., Yamamoto,Y., Nakamura,S., Moriyama,M., und Shuin,T. (2000). Detection of circulating cancer cells with von hippel-lindau gene mutation in peripheral blood of patients with renal cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 6, 3817-3822.
- Atzpodien,J., Kirchner,H., Duensing,S., Lopez,H.E., Franzke,A., Buer,J., Probst,M., Anton,P., und Poliwoda,H. (1995a). Biochemotherapy of advanced metastatic renal-cell carcinoma: results of the combination of interleukin-2, alpha-interferon, 5-fluorouracil, vinblastine, and 13-cis-retinoic acid. *World J. Urol.* 13, 174-177.
- Atzpodien,J., Lopez,H.E., Kirchner,H., Bodenstein,H., Pfreundschuh,M., Rebmann,U., Metzner,B., Illiger,H.J., Jakse,G., Niesel,T. (1995b). Multiinstitutional home-therapy trial of recombinant human interleukin- 2 and interferon alfa-2 in progressive metastatic renal cell carcinoma. *J. Clin. Oncol.* 13, 497-501.
- Audebert,M., Chevillard,S., Levalois,C., Gyapay,G., Vieillefond,A., Klijanienko,J., Vielh,P., el Naggar,A.K., Oudard,S., Boiteux,S., und Radicella,J.P. (2000). Alterations of the DNA repair gene OGG1 in human clear cell carcinomas of the kidney. *Cancer Res.* 60, 4740-4744.

- Banat,G.A., Christ,O., Cochlovius,B., Pralle,H.B., und Zoller,M. (2001). Tumour-induced suppression of immune response and its correction. *Cancer Immunol. Immunother.* 49, 573-586.
- Barnes,L.D., Garrison,P.N., Siprashvili,Z., Guranowski,A., Robinson,A.K., Ingram,S.W., Croce,C.M., Ohta,M., und Huebner,K. (1996). Fhit, a putative tumor suppressor in humans, is a dinucleoside 5',5'''-P1,P3-triphosphate hydrolase. *Biochemistry* 35, 11529-11535.
- Becker,N. und Wahrendorf,J. (1998). Krebsatlas der Bundesrepublik Deutschland/ Atlas of Cancer Mortality in the Federal Republic of Germany 1981-1990.
- Bentz,M., Bergerheim,U.S., Li,C., Joos,S., Werner,C.A., Baudis,M., Gnarr,J., Merino,M.J., Zbar,B., Linehan,W.M., und Lichter,P. (1996). Chromosome imbalances in papillary renal cell carcinoma and first cytogenetic data of familial cases analyzed by comparative genomic hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 75, 17-21.
- Berger,C.S., Sandberg,A.A., Todd,I.A., Pennington,R.D., Haddad,F.S., Hecht,B.K., und Hecht,F. (1986). Chromosomes in kidney, ureter, and bladder cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 23, 1-24.
- Bergerheim,U., Nordenskjöld,M., und Collins,V.P. (1989). Deletion mapping in human renal cell carcinoma. *Cancer Res.* 49, 1390-1396.
- Bernues,M., Casadevall,C., Miro,R., Caballin,M.R., Villavicencio,H., Salvador,J., Zamarron,A., und Egozcue,J. (1995). Cytogenetic characterization of a familial papillary renal cell carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet* 84, 123-127.
- Beroud,C., Fournet,J.C., Jeanpierre,C., Droz,D., Bouvier,R., Froger,D., Chretien,Y., Marechal,J.M., Weissenbach,J., und Junien,C. (1996). Correlations of allelic imbalance of chromosome 14 with adverse prognostic parameters in 148 renal cell carcinomas. *Genes Chromosomes Cancer* 17, 215-224.
- Bindra,R.S., Vasselli,J.R., Stearman,R., Linehan,W.M., und Klausner,R.D. (2002). VHL-mediated Hypoxia Regulation of Cyclin D1 in Renal Carcinoma Cells. *Cancer Res.* 62, 3014-3019.
- Bissig,H., Richter,J., Desper,R., Meier,V., Schraml,P., Schaffer,A.A., Sauter,G., Mihatsch,M.J., und Moch,H. (1999). Evaluation of the clonal relationship between primary and metastatic renal cell carcinoma by comparative genomic hybridization. *Am. J. Pathol.* 155, 267-274.
- Bodmer,D., Eleveld,M., Ligtenberg,M., Weterman,M., van der,M.A., Koolen,M., Hulsbergen-van der Kaa,C., Smits,A., Smeets,D., und Geurts,v.K. (2002a). Cytogenetic and molecular analysis of early stage renal cell carcinomas in a family with a translocation (2;3)(q35;q21). *Cancer Genet. Cytogenet.* 134, 6-12.
- Bodmer,D., Eleveld,M.J., Ligtenberg,M.J., Weterman,M.A., Janssen,B.A., Smeets,D.F., de Wit,P.E., van den Berg,A., van den Berg,E., Koolen,M.I., und Geurts,v.K. (1998). An alternative route for multistep tumorigenesis in a novel case of hereditary renal cell cancer and a t(2;3)(q35;q21) chromosome translocation. *Am. J Hum. Genet.* 62, 1475-1483.
- Bodmer,D., Van Den,H.W., van Groningen,J.J., Eleveld,M.J., Martens,G.J., Weterman,M.A., und Geurts,v.K. (2002b). Understanding familial and non-familial renal cell cancer. *Hum. Mol Genet.* 11, 2489-2498.
- Boiteux,S. und Radicella,J.P. (2000). The human OGG1 gene: structure, functions, and its implication in the process of carcinogenesis. *Arch. Biochem. Biophys.* 377, 1-8.
- Brasanac,D., Muller,C.A., Muller,G.A., Hadzi-Dzokic,J., und Markovic-Lipkovski,J. (1999). HLA class I antigens expression in renal cell carcinoma: histopathological and clinical correlation. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 18, 505-510.
- Brauch,H., Weirich,G., Brieger,J., Glavac,D., Rodl,H., Eichinger,M., Feurer,M., Weidt,E., Puranakittha,C., Neuhaus,C., Pomer,S., Brenner,W., Schirmacher,P., Störkel,S., Rotter,M., Masera,A., Gugeler,N., und Decker,H.J. (2000). VHL alterations in human clear cell renal cell carcinoma: association with advanced tumor stage and a novel hot spot mutation. *Cancer Res.* 60, 1942-1948.
- Brethau,D., Lechevallier,E., de-Fromont,M., Sault,M.C., Rampal,M., und Coulange,C. (1995). Prognostic value of nuclear grade of renal cell carcinoma. *Cancer* 76, 2543-2549.
- Bronner,C.E., Baker,S.M., Morrison,P.T., Warren,G., Smith,L.G., Lescoe,M.K., Kane,M., Earabino,C., Lipford,J., Lindblom,A., Tannergård,P., Bollag,R.J., Godwin,A.R., Ward,D.C.,

- Nordenskjöld, M., Fishel, R., Kolodner, R., and Liskay, R.M. (1994). Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH 1 is associated with hereditary non-polyposis colon cancer. *Nature* 368, 258-261.
- Brown, J.A., Takahashi, S., Alcaraz, A., Borell, T.J., Anderl, K.L., Qian, J., Persons, D.L., Bostwick, D.G., Lieber, M.M., and Jenkins, R.B. (1996). Fluorescence in situ hybridization analysis of renal oncocytoma reveals frequent loss of chromosomes Y and 1 [see comments]. *J. Urol* 156, 31-35.
- Bruner, S.D., Norman, D.P., and Verdine, G.L. (2000). Structural basis for recognition and repair of the endogenous mutagen 8-oxoguanine in DNA. *Nature* 403, 859-866.
- Bugert, P., Wilhelm, M., and Kovacs, G. (1997). FHIT gene and the FRA3B region are not involved in the genetics of renal cell carcinomas. *Genes Chromosomes Cancer* 20, 9-15.
- Bui, M.H., Seligson, D., Han, K.R., Pantuck, A.J., Dorey, F.J., Huang, Y., Horvath, S., Leibovich, B.C., Chopra, S., Liao, S.Y., Stanbridge, E., Lerman, M.I., Palotie, A., Figlin, R.A., and Beldegrun, A.S. (2003). Carbonic anhydrase IX is an independent predictor of survival in advanced renal clear cell carcinoma: implications for prognosis and therapy. *Clin. Cancer Res.* 9, 802-811.
- Carcao, M.D., Taylor, G.P., Greenberg, M.L., Bernstein, M.L., Champagne, M., Hershon, L., and Baruchel, S. (1998). Renal-cell carcinoma in children: a different disorder from its adult counterpart? *Med. Pediatr. Oncol.* 31, 153-158.
- Carroll, P.R., Murty, V.V., Reuter, V., Jhanwar, S., Fair, W.R., Whitmore, W.F., and Chaganti, R.S. (1987). Abnormalities at chromosome region 3p12-14 characterize clear cell renal carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet* 26, 253-259.
- Chevillard, S., Radicella, J.P., Levalois, C., Lebeau, J., Poupon, M.F., Oudard, S., Dutrillaux, B., and Boiteux, S. (1998). Mutations in OGG1, a gene involved in the repair of oxidative DNA damage, are found in human lung and kidney tumours. *Oncogene* 16, 3083-3086.
- Cheville, J.C., Zincke, H., Lohse, C.M., Sebo, T.J., Riehle, D., Weaver, A.L., and Blute, M.L. (2002). pT1 clear cell renal cell carcinoma: a study of the association between MIB-1 proliferative activity and pathologic features and cancer specific survival. *Cancer* 94, 2180-2184.
- Chin, J.L., Pontes, J.E., and Frankfurt, O.S. (1985). Flow cytometric deoxyribonucleic acid analysis of primary and metastatic human renal cell carcinoma. *J. Urol.* 133, 582-585.
- Chow, W.H., Devesa, S.S., Warren, J.L., and Fraumeni, J.F. (1999). Rising incidence of renal cell cancer in the United States. *JAMA* 281, 1628-1631.
- Chow, W.H., Gridley, G., McLaughlin, J.K., Mandel, J.S., Wacholder, S., Blot, W.J., Niwa, S., and Fraumeni, J.F. (1994a). Protein intake and risk of renal cell cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 86, 1131-1139.
- Chow, W.H., Lindblad, P., Gridley, G., Nyren, O., McLaughlin, J.K., Linet, M.S., Pennello, G.A., Adami, H.O., and Fraumeni, J.F. (1997). Risk of urinary tract cancers following kidney or ureter stones. *J. Natl. Cancer Inst.* 89, 1453-1457.
- Chow, W.H., McLaughlin, J.K., Linet, M.S., Niwa, S., and Mandel, J.S. (1994b). Use of analgesics and risk of renal cell cancer. *Int. J. Cancer* 59, 467-470.
- Chow, W.H., McLaughlin, J.K., Mandel, J.S., Wacholder, S., Niwa, S., and Fraumeni, J.F., Jr. (1996). Obesity and risk of renal cell cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers. Prev.* 5, 17-21.
- Chudoba, I., Plesch, A., Lorch, T., Lemke, J., Claussen, U., and Senger, G. (1999). High resolution multicolor-banding: a new technique for refined FISH analysis of human chromosomes. *Cytogenet. Cell Genet.* 84, 156-160.
- Clifford, S.C., Prowse, A.H., Affara, N.A., Buys, C.H., and Maher, E.R. (1998). Inactivation of the von Hippel-Lindau (VHL) tumour suppressor gene and allelic losses at chromosome arm 3p in primary renal cell carcinoma: evidence for a VHL-independent pathway in clear cell renal tumourigenesis. *Genes Chromosomes. Cancer* 22, 200-209.
- Cohen, A.J., Li, F.P., Berg, S., Marchetto, D.J., Tsai, S., Jacobs, S., and Brown, R.S. (1979). Hereditary Renal Cell Carcinoma Associated with a Chromosomal Translocation. *N. Engl. J. Med.* 301, 592-596.
- Comings, D.E. (1973). A general theory of carcinogenesis. *Proc-Natl-Acad-Sci-U-S-A* 12, 3324-3328.

- Cremer,T., Lichter,P., Borden,J., Ward,D.C., und Manuelidis,L. (1988). Detection of chromosome aberrations in metaphase and interphase tumor cells by in situ hybridization using chromosome-specific library probes. *Hum Genet* 80, 235-246.
- Crossey,P.A., Richards,F.M., Foster,K., Green,J.S., Prowse,A., Latif,F., Lerman,M., Zbar,B., Affara,N.A., Ferguson-Smith,M.A., Maher,E.R., Lerman,M.I., Ferguson Smith,M.A. et al. (1994). Identification of intragenic mutations in the Von Hippel-Lindau disease tumour suppressor gene and correlation with disease phenotype. *Hum Mol Genet* 3,8, 1303-1308.
- Crotty,T.B., Lawrence,K.M., Moertel,C.A., Bartelt,D.H., Batts,K.P., Dewald,G.W., Farrow,G.M., und Jenkins,R.B. (1992). Cytogenetic Analysis of Six Oncocytomas and a Chromphobe Cell Renal Carcinoma. Evidence That -Y, -1 May Be a Characteristic Anomaly in Renal Oncocytomas. *Cancer Genet Cytogenet* 61, 61-66.
- Dal Cin,P., Stas,M., Sciot,R., De Wever,I., Van Damme,B., und Van den Berghe,H. (1998). Translocation (X;1) reveals metastasis 31 years after renal cell carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet* 101, 58-61.
- Dal Cin,P., Gaeta,J., Huben,R., Li,F.P., Prout,G.R., und Sandberg,A.A. (1989). Renal Cortical Tumors. Cytogenetic characterization. *Am. J. Clin. Pathol.* 92, 408-414.
- Dal Cin,P., Li,F.P., Prout,G.R.Jr., Huben,R.P., Limon,J., Ferti-Passantonopoulou,A., Richie,J.P., und Sandberg,A.A. (1988). Involvement of chromosomes 3 and 5 in renal cell carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet* 35, 41-46.
- Dal Cin,P., Sciot,R., van Poppel,H., Balzarini,P., Roskams,T., und Van den,B.H. (2002). Chromosome changes in sarcomatoid renal carcinomas are different from those in renal cell carcinomas. *Cancer Genet. Cytogenet.* 134, 38-40.
- Dallol,A., Forgacs,E., Martinez,A., Sekido,Y., Walker,R., Kishida,T., Rabbitts,P., Maher,E.R., Minna,J.D., und Latif,F. (2002). Tumour specific promoter region methylation of the human homologue of the Drosophila Roundabout gene DUTT1 (ROBO1) in human cancers. *Oncogene* 21, 3020-3028.
- Dammann,R., Schagdarsurengin,U., Strunnikova,M., Rastetter,M., Seidel,C., Liu,L., Tommasi,S., und Pfeifer,G.P. (2003). Epigenetic inactivation of the Ras-association domain family 1 (RASSF1A) gene and its function in human carcinogenesis. *Histol. Histopathol.* 18, 665-677.
- Dammann,R., Takahashi,T., und Pfeifer,G.P. (2001a). The CpG island of the novel tumor suppressor gene RASSF1A is intensely methylated in primary small cell lung carcinomas. *Oncogene* 20, 3563-3567.
- Dammann,R., Yang,G., und Pfeifer,G.P. (2001b). Hypermethylation of the cpG island of Ras association domain family 1A (RASSF1A), a putative tumor suppressor gene from the 3p21.3 locus, occurs in a large percentage of human breast cancers. *Cancer Res.* 61, 3105-3109.
- de Jong,B., Oosterhuis,J.W., Idenburg,V.J., Castedo,S.M., Dam,A., und Mensink,H.J. (1988). Cytogenetics of 12 cases of renal adenocarcinoma. *Cancer Genet Cytogenet* 30, 53-61.
- Decker,H.J., Gemmill,R.M., Neumann,H.P., Walter,T.A., und Sandberg,A.A. (1989). Loss of heterozygosity on 3p in a renal cell carcinoma in von Hippel-Lindau syndrome. *Cancer Genet Cytogenet* 39, 289-293.
- Decker,H.J., Neuhaus,C., Jauch,A., Speicher,M., Ried,T., Bujard,M., Brauch,H., Störkel,S., Stockle,M., Seliger,B., und Huber,C. (1996). Detection of a germline mutation and somatic homozygous loss of the von Hippel-Lindau tumor-suppressor gene in a family with a de novo mutation. A combined genetic study, including cytogenetics, PCR/SSCP, FISH, and CGH. *Hum. Genet.* 97, 770-776.
- Deguchi,M., Shiina,H., Igawa,M., Kaneuchi,M., Nakajima,K., und Dahiya,R. (2003). DNA mismatch repair genes in renal cell carcinoma. *J. Urol.* 169, 2365-2371.
- deKernion,J.B., Ramming,K.P., und Smith,R.B. (1978). The natural history of metastatic renal cell carcinoma: a computer analysis. *J. Urol.* 120, 148-152.
- Delahunt,B. und Eble,J.N. (1997). Papillary renal cell carcinoma: a clinicopathologic and immunohistochemical study of 105 tumors. *Mod. Pathol.* 10, 537-544.

- Delahunt,B., Kittelson,J.M., McCredie,M.R., Reeve,A.E., Stewart,J.H., und Bilous,A.M. (2002). Prognostic importance of tumor size for localized conventional (clear cell) renal cell carcinoma: assessment of TNM T1 and T2 tumor categories and comparison with other prognostic parameters. *Cancer* 94, 658-664.
- Desangles,F., Camparo,P., Fouet,C., Houlgatte,A., und Arborio,M. (1999). Translocation (X;1) associated with a nonpapillary carcinoma in a young woman: a new definition for an Xp11.2 RCC subtype. *Cancer Genet. Cytogenet.* 113, 141-144.
- Desper,R., Jiang,F., Kallioniemi,O.P., Moch,H., Papadimitriou,C.H., und Schaffer,A.A. (1999). Inferring tree models for oncogenesis from comparative genome hybridization data. *J. Comput. Biol.* 6, 37-51.
- Desper,R., Jiang,F., Kallioniemi,O.P., Moch,H., Papadimitriou,C.H., und Schaffer,A.A. (2000). Distance-based reconstruction of tree models for oncogenesis. *J. Comput. Biol.* 7, 789-803.
- Di Silverio,F., Casale,P., Colella,D., Andrea,L., Seccareccia,F., und Sciarra,A. (2000). Independent value of tumor size and DNA ploidy for the prediction of disease progression in patients with organ-confined renal cell carcinoma. *Cancer* 88, 835-843.
- Di Silverio,F., Gallucci,M., Flammia,G.P., de Vico,A., Caponera,M., Eleuteri,P., Forte,D., Cavallo,D., und de Vita,R. (1992). Biological and clinical implication of cellular DNA content in renal cell carcinomas. *Eur. Urol. 21 Suppl* 1, 43-47.
- Dijkhuizen,T., van den Berg,E., van den Berg,A., Van De Veen,A., Dam,A., Faber,H., Buys,C.H., Störkel,S., und de Jong,B. (1997). Genetics as a diagnostic tool in sarcomatoid renal-cell cancer. *Int. J. Cancer* 72, 265-269.
- Dijkhuizen,T., Van-Den-Berg,E., Störkel,S., und De-Jong,B. (1998). Chromosome changes in a metastasis of a chromophobe renal cell tumor. *Cancer Genet. Cytogenet.* 105, 86-89.
- Dohna,M., Reincke,M., Mincheva,A., Allolio,B., Solinas-Toldo,S., und Lichter,P. (2000). Adrenocortical carcinoma is characterized by a high frequency of chromosomal gains and high-level amplifications. *Genes Chromosomes Cancer* 28, 145-152.
- Doll,R. (1991). Urban and rural factors in the aetiology of cancer. *Int. J. Cancer* 47, 803-810.
- Doll,R. (1996). Cancers weakly related to smoking. *Br. Med. Bull.* 52, 35-49.
- Dovhey,S.E., Ghosh,N.S., und Wright,K.L. (2000). Loss of interferon-gamma inducibility of TAP1 and LMP2 in a renal cell carcinoma cell line. *Cancer Res.* 60, 5789-5796.
- Dreijerink,K., Braga,E., Kuzmin,I., Geil,L., Duh,F.M., Angeloni,D., Zbar,B., Lerman,M.I., Stanbridge,E.J., Minna,J.D., Protopopov,A., Li,J., Kashuba,V., Klein,G., und Zabarovsky,E.R. (2001). The candidate tumor suppressor gene, RASSF1A, from human chromosome 3p21.3 is involved in kidney tumorigenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 7504-7509.
- Druck,T., Kastury,K., Hadaczek,P., Podolski,J., Toloczko,A., Sikorski,A., Ohta,M., LaForgia,S., Lasota,J., McCue,P., Lubinski,J., und Huebner,K. (1995). Loss of heterozygosity at the familial RCC t(3;8) locus in most clear cell renal carcinomas. *Cancer Res.* 55, 5348-5353.
- du Manoir,S., Kallioniemi,O.P., Lichter,P., Piper,J., Benedetti,P.A., Carothers,A.D., Fantes,J.A., Garcia-Sagredo,J.M., Gerdes,T., Giollant,M., Hemery,B., Isola,J., Maahr,J., Morrison,H., Perry,P., Stark,M., Sudar,D., van Vliet,L.J., Verwoerd,N., und Vrolijk,J. (1995a). Hardware and Software Requirements for Quantitative Analysis of Comparative Genomic Hybridization. *Cytometry* 19(1), 4-9.
- du Manoir,S., Schrock,E., Bentz,M., Speicher,M.R., Joos,S., Ried,T., Lichter,P., und Cremer,T. (1995b). Quantitative analysis of comparative genomic hybridization Quantitative analysis of comparative genomic hybridization. *Cytometry* 19, 27-41.
- du Manoir,S., Speicher,M.R., Joos,S., Schroeck,E., Popp,S., Doehner,H., Kovacs,G., Robert Nicoud,M., Lichter,P., und Cremer,T. (1993). Detection of complete and partial chromosome gains and losses by comparative genomic in situ hybridization. *Hum Genet* 90, 590-610.
- Duensing,S., Dallmann,I., Grosse,J., Buer,J., Lopez Hanninen,E., Deckert,M., Störkel,S., Kirchner,H., Poliwoda,H., und Atzpodien,J. (1994). Immunocytochemical detection of P-

- glycoprotein: initial expression correlates with survival in renal cell carcinoma patients. *Oncology* 51, 309-313.
- Dumon,K.R., Ishii,H., Fong,L.Y., Zanesi,N., Fidanza,V., Mancini,R., Vecchione,A., Baffa,R., Trapasso,F., Doring,M.J., Huebner,K., und Croce,C.M. (2001). FHIT gene therapy prevents tumor development in Fhit-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 3346-3351.
- Düsterhöft, S. Etablierung einer diagnostischen FISH-Sonde für das VHL-Tumorsuppressor-Gen. 2002. Diplomarbeit
- Eils,R., Uhrig,S., Saracoglu,K., Satzler,K., Bolzer,A., Petersen,I., Chassery,J., Ganser,M., und Speicher,M.R. (1998). An optimized, fully automated system for fast and accurate identification of chromosomal rearrangements by multiplex-FISH (M-FISH). *Cytogenet Cell Genet* 82, 160-171.
- Eisenberger,C.F., Schoenberg,M., Enger,C., Hortopan,S., Shah,S., Chow,N.H., Marshall,F.F., und Sidransky,D. (1999). Diagnosis of renal cancer by molecular urinalysis. *J. Natl. Cancer Inst.* 91, 2028-2032.
- el Naggari,A.K., Batsakis,J.G., Wang,G., und Lee,M.S. (1993). PCR-based RFLP screening of the commonly deleted 3p loci in renal cortical neoplasms. *Diagn. Mol Pathol* 2, 269-276.
- Eleveld,M.J., Bodmer,D., Merks,G., Siepmann,A., Sprenger,S.H., Weterman,M.A., Ligtenberg,M.J., Kamp,J., Stapper,W., Jekens,J.W., Smeets,D., Smits,A., und Geurts,v.K. (2001). Molecular analysis of a familial case of renal cell cancer and a t(3;6)(q12;q15). *Genes Chromosomes. Cancer* 31, 23-32.
- Elfving,P., Mandahl,N., Lundgren,R., Limon,J., Bak,J.E., Ferno,M., Olsson,H., und Mitelman,F. (1997). Prognostic implications of cytogenetic findings in kidney cancer. *Br. J Urol.* 80, 698-706.
- Engel,J.D., Kundu,S.D., Yang,T., Lang,S., Goodwin,S., Janulis,L., Cho,J.S., Chang,J., Kim,S.J., und Lee,C. (1999). Transforming growth factor-beta type II receptor confers tumor suppressor activity in murine renal carcinoma (Renca) cells. *Urol.* 54, 164-170.
- Erlandsson,R. (1998). Molecular genetics of renal cell carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet.* 104, 1-18.
- Esteban-Barragan,M.A., Avila,P., Alvarez-Tejado,M., Gutierrez,M.D., Garcia-Pardo,A., Sanchez-Madrid,F., und Landazuri,M.O. (2002). Role of the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene in the formation of beta1-integrin fibrillar adhesions. *Cancer Res.* 62, 2929-2936.
- Fearon,E.R. und Vogelstein,B. (1990). A Genetic Model for Colorectal Tumorigenesis. *Cell* 61, 759-767.
- Feil,G., Mittermüller,B., Bichler,K.H., Wunderer,A., Wechsel,H.W., Nelde,H.J., und St Krause,F. (1999). DNA cytophotometry in renal cell carcinoma: a significant prognostic factor? *Anticancer Res.* 19, 1483-1486.
- Figlin,R.A. (1999). Renal cell carcinoma: management of advanced disease. *J. Urol.* 161, 381-386.
- Fischer,C.G. (1999). [Etiology, pathogenesis and therapy of renal cell carcinoma]. *Radiologe* 39, 343-349.
- Fischer,J., Palmedo,G., von Knobloch,R., Bugert,P., Prayer-Galetti,T., Pagano,F., und Kovacs,G. (1998). Duplication and overexpression of the mutant allele of the MET proto- oncogene in multiple hereditary papillary renal cell tumours. *Oncogene* 17, 733-739.
- Fleming,S. (1993). The impact of genetics on the classification of renal carcinoma. *Histopathology* 22, 89-92.
- Folias,A., Matkovic,M., Bruun,D., Reid,S., Hejna,J., Grompe,M., D'Andrea,A., und Moses,R. (2002). BRCA1 interacts directly with the Fanconi anemia protein FANCA. *Hum. Mol Genet.* 11, 2591-2597.
- Franksson,C., Bergstrand,A., Ljungdahl,I., Magnusson,G., und Nordenstam,H. (1972). Renal Carcinoma (Hypernephroma) occurring in 5 sibilings. *J. Urol.* 108, 58-61.
- Fuhrman,S.A., Lasky,L.C., und Limas,C. (1982). Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma. *Am. J Surg. Pathol.* 6, 655-663.

- Füzesi,L., Gunawan,B., Bergmann,F., Tack,S., Braun,S., und Jakse,G. (1999). Papillary renal cell carcinoma with clear cell cytomorphology and chromosomal loss of 3p. *Histopathology* 35, 157-161.
- Füzesi,L., Gunawan,B., Braun,S., Bergmann,F., Brauers,A., Effert,P., und Mittermayer,C. (1998a). Cytogenetic analysis of 11 renal oncocytomas: further evidence of structural rearrangements of 11q13 as a characteristic chromosomal anomaly. *Cancer Genet. Cytogenet.* 107, 1-6.
- Füzesi,L., Gunawan,B., Braun,S., Bergmann,F., Brauers,A., Effert,P., und Mittermayer,C. (1998b). Cytogenetic analysis of 11 renal oncocytomas: further evidence of structural rearrangements of 11q13 as a characteristic chromosomal anomaly [published erratum appears in *Cancer Genet Cytogenet* 1999 Jan 1;108(1):90]. *Cancer Genet. Cytogenet.* 107, 1-6.
- Fyfe,G., Fisher,R.I., Rosenberg,S.A., Sznol,M., Parkinson,D.R., und Louie,A.C. (1995). Results of treatment of 255 patients with metastatic renal cell carcinoma who received high-dose recombinant interleukin-2 therapy. *J. Clin. Oncol.* 13, 688-696.
- Gago-Dominguez,M., Yuan,J.M., Castelao,J.E., Ross,R.K., und Yu,M.C. (1999). Regular use of analgesics is a risk factor for renal cell carcinoma. *Br. J. Cancer* 81, 542-548.
- Garcia-Higuera,I., Kuang,Y., Naf,D., Wasik,J., und D'Andrea,A.D. (1999). Fanconi anemia proteins FANCA, FANCC, and FANCG/XRCC9 interact in a functional nuclear complex. *Mol. Cell Biol.* 19, 4866-4873.
- Garcia-Higuera,I., Taniguchi,T., Ganesan,S., Meyn,M.S., Timmers,C., Hejna,J., Grompe,M., und D'Andrea,A.D. (2001). Interaction of the Fanconi anemia proteins and BRCA1 in a common pathway. *Mol. Cell* 7, 249-262.
- Gartenhaus,R., Johns,M.M., Wang,P., Rai,K., und Sidransky,D. (1996). Mutator phenotype in a subset of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 87, 38-41.
- Gelb,A.B. (1997). Renal cell carcinoma: current prognostic factors. *Union Internationale Contre le Cancer (UICC) and the American Joint Committee on Cancer (AJCC). Cancer* 80, 981-986.
- Gelb,A.B., Sudilovsky,D., Wu,C.D., Weiss,L.M., und Medeiros,L.J. (1997). Appraisal of intratumoral microvessel density, MIB-1 score, DNA content, and p53 protein expression as prognostic indicators in patients with locally confined renal cell carcinoma. *Cancer* 80, 1768-1775.
- Gemmill,R.M., West,J.D., Boldog,F., Tanaka,N., Robinson,L.J., Smith,D.I., Li,F., und Drabkin,H.A. (1998). The hereditary renal cell carcinoma 3;8 translocation fuses FHIT to a patched-related gene, TRC8. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 9572-9577.
- Gerharz,C.D., Moll,R., Störkel,S., Ramp,U., Hildebrandt,B., Molsberger,G., Koldovsky,P., und Gabbert,H.E. (1995). Establishment and characterization of two divergent cell lines derived from a human chromophobe renal cell carcinoma. *Am. J. Pathol* 146, 953-962.
- Gnarra,J.R., Glenn,G.M., Latif,F., Anglard,P., Lerman,M.I., Zbar,B., und Linehan,W.M. (1993). Molecular genetic studies of sporadic and familial renal cell carcinoma. *Urol. Clin. North Am.* 20, 207-216.
- Gnarra,J.R., Zhou,S., Merrill,M.J., Wagner,J.R., Krumm,A., Papavassiliou,E., Oldfield,E.H., Klausner,R.D., und Linehan,W.M. (1996). Post-transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor mRNA by the product of the VHL tumor suppressor gene. *Proc Natl. Acad Sci. U. S. A* 93, 10589-10594.
- Godley,P.A. und Escobar,M.A. (1998). Renal cell carcinoma. *Curr. Opin. Oncol.* 10, 261-265.
- Goldstein,N.S. (1997). The current state of renal cell carcinoma grading. *Union Internationale Contre le Cancer (UICC) and the American Joint Committee on Cancer (AJCC). Cancer* 80, 977-980.
- Golimbu,M., Joshi,P., Sperber,A., Tessler,A., Al Askari,S., und Morales,P. (1986). Renal cell carcinoma: survival and prognostic factors. *Urol.* 27, 291-301.
- Gomella,L.G., Sargent,E.R., Linehan,W.M., und Kasid,A. (1989). Transforming growth factor-beta inhibits the growth of renal cell carcinoma in vitro. *J Urol.* 141, 1240-1244.

- Gonzalgo, M.L., Eisenberger, C.F., Lee, S.M., Trock, B.J., Marshall, F.F., Hortopan, S., Sidransky, D., und Schoenberg, M.P. (2002). Prognostic significance of preoperative molecular serum analysis in renal cancer. *Clin. Cancer Res.* 8, 1878-1881.
- Griffin, J.P., Hughes, G.V., und Peeling, W.B. (1967). A survey of the familial incidence of adenocarcinoma of the kidney. *Br. J. Urol.* 39, 63-66.
- Grompe, M. (2002). FANCD2: a branch-point in DNA damage response? *Nat. Med.* 8, 555-556.
- Gronwald, J., Störkel, S., Holtgreve Grez, H., Hadaczek, P., Brinkschmidt, C., Jauch, A., Lubinski, J., und Cremer, T. (1997). Comparison of DNA gains and losses in primary renal clear cell carcinomas and metastatic sites: importance of 1q and 3p copy number changes in metastatic events. *Cancer Res.* 57, 481-487.
- Guinan, P., Sobin, L.H., Algaba, F., Badellino, F., Kameyama, S., MacLennan, G., und Novick, A. (1997). TNM staging of renal cell carcinoma: Workgroup No. 3. Union International Contre le Cancer (UICC) and the American Joint Committee on Cancer (AJCC). *Cancer* 80, 992-993.
- Gunawan, B., Bergmann, F., Braun, S., Hemmerlein, B., Ringert, R.H., Jakse, G., und Füzesi, L. (1999). Polyploidization and losses of chromosomes 1, 2, 6, 10, 13, and 17 in three cases of chromophobe renal cell carcinomas. *Cancer Genet Cytogenet.* 110, 57-61.
- Gunawan, B., Huber, W., Holtrup, M., von Heydebreck, A., Efferth, T., Poustka, A., Ringert, R.H., Jakse, G., und Füzesi, L. (2001). Prognostic impacts of cytogenetic findings in clear cell renal cell carcinoma: gain of 5q31-qter predicts a distinct clinical phenotype with favorable prognosis. *Cancer Res.* 61, 7731-7738.
- Haas, G.P. und Hillman, G.G. (1996). Update on the Role of Immunotherapy in the Management of Kidney Cancer. *Cancer Control* 3, 536-541.
- Hadaczek, P., Siprashvili, Z., Markiewski, M., Domagala, W., Druck, T., McCue, P.A., Pekarsky, Y., Ohta, M., Huebner, K., und Lubinski, J. (1998). Absence or reduction of Fhit expression in most clear cell renal carcinomas. *Cancer Res.*
- Hahn, W.C. und Weinberg, R.A. (2002). Modelling the molecular circuitry of cancer. *Nat. Rev Cancer* 2, 331-341.
- Hanahan, D. und Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.
- Hartmann, J.T. und Bokemeyer, C. (1999). Chemotherapy for renal cell carcinoma. *Anticancer Res.* 19, 1541-1543.
- Herbers, J., Schullerus, D., Muller, H., Kenck, C., Chudek, J., Weimer, J., Bugert, P., und Kovacs, G. (1997). Significance of chromosome arm 14q loss in nonpapillary renal cell carcinomas. *Genes Chromosomes. Cancer* 19, 29-35.
- Hergovich, A., Lisztwan, J., Barry, R., Ballschmieter, P., und Krek, W. (2003). Regulation of microtubule stability by the von Hippel-Lindau tumour suppressor protein pVHL. *Nat. Cell Biol.* 5, 64-70.
- Hernandez, M.M., Orellana, A.C., Badia, G.L., Verdeguer, M.A., und Paradis, A.A. (1995). Renal adenocarcinoma in an 8-year-old child, with a t(X;17)(p11.2;q25). *Cancer Genet Cytogenet* 83, 82-83.
- Herrlinger, A., Schott, G., Schafhauser, W., und Schrott, K.M. (1992). Die Bedeutung des Tumordurchmessers beim Nierenzellkarzinom. (The significance of tumor diameter in renal cell carcinoma). *Urologe (Ausgabe A)* 31, 70-75.
- Hock, L.M., Lynch, J., und Balaji, K.C. (2002). Increasing incidence of all stages of kidney cancer in the last 2 decades in the United States: an analysis of surveillance, epidemiology and end results program data. *J. Urol.* 167, 57-60.
- Hofmockel, G., Tsatalpas, P., Muller, H., Dammrich, J., Poot, M., Maurer-Schultze, B., Muller-Hermelink, H.K., Frohmüller, H.G., und Bassukas, I.D. (1995). Significance of conventional and new prognostic factors for locally confined renal cell carcinoma. *Cancer* 76, 296-306.
- Högemann, I., Bock, S., Heppner, P., und Petrides, P.E. (1994). Cytogenetic and growth factor gene analysis of a renal carcinoma cell line. *Cancer Genet Cytogenet* 78, 175-180.
- Huebner, K., Garrison, P.N., Barnes, L.D., und Croce, C.M. (1998). The role of the FHIT/FRA3B locus in cancer. *Annu. Rev. Genet.* 32, 7-31.

- Hughson, M.D., Buchwald, D., und Fox, M. (1986). Renal neoplasia and acquired cystic kidney disease in patients receiving long-term dialysis. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 110, 592-601.
- Inoue, K., Karashima, T., Chikazawa, M., Iiyama, T., Yoshikawa, C., Furihata, M., Ohtsuki, Y., und Shuin, T. (1998). Overexpression of c-met proto-oncogene associated with chromophilic renal cell carcinoma with papillary growth. *Virchows Arch.* 433, 511-515.
- Iqbal, M.A., Akhtar, M., und Ali, M.A. (1996). Cytogenetic findings in renal cell carcinoma. *Hum Pathol* 27, 949-954.
- Ishikawa, I. und Kovacs, G. (1993). High incidence of papillary renal cell tumours in patients on chronic haemodialysis. *Histopathology* 22, 135-139.
- Jiang, F., Desper, R., Papadimitriou, C.H., Schaffer, A.A., Kallioniemi, O.P., Richter, J., Schraml, P., Sauter, G., Mihatsch, M.J., und Moch, H. (2000). Construction of evolutionary tree models for renal cell carcinoma from comparative genomic hybridization data. *Cancer Res.* 60, 6503-6509.
- Jiang, F., Moch, H., Richter, J., Egenter, C., Gasser, T., Bubendorf, L., Gschwind, R., Sauter, G., und Mihatsch, M.J. (1998a). Comparative genomic hybridization reveals frequent chromosome 13q and 4q losses in renal carcinomas with sarcomatoid transformation. *J. Pathol.* 185, 382-388.
- Jiang, F., Richter, J., Schraml, P., Bubendorf, L., Gasser, T., Sauter, G., Mihatsch, M.J., und Moch, H. (1998b). Chromosomal imbalances in papillary renal cell carcinoma: genetic differences between histological subtypes. *Am. J Pathol.* 153, 1467-1473.
- Joenje, H. und Arwert, F. (2001). Connecting Fanconi anemia to BRCA1. *Nat. Med* 7, 406-407.
- Jones, A.C., Daniells, C.E., Snell, R.G., Tachataki, M., Idziaszyk, S.A., Krawczak, M., Sampson, J.R., und Cheadle, J.P. (1997). Molecular genetic and phenotypic analysis reveals differences between TSC1 and TSC2 associated familial and sporadic tuberous sclerosis. *Hum. Mol. Genet.* 6, 2155-2161.
- Junker, K., Weirich, G., Moravek, P., Podhola, M., Ilse, B., Hartmann, A., und Schubert, J. (2001). Familial and sporadic renal oncocytomas--a comparative molecular- genetic analysis. *Eur. Urol* 40, 330-336.
- Kaelin, W.G. (2002). Molecular basis of the VHL hereditary cancer syndrome. *Nat. Rev Cancer* 2, 673-682.
- Kallakury, B.V., Karikehalli, S., Haholu, A., Sheehan, C.E., Azumi, N., und Ross, J.S. (2001). Increased expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 and tissue inhibitors of metalloproteinases 1 and 2 correlate with poor prognostic variables in renal cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 7, 3113-3119.
- Kallioniemi, A., Kallioniemi, O.P., Sudar, D., Rutovitz, D., Gray, J.W., Waldman, F., und Pinkel, D. (1992). Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 258, 818-821.
- Kanayama, H., Lui, W.O., Takahashi, M., Naroda, T., Kedra, D., Wong, F.K., Kuroki, Y., Nakahori, Y., Larsson, C., Kagawa, S., und Teh, B.T. (2001). Association of a novel constitutional translocation t(1q;3q) with familial renal cell carcinoma. *J. Med. Genet.* 38, 165-170.
- Kaplan, E. L. und Meier, P. Nonparametric estimation from incomplete observation. *J Am Stat Assoc* 53, 457-481. 1999.
- Kardas, I., Denis, A., Babinska, M., Gronwald, J., Podolski, J., Zajaczek, S., Kram, A., Lubinski, J., und Limon, J. (1998). Translocation (X;1)(p11.2;q21) in a papillary renal cell carcinoma in a 14-year-old girl. *Cancer Genet Cytogenet.* 101, 159-161.
- Katagiri, A., Watanabe, R., und Tomita, Y. (1995). E-cadherin expression in renal cell cancer and its significance in metastasis and survival. *Br. J. Cancer* 71, 376-379.
- Khoo, S.K., Bradley, M., Wong, F.K., Hedblad, M.A., Nordenskjold, M., und Teh, B.T. (2001). Birt-Hogg-Dube syndrome: mapping of a novel hereditary neoplasia gene to chromosome 17p12-q11.2. *Oncogene* 20, 5239-5242.
- Kinzler, K.W. und Vogelstein, B. (1996). Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 87, 159-170.
- Kinzler, K.W. und Vogelstein, B. (1997). Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers [news; comment]. *Nature* 386, 761,763.

- Kleikamp, S. H. (1999). Molekulargenetische Veränderungen beim Nierenzellkarzinom: Eine LOH- und Expressionsprofilanalyse. Diplomarbeit
- Klungland, A., Rosewell, I., Hollenbach, S., Larsen, E., Daly, G., Epe, B., Seeberg, E., Lindahl, T., und Barnes, D.E. (1999). Accumulation of premutagenic DNA lesions in mice defective in removal of oxidative base damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 13300-13305.
- Knebelmann, B., Ananth, S., Cohen, H.T., und Sukhatme, V.P. (1998). Transforming growth factor α is a target for the von Hippel-Lindau tumor suppressor. *Cancer Res.* 58, 226-231.
- Knudson, A.G.Jr. (1971). Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68, 820-823.
- Kong, A., Gudbjartsson, D.F., Sainz, J., Jonsdottir, G.M., Gudjonsson, S.A., Richardsson, B., Sigurdardottir, S., Barnard, J., Hallbeck, B., Masson, G., Shlien, A., Palsson, S.T., Frigge, M.L., Thorgerisson, T.E., Gulcher, J.R., und Stefansson, K. (2002). A high-resolution recombination map of the human genome. *Nat. Genet.* 31, 241-247.
- Koolen, M.I., van der Meyden, A.P., Bodmer, D., Eleveld, M., van der, L.E., Brunner, H., Smits, A., van den Berg, E., Smeets, D., und Geurts, v.K. (1998). A familial case of renal cell carcinoma and a t(2;3) chromosome translocation. *Kidney Int.* 53, 273-275.
- Kovacs, A. und Kovacs, G. (1992). Low chromosome number in chromophobe renal cell carcinomas. *Genes Chrom Cancer* 4, 267-268.
- Kovacs, A., Störkel, S., Thoenes, W., und Kovacs, G. (1992). Mitochondrial and chromosomal DNA alterations in human chromophobe renal cell carcinomas. *J. Pathol* 167, 273-277.
- Kovacs, G. (1989). Papillary renal cell carcinoma. A morphologic and cytogenetic study of 11 cases. *Am. J. Pathol.* 134, 27-34.
- Kovacs, G. (1993a). Molecular cytogenetics of renal cell tumors. *Adv. Cancer Res.* 62, 89-124.
- Kovacs, G. (1993b). Molecular differential pathology of renal cell tumours. *Histopathology* 22, 1-8.
- Kovacs, G. (1994). The value of molecular genetic analysis in the diagnosis and prognosis of renal cell tumours. *World J. Urol.* 12, 64-68.
- Kovacs, G. (1999). [Molecular genetics and diagnosis of renal cell tumors]. *Urologe A* 38, 433-441.
- Kovacs, G., Akhtar, M., Beckwith, J.B., Bugert, P., Cooper, C.S., Delahunt, B., Eble, J., Fleming, S., Ljungberg, B., Medeiros, L.J., Moch, H., Reuter, V.E., Ritz, E., Roos, G., Schmidt, D., Srigley, J.R., Störkel, S., Vandenberg, E., und Zbar, B. (1997). The Heidelberg classification of renal cell tumours. *J. Pathol.* 183, 131-133.
- Kovacs, G., Brusa, P., und de Riese, W. (1989a). Tissue-specific expression of a constitutional 3;6 translocation: development of multiple bilateral renal-cell carcinomas. *Int. J. Cancer* 43, 422-427.
- Kovacs, G., Erlandsson, R., Boldog, F., Ingvarsson, S., Muller Brechlin, R., Klein, G., und Sumegi, J. (1988a). Consistent chromosome 3p deletion and loss of heterozygosity in renal cell carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 1571-1575.
- Kovacs, G. und Frisch, S. (1989). Clonal chromosome abnormalities in tumor cells from patients with sporadic renal cell carcinomas. *Cancer Res.* 49, 651-659.
- Kovacs, G., Füzesi, L., Emanuel, A., und Kung, H.F. (1991). Cytogenetics of papillary renal cell tumors. *Genes Chrom Cancer* 3, 249-255.
- Kovacs, G. und Kung, H.F. (1991a). Nonhomologous chromatid exchange in hereditary and sporadic renal cell carcinomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 194-198.
- Kovacs, G., Szucs, S., de Riese, W., und Baumgartel, H. (1987). Specific chromosome aberration in human renal cell carcinoma. *Int. J. Cancer* 40, 171-178.
- Kovacs, G., Welter, C., Wilkens, L., Blin, N., und de Riese, W. (1989b). Renal oncocyoma. A phenotypic and genotypic entity of renal parenchymal tumors. *Am. J. Pathol.* 134, 967-971.
- Kovacs, G., Wilkens, L., und Papp, T. (1988b). Nondisjunction reduplication of chromosome 3 is not a common mechanism in the development of renal cell tumors. *Cytogenet Cell Genet* 48, 242-243.
- LaForgia, S., Morse, B., Levy, J., Barnea, G., Cannizzaro, L.A., Li, F.P., Nowell, P.C., Boghosian-Sell, L., Glick, J., Weston, A., Harris, C.C., Drabkin, H., Patterson, D., Croce, C.M., Schlessinger, J., und Huebner, K. (1991). Receptor protein-tyrosine phosphatase gamma is

- a candidate tumor suppressor gene at human chromosome region 3p21. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 5036-5040.
- Landegent, J.E., Jansen in de Wal, N., Dirks, R.W., Baao, F., und van der Ploeg, M. (1987). Use of whole cosmid cloned genomic sequences for chromosomal localization by non-radioactive in situ hybridization. *Hum Genet* 77, 366-370.
- Landis, S.H., Murray, T., Bolden, S., und Wingo, P.A. (1999). Cancer statistics, 1999. *CA Cancer J. Clin.* 49, 8-31, 1.
- Leach, F.S., Polyak, K., Burrell, M., Johnson, K.A., Hill, D., Dunlop, M.G., Wyllie, A.H., Peltomaki, P., de la Chapelle, A., Hamilton, S.R., Kinzler, K.W., und Vogelstein, B. (1996). Expression of the human mismatch repair gene hMSH2 in normal and neoplastic tissues. *Cancer Res.* 56, 235-240.
- Lee, L.G., Connell, C.R., Woo, S.L., Cheng, R.D., McArdle, B.F., Fuller, C.W., Halloran, N.D., und Wilson, R.K. (1992). DNA sequencing with dye-labeled terminators and T7 DNA polymerase: effect of dyes and dNTPs on incorporation of dye-terminators and probability analysis of termination fragments. *Nucleic Acids Res.* 20, 2471-2483.
- Lein, M., Jung, K., Laube, C., Hubner, T., Winkelmann, B., Stephan, C., Hauptmann, S., Rudolph, B., Schnorr, D., und Loening, S.A. (2000). Matrix-metalloproteinases and their inhibitors in plasma and tumor tissue of patients with renal cell carcinoma. *Int. J. Cancer* 85, 801-804.
- Lengauer, C., Riethman, H.C., Speicher, M.R., Taniwaki, M., Konecki, D., Green, E.D., Becher, R., Olson, M.V., und Cremer, T. (1992). Metaphase and interphase cytogenetics with Alu-PCR-amplified yeast artificial chromosome clones containing the BCR gene and the protooncogenes c-raf-1, c-fms, and c-erbB-2. *Cancer Res.* 52, 2590-2596.
- Levinson, A.K., Johnson, D.E., Strong, L.C., Pathak, S., Huff, V., und Saunders, G.F. (1990). Familial renal cell carcinoma: hereditary or coincidental. *J. Urol.* 144, 849-851.
- Li, F.P., Decker, H.J., Zbar, B., Stanton, V.P.J., Kovacs, G., Seizinger, B.R., Aburatani, H., Sandberg, A.A., Berg, S., Hosoe, S., und Brown, R.S. (1993). Clinical and genetic studies of renal cell carcinomas in a family with a constitutional chromosome 3;8 translocation. Genetics of familial renal carcinoma. *Ann. Intern. Med.* 118, 106-111.
- Lichter, P., Cremer, T., Borden, J., Manuelidis, L., und Ward, D.C. (1988). Delineation of individual human chromosomes in metaphase and interphase cells by in situ suppression hybridization using recombinant DNA libraries. *Hum Genet* 80, 224-234.
- Liehr, T., Heller, A., Starke, H., Rubtsov, N., Trifonov, V., Mrasek, K., Weise, A., Kuechler, A., und Claussen, U. (2002). Microdissection based high resolution multicolor banding for all 24 human chromosomes. *Int. J. Mol. Med.* 9, 335-339.
- Lindblad, P., Chow, W.H., Chan, J., Bergstrom, A., Wolk, A., Gridley, G., McLaughlin, J.K., Nyren, O., und Adami, H.O. (1999). The role of diabetes mellitus in the aetiology of renal cell cancer. *Diabetologia* 42, 107-112.
- Lindl, T. und Bauer, J. (1987). In *Zell- und Gewebekultur*, (Stuttgart: Gustav Fischer Verlag).
- Liu, L., Yoon, J.H., Dammann, R., und Pfeifer, G.P. (2002). Frequent hypermethylation of the RASSF1A gene in prostate cancer. *Oncogene* 21, 6835-6840.
- Liyanage, M., Coleman, A., du, M.S., Veldman, T., McCormack, S., Dickson, R.B., Barlow, C., Wynshaw-Boris, A., Janz, S., Wienberg, J., Ferguson-Smith, M.A., Schrock, E., und Ried, T. (1996). Multicolour spectral karyotyping of mouse chromosomes. *Nat. Genet.* 14, 312-315.
- Ljungberg, B., Alamdari, F.I., Stenling, R., und Roos, G. (1999). Prognostic significance of the Heidelberg classification of renal cell carcinoma. *Eur. Urol.* 36, 565-569.
- Loeb, L.A. (1991). Mutator phenotype may be required for multistage carcinogenesis. *Cancer Res.* 51, 3075-3079.
- Lopez, H.E., Kirchner, H., und Atzpodien, J. (1996). Interleukin-2 based home therapy of metastatic renal cell carcinoma: risks and benefits in 215 consecutive single institution patients. *J. Urol.* 155, 19-25.
- Lott, S.T., Chandler, D.S., Curley, S.A., Foster, C.J., el Naggar, A., Frazier, M., Strong, L.C., Lovell, M., und Killary, A.M. (2002). High frequency loss of heterozygosity in von Hippel-Lindau (VHL)-associated and sporadic pancreatic islet cell tumors: evidence for a stepwise mechanism for malignant conversion in VHL tumorigenesis. *Cancer Res.* 62, 1952-1955.

- Lott,S.T., Lovell,M., Naylor,S.L., und Killary,A.M. (1998). Physical and functional mapping of a tumor suppressor locus for renal cell carcinoma within chromosome 3p12. *Cancer Res.*
- Lovel, M, Lott, S. T., Wong, P, El-Nagger, A, Tucker, S, und Mc Neill Killary, A. The genetic locus *NRC-1* within Chromosome 3p12 mediates tumor suppression in Renal Cell Carcinoma independently of histological type,tumor microinvironment and VHL mutation. *Cancer Res.* 59, 2182-2189. 1999.
- Lucito,R., Nakimura,M., West,J.A., Han,Y., Chin,K., Jensen,K., McCombie,R., Gray,J.W., und Wigler,M. (1998). Genetic analysis using genomic representations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 4487-4492.
- Lucito,R., West,J., Reiner,A., Alexander,J., Esposito,D., Mishra,B., Powers,S., Norton,L., und Wigler,M. (2000). Detecting gene copy number fluctuations in tumor cells by microarray analysis of genomic representations. *Genome Res.* 10, 1726-1736.
- Lundsteen,C., Maahr,J., Christensen,B., Bryndorf,T., Bentz,M., Lichter,P., und Gerdes,T. (1995). Image analysis in comparative genomic hybridization. *Cytometry* 19, 42-50.
- Macgregor,H.C. und Mizuno,S. (1976). In situ hybridization of "nick-translated" 3H-ribosomal DNA to chromosomes from salamanders. *Chromosoma* 54, 15-25.
- Machtens,S., Kuczyk,M., Becker,A.J., Bokemeyer,C., Serth,J., und Jonas,U. (1999). [New aspects on the identification of genetic alterations and prognostically important biological parameters in renal cell cancer]. *Urologe. A.*
- Maher,E.R., Webster,A.R., Richards,F.M., Green,J.S., Crossey,P.A., Payne,S.J., und Moore,A.T. (1996). Phenotypic expression in von Hippel-Lindau disease: correlations with germline VHL gene mutations. *J. Med Genet* 33, 328-332.
- Maher,E.R. und Yates,J.R. (1991). Familial renal cell carcinoma: clinical and molecular genetic aspects [editorial]. *Br. J. Cancer* 63, 176-179.
- Mancilla Jimenez,R., Stanley,R.J., und Blath,R.A. (1976). Papillary renal cell carcinoma: a clinical, radiologic, and pathologic study of 34 cases. *Cancer* 38, 2469-2480.
- Mandel,J.S., McLaughlin,J.K., Schlehofer,B., Mellemgaard,A., Helmert,U., Lindblad,P., McCredie,M., und Adami,H.O. (1995). International renal-cell cancer study. IV. Occupation. *Int. J. Cancer* 61, 601-605.
- Mathew,A., Devesa,S.S., Fraumeni,J.F., Jr., und Chow,W.H. (2002). Global increases in kidney cancer incidence, 1973-1992. *Eur. J. Cancer Prev.* 11, 171-178.
- McLaughlin,J., Chianese,E., und Witte,O.N. (1987). In vitro transformation of immature hematopoietic cells by the P210 BCR/ABL oncogene product of the Philadelphia chromosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 84, 6558-6562.
- McLaughlin,J.K., Chow,W.H., Mandel,J.S., Mellemgaard,A., McCredie,M., Lindblad,P., Schlehofer,B., Pommer,W., Niwa,S., und Adami,H.O. (1995). International renal-cell cancer study. VIII. Role of diuretics, other anti-hypertensive medications and hypertension. *Int. J. Cancer* 63, 216-221.
- McLaughlin,J.K., Hrubec,Z., Heineman,E.F., Blot,W.J., und Fraumeni,J.F. (1990). Renal cancer and cigarette smoking in a 26-year followup of U.S. veterans. *Public Health Rep.* 105, 535-537.
- McLaughlin,J.K. und Schuman,L.M. (1983). Epidemiology of Renal Cell Carcinoma. *Reviews in Cancer Epidemiology* 170-210.
- Medeiros,L.J., Gelb,A.B., und Weiss,L.M. (1988). Renal Cell Carcinoma. Prognostic Significance of Morphologic Parameters in 121 Cases. *Cancer* 61, 1639-1651.
- Medeiros,L.J., Jones,E.C., Aizawa,S., Aldape,H.C., Cheville,J.C., Goldstein,N.S., Lubensky,I.A., Ro,J., Shanks,J., Pacelli,A., und Jung,S.H. (1997). Grading of renal cell carcinoma: Workgroup No. 2. Union Internationale Contre le Cancer and the American Joint Committee on Cancer (AJCC). *Cancer* 80, 990-991.
- Melendez,B., Rodriguez-Perales,S., Martinez-Delgado,B., Otero,I., Robledo,M., Martinez-Ramirez,A., Ruiz-Llorente,S., Urioste,M., Cigudosa,J.C., und Benitez,J. (2003). Molecular study of a new family with hereditary renal cell carcinoma and a translocation t(3;8)(p13;q24.1). *Hum. Genet.* 112, 178-185.

- Mellemgaard,A., Lindblad,P., Schlehofer,B., Bergstrom,R., Mandel,J.S., McCredie,M., McLaughlin,J.K., Niwa,S., Odaka,N., Pommer,W., und . (1995). International renal-cell cancer study. III. Role of weight, height, physical activity, and use of amphetamines. *Int. J. Cancer* **60**, 350-354.
- Meloni,A.M., Bridge,J., und Sandberg,A.A. (1992). Reviews on chromosome studies in urological tumors. I. Renal tumors. *J. Urol.* **148**, 253-265.
- Meloni,A.M., Dobbs,R.M., Pontes,J.E., und Sandberg,A.A. (1993). Translocation (X;1) in papillary renal cell carcinoma. A new cytogenetic subtype. *Cancer Genet Cytogenet* **65**, 1-6.
- Meloni-Ehrig,A.M. (2002). Renal cancer: cytogenetic and molecular genetic aspects. *Am. J. Med. Genet.* **115**, 164-172.
- Mende,M. (1999). Molekulargenetische Veränderungen am Nierenzellkarzinom. Diplomarbeit.
- Mendel,G. (1865). Versuche über Pflanzenhybriden. Verhandlungen des naturforschenden Vereins in Brünn 3-47.
- Mickisch,G.H. (1994). Chemoresistance of renal cell carcinoma: 1986-1994. *World J. Urol* **12**, 214-223.
- Mickisch,G.H., Roehrich,K., Koessig,J., Forster,S., Tschada,R.K., und Alken,P.M. (1990). Mechanisms and modulation of multidrug resistance in primary human renal cell carcinoma. *J. Urol.* **144**, 755-759.
- Migita,T., Oda,Y., Naito,S., und Tsuneyoshi,M. (2002). Low expression of p27(Kip1) is associated with tumor size and poor prognosis in patients with renal cell carcinoma. *Cancer* **94**, 973-979.
- Mistry,P., Stewart,A.J., Dangerfield,W., Okiji,S., Liddle,C., Bootle,D., Plumb,J.A., Templeton,D., und Charlton,P. (2001). In vitro and in vivo reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by a novel potent modulator, XR9576. *Cancer Res.* **61**, 749-758.
- Mitelman,F. (1995). Catalog of Chromosome Aberrations in Cancer., F.Mitelman, ed. (New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore: Wiley-Liss).
- Mitsumori,K., Kittleson,J.M., Itoh,N., Delahunt,B., Heathcott,R.W., Stewart,J.H., McCredie,M.R., und Reeve,A.E. (2002). Chromosome 14q LOH in localized clear cell renal cell carcinoma. *J. Pathol.* **198**, 110-114.
- Miyake,H., Nakamura,H., Hara,I., Gohji,K., Arakawa,S., Kamidono,S., und Saya,H. (1998). Multifocal renal cell carcinoma: evidence for a common clonal origin. *Clin. Cancer Res.* **4**, 2491-2494.
- Moch,H., Gasser,T., Amin,M.B., Torhorst,J., Sauter,G., und Mihatsch,M.J. (2000). Prognostic utility of the recently recommended histologic classification and revised TNM staging system of renal cell carcinoma: a Swiss experience with 588 tumors. *Cancer* **89**, 604-614.
- Moch,H., Presti-JC,J., Sauter,G., Buchholz,N., Jordan,P., Mihatsch,M.J., und Waldman,F.M. (1996). Genetic aberrations detected by comparative genomic hybridization are associated with clinical outcome in renal cell carcinoma. *Cancer Res.* **56**, 27-30.
- Moch,H., Sauter,G., Gasser,T.C., Bubendorf,L., Richter,J., Presti,J.C., Jr., Waldman,F.M., und Mihatsch,M.J. (1998a). EGF-r gene copy number changes in renal cell carcinoma detected by fluorescence in situ hybridization. *J. Pathol.* **184**, 424-429.
- Moch,H., Sauter,G., Gasser,T.C., Buchholz,N., Bubendorf,L., Richter,J., Jiang,F., Dellas,A., und Mihatsch,M.J. (1997). p53 protein expression but not mdm-2 protein expression is associated with rapid tumor cell proliferation and prognosis in renal cell carcinoma. *Urol. Res.* **25 Suppl 1**, S25-S30.
- Moch,H., Schraml,P., Bubendorf,L., Richter,J., Gasser,T.C., Mihatsch,M.J., und Sauter,G. (1998b). Intratumoral heterogeneity of von Hippel-Lindau gene deletions in renal cell carcinoma detected by fluorescence in situ hybridization. *Cancer Res.* **58**, 2304-2309.
- Morita,R., Ishikawa,J., Tsutsumi,M., Hikiji,K., Tsukada,Y., Kamidono,S., Maeda,S., und Nakamura,Y. (1991a). Allelotype of renal cell carcinoma. *Cancer Res.* **51**, 820-823.
- Morita,R., Saito,S., Ishikawa,J., Ogawa,O., Yoshida,O., Yamakawa,K., und Nakamura,Y. (1991b). Common regions of deletion on chromosomes 5q, 6q, and 10q in renal cell carcinoma. *Cancer Res.* **51**, 5817-5820.

- Morrissey,C., Martinez,A., Zatyka,M., Agathangelou,A., Honorio,S., Astuti,D., Morgan,N.V., Moch,H., Richards,F.M., Kishida,T., Yao,M., Schraml,P., Latif,F., und Maher,E.R. (2001). Epigenetic inactivation of the RASSF1A 3p21.3 tumor suppressor gene in both clear cell and papillary renal cell carcinoma. *Cancer Res.* 61, 7277-7281.
- Mostofi,F.K. (1981). *International Histological Classification of Tumours.*, F.K.Mostofi, ed. (Geneva: WHO).
- Mostofi,F.K. und Davis,C.J. (1998). *Histological Typing of Kidney Tumours.*, World Health Organization, ed. (Berlin: Springer-Verlag), pp. 7-12.
- Motzer,R.J., Bander,N.H., und Nanus,D.M. (1996). Renal-cell carcinoma. *N. Engl. J. Med* 335, 865-875.
- Motzer,R.J., Schwartz,L., Law,T.M., Murphy,B.A., Hoffman,A.D., Albino,A.P., Vlamis,V., und Nanus,D.M. (1995). Interferon alfa-2a and 13-cis-retinoic acid in renal cell carcinoma: antitumor activity in a phase II trial and interactions in vitro. *J. Clin. Oncol.* 13, 1950-1957.
- Munroe,D.J., Loebbert,R., Bric,E., Whitton,T., Prawitt,D., Vu,D., Buckler,A., Winterpacht,A., Zabel,B., und HOUSMAN,D.E. (1995). Systematic screening of an arrayed cDNA library by PCR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 2209-2213.
- Nagao,K., Yoshihiro,S., Matsuyama,H., Yamaguchi,S., Oba,K., und Naito,K. (2002). Clinical significance of allelic loss of chromosome region 5q22.3 approximately q23.2 in nonpapillary renal cell carcinoma. *Cancer Genet. Cytogenet.* 136, 23-30.
- Nagy,A., Wilhelm,M., Sükösd,F., Ljungberg,B., und Kovacs,G. (2002). Somatic mitochondrial DNA mutations in human chromophobe renal cell carcinomas. *Genes Chromosomes. Cancer* 35, 256-260.
- Nakanishi,K., Taniguchi,T., Ranganathan,V., New,H.V., Moreau,L.A., Stotsky,M., Mathew,C.G., Kastan,M.B., Weaver,D.T., und D'Andrea,A.D. (2002). Interaction of FANCD2 and NBS1 in the DNA damage response. *Nat. Cell Biol.* 4, 913-920.
- Neuhaus,C., Dijkhuizen,T., van den Berg,E., Störkel,S., Stöckle,M., Mensch,B., Huber,C., und Decker,H.J. (1997). Involvement of the Chromosomal Region 11q13 in Renal Oncocytoma: Case Report and Literature Review. *Cancer Genet Cytogenet* 95-98.
- Nickerson,M., Warren,M., Toro,J., Matrosova,V., Glenn,G., Turner,M., Duray,P., Merino,M., Choyke,P., Pavlovich,C., Sharma,N., Walther,M., Munroe,D., Hill,R., Maher,E., Greenberg,C., Lerman,M., Linehan,W., Zbar,B., und Schmidt,L. (2002). Mutations in a novel gene lead to kidney tumors, lung wall defects, and benign tumors of the hair follicle in patients with the Birt-Hogg-Dube syndrome. *Cancer Cell* 2, 157.
- Nishimura,A. (1998). The timing of cell division: Ap4A as a signal. *Trends Biochem. Sci.* 23, 157-159.
- Nishimura,A., Moriya,S., Ukai,H., Nagai,K., Wachi,M., und Yamada,Y. (1997). Diadenosine 5',5'''-P1,P4-tetraphosphate (Ap4A) controls the timing of cell division in *Escherichia coli*. *Genes Cells* 2, 401-413.
- Ogawa,O., Kakehi,Y., Ogawa,K., Koshiba,M., Sugiyama,T., und Yoshida,O. (1991). Allelic loss at chromosome 3p characterizes clear cell phenotype of renal cell carcinoma. *Cancer Res.* 51, 949-953.
- Ohh,M., Yauch,R.L., Lonergan,K.M., Whaley,J.M., Stemmer-Rachamimov,A.O., Louis,D.N., Gavin,B.J., Kley,N., Kaelin,W.G., Jr., und Iliopoulos,O. (1998). The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein is required for proper assembly of an extracellular fibronectin matrix. *Mol. Cell* 1, 959-968.
- Ohjimi,Y., Iwasaki,H., Ishiguro,M., Hara,H., Ohgami,A., Kikuchi,M., und Kaneko,Y. (1993). Deletion (X)(p11): Another Case of Renal Adenocarcinoma with Involvement of Xp11. *Cancer Genet Cytogenet* 70, 77-78.
- Ortiz-Vega,S., Khokhlatchev,A., Nedwidek,M., Zhang,X.F., Dammann,R., Pfeifer,G.P., und Avruch,J. (2002). The putative tumor suppressor RASSF1A homodimerizes and heterodimerizes with the Ras-GTP binding protein Nore1. *Oncogene* 21, 1381-1390.
- Ortmann,M., Vierbuchen,M., und Fischer,R. (1991). Sialylated glycoconjugates in chromophobe cell renal carcinoma compared with other renal cell tumors. Indication of its development

- from the collecting duct epithelium. *Virchows Arch. B Cell Pathol. Incl. Mol Pathol.* 61, 123-132.
- Pack, S.D., Zbar, B., Pak, E., Ault, D.O., Humphrey, J.S., Pham, T., Hurley, K., Weil, R.J., Park, W.S., Kuzmin, I., Stolle, C., Glenn, G., Liotta, L.A., Lerman, M.I., Klausner, R.D., Linehan, W.M., and Zhuang, Z. (1999). Constitutional von Hippel-Lindau (VHL) gene deletions detected in VHL families by fluorescence in situ hybridization. *Cancer Res.* 59, 5560-5564.
- Papadopoulos, N., Nicolaides, N.C., Wei, Y.-F., Ruben, S.M., Carter, K.C., Rosen, C.A., Haseltine, W.A., Fleischmann, R.D., Fraser, C.M., Adams, M.D., Venter, J.C., Hamilton, S.R., Petersen, G.M., Watson, P., Lynch, H.T., Peltomäki, P., Mecklin, J.P., de la Chapelle, A., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1994). Mutation of a mutL Homolog in Hereditary Colon Cancer. *Science* 263, 1625-1629.
- Parkin, D.M. und Muir, C.S. (1992). Cancer Incidence in Five Continents. Comparability and quality of data. *IARC Sci. Publ.* 45-173.
- Pause, A., Lee, S., Lonergan, K.M., und Klausner, R.D. (1998). The von Hippel-Lindau tumor suppressor gene is required for cell cycle exit upon serum withdrawal. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 993-998.
- Pavlovich, C.P., Padilla-Nash, H., Wangsa, D., Nickerson, M.L., Matrosova, V., Linehan, W.M., Ried, T., und Phillips, J.L. (2003). Patterns of aneuploidy in stage IV clear cell renal cell carcinoma revealed by comparative genomic hybridization and spectral karyotyping. *Genes Chromosomes Cancer* 37, 252-260.
- Pearson, H.H. (1969). Familial Renal Tumours. *Aust. N. Z. J. Surg.* 38, 333-338.
- Perlman, R., Schiemann, W.P., Brooks, M.W., Lodish, H.F., und Weinberg, R.A. (2001). TGF-beta-induced apoptosis is mediated by the adapter protein Daxx that facilitates JNK activation. *Nat. Cell Biol.* 3, 708-714.
- Perot, C., Bougaran, J., Boccon, G.L., Störkel, S., Leverger, G., van-den-Akker, J., Taillemite, J.L., und Couturier, J. (1999). Two new cases of papillary renal cell carcinoma with t(X;1)(p11;q21) in females. *Cancer Genet Cytogenet.* 110, 54-56.
- Piper, J., Rutovitz, D., Sudar, D., Kallioniemi, A., Kallioniemi, O.P., Waldman, F.M., Gray, J.W., und Pinkel, D. (1995). Computer image analysis of comparative genomic hybridization. *Cytometry* 19, 10-26.
- Podolski, J., Huzarski, T., Byrski, T., Toloczko, A., Wrzecion, S., Sikorski, A., Mahoy, P., Huebner, K., Rabbitts, P., und Lubinski, J. (1995). Abnormalities of chromosome 5q correlate with morphologic features of better prognosis in clear cell renal carcinomas. *Pol. J. Pathol* 46, 163-166.
- Presti, J.C., Jr., Moch, H., Gelb, A.B., Huynh, D., und Waldman, F.M. (1998). Initiating genetic events in small renal neoplasms detected by comparative genomic hybridization. *J. Urol.* 160, 1557-1561.
- Presti, J.C., Jr., Moch, H., Reuter, V.E., Cordon-Cardo, C., und Waldman, F.M. (1996a). Renal cell carcinoma genetic analysis by comparative genomic hybridization and restriction fragment length polymorphism analysis. *J. Urol.* 156, 281-285.
- Presti, J. C., Moch, H., Reuter, V. E., Huynh, D., und Waldman, F. M. Chromosome 1 and 14 Loss in Renal Oncocytomas. *J.Urol.* 155, 414 A. 1996.
- Presti, J.C., Jr., Moch, H., Reuter, V.E., Huynh, D., und Waldman, F.M. (1996b). Comparative genomic hybridization for genetic analysis of renal oncocytomas. *Genes Chromosomes. Cancer* 17, 199-204.
- Presti, J.C., Jr., Rao, P.H., Chen, Q., Reuter, V.E., Li, F.P., Fair, W.R., und Jhanwar, S.C. (1991). Histopathological, cytogenetic, and molecular characterization of renal cortical tumors. *Cancer Res.* 51, 1544-1552.
- Presti, J.C.J., Reuter, V.E., Cordon Cardo, C., Mazumdar, M., Fair, W.R., und Jhanwar, S.C. (1993). Allelic deletions in renal tumors: histopathological correlations. *Cancer Res.* 53, 5780-5783.
- Prowse, A.H., Webster, A.R., Richards, F.M., Richard, S., Olschwang, S., Resche, F., Affara, N.A., und Maher, E.R. (1997). Somatic inactivation of the VHL gene in Von Hippel-Lindau disease tumors [see comments]. *Am. J. Hum Genet* 60, 765-771.

- Ramp,U., Bretschneider,U., Ebert,T., Karagiannidis,C., Willers,R., Gabbert,H.E., und Gerharz,C.D. (2003). Prognostic implications of CD95 receptor expression in clear cell renal carcinomas. *Hum. Pathol.* 34, 174-179.
- Ramp,U., Caliskan,E., Ebert,T., Karagiannidis,C., Willers,R., Gabbert,H.E., und Gerharz,C.D. (2002). FHIT expression in clear cell renal carcinomas: versatility of protein levels and correlation with survival. *J. Pathol.* 196, 430-436.
- Renan,M.J. (1993). How many mutations are required for tumorigenesis? Implications from human cancer data. *Mol Carcinog.* 7, 139-146.
- Renshaw,A.A. und Fletcher,J.A. (1997). Trisomy 3 in renal cell carcinoma. *Mod. Pathol.* 10, 481-484.
- Reutzel,D., Mende,M., Naumann,S., Störkel,S., Brenner,W., Zabel,B., und Decker,J. (2001). Genomic imbalances in 61 renal cancers from the proximal tubulus detected by comparative genomic hybridization. *Cytogenet. Cell Genet.* 93, 221-227.
- Richards,F.M. (2001). Molecular pathology of von Hippel-Lindau disease and the VHL tumour suppressor gene. *Exp Rev Mol Med* 19.03.2001.
- Richards,F.M., Crossey,P.A., Phipps,M.E., Foster,K., Latif,F., Evans,G., Sampson,J., Lerman,M.I., Zbar,B., Affara,N.A., und et al (1994). Detailed mapping of germline deletions of the von Hippel-Lindau disease tumour suppressor gene. *Hum Mol Genet* 3, 595-598.
- Richards,F.M., Payne,S.J., Zbar,B., Affara,N.A., Ferguson Smith,M.A., und Maher,E.R. (1995). Molecular analysis of de novo germline mutations in the von Hippel-Lindau disease gene. *Hum Mol Genet* 4, 2139-2143.
- Richards,F.M., Phipps,M.E., Latif,F., Yao,M., Crossey,P.A., Foster,K., Linehan,W.M., Affara,N.A., Lerman,M.I., Zbar,B., et al (1993). Mapping the Von Hippel-Lindau disease tumour suppressor gene: identification of germline deletions by pulsed field gel electrophoresis. *Hum Mol Genet* 2, 879-882.
- Richie,J.P., Stolbach,L., Atkins,M.B., und Rose,M.A. (1990). Cancer of the kidney. In *Cancer Manual*, R.T.Osteen, ed. (Boston: American Cancer Society), pp. 274-283.
- Rigola,M.A., Casadevall,C., Bernues,M., Caballin,M.R., Fuster,C., Gelabert,A., Egozcue,J., und Miro,R. (2002). Analysis of kidney tumors by comparative genomic hybridization and conventional cytogenetics. *Cancer Genet. Cytogenet.* 137, 49-53.
- Rini,B.I. und Vogelzang,N.J. (2000). Prognostic factors in renal carcinoma. *Semin. Oncol.* 27, 213-220.
- Rosenberg,S.A., Lotze,M.T., Muul,L.M., Leitman,S., Chang,A.E., Ettinghausen,S.E., Matory,Y.L., Skibber,J.M., Shiloni,E., Vetto,J.T. (1985). Observations on the systemic administration of autologous lymphokine- activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer. *N. Engl. J. Med.* 313, 1485-1492.
- Sanger,F., Nicklen,S., und Coulson,A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74, 5463-5467.
- Schagdarsurengin,U., Gimm,O., Hoang-Vu,C., Dralle,H., Pfeifer,G.P., und Dammann,R. (2002). Frequent epigenetic silencing of the CpG island promoter of RASSF1A in thyroid carcinoma. *Cancer Res.* 62, 3698-3701.
- Schaub,T.P., Kartenbeck,J., König,J., Spring,H., Dorsam,J., Staehler,G., Störkel,S., Thon,W.F., und Keppler,D. (1999). Expression of the MRP2 gene-encoded conjugate export pump in human kidney proximal tubules and in renal cell carcinoma. *J. Am. Soc. Nephrol.* 10, 1159-1169.
- Schlehofer,B., Pommer,W., Mellemaard,A., Stewart,J.H., McCredie,M., Niwa,S., Lindblad,P., Mandel,J.S., McLaughlin,J.K., und Wahrendorf,J. (1996). International renal-cell-cancer study. VI. the role of medical and family history. *Int. J. Cancer* 66, 723-726.
- Schlichter,A., Wunderlich,H., Junker,K., Kosmehl,H., Zermann,D.H., und Schubert,J. (2000). Where are the limits of elective nephron- sparing surgery in renal cell carcinoma? *Eur. Urol.* 37, 517-520.
- Schmidt,L., Duh,F.M., Chen,F., Kishida,T., Glenn,G., Choyke,P., Scherer,S.W., Zhuang,Z., Lubensky,I., Dean,M., Allikmets,R., Chidambaram,A., Bergerheim,U.R., Feltis,J.T., Casadevall,C., Zamarron,A., Bernues,M., Richard,S., Lips,C.J., Walther,M.M., Tsui,L.C.,

- Geil,L., Orcutt,M.L., Stackhouse,T., Lipan,J., Slife,L., Brauch,H., Decker,H.J. et al.. (1997). Germline and somatic mutations in the tyrosine kinase domain of the MET proto-oncogene in papillary renal carcinomas. *Nat. Genet.* 16, 68-73.
- Schmidt,L., Junker,K., NAKAIGAWA,N., Kinjerski,T., Weirich,G., Miller,M., Lubensky,I., Neumann,H.P., Brauch,H., Decker,J., Vocke,C., Brown,J.A., Jenkins,R., Richard,S., Bergerheim,U., Gerrard,B., Dean,M., Linehan,W.M., und Zbar,B. (1999a). Novel mutations of the MET proto-oncogene in papillary renal carcinomas. *Oncogene* 18, 2343-2350.
- Schmidt,L., Li,F., Brown,R.S., Berg,S., Chen,F., Wei,M.H., Tory,K., Lerman,M.I., und Zbar,B. (1995). Mechanism of Tumorigenesis of Renal Carcinomas Associated with the Constitutional Chromosome 3;8 Translocation. *Cancer J. Sci. Am.* 1, 191.
- Schmidt,L., Lubensky,I., Linehan,W.M., und Zbar,B. (1999b). Hereditary papillary renal carcinoma: pathology and pathogenesis. *Contrib. Nephrol.* 128, 11-27.
- Schoenfeld,A.R., Parris,T., Eisenberger,A., Davidowitz,E.J., De Leon,M., Talasazan,F., Devarajan,P., und Burk,R.D. (2000). The von Hippel-Lindau tumor suppressor gene protects cells from UV- mediated apoptosis. *Oncogene* 19, 5851-5857.
- Schrock,E., du,M.S., Veldman,T., Schoell,B., Wienberg,J., Ferguson-Smith,M.A., Ning,Y., Ledbetter,D.H., Bar-Am,I., Soenksen,D., Garini,Y., und Ried,T. (1996). Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes [see comments]. *Science* 273, 494-497.
- Schullerus,D., Herbers,J., Chudek,J., Kanamaru,H., und Kovacs,G. (1997). Loss of heterozygosity at chromosomes 8p, 9p, and 14q is associated with stage and grade of non-papillary renal cell carcinomas. *J. Pathol.*
- Seabright,M. (1971). A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet* ii, 971-972.
- Seliger,B. und Pfizenmaier,K. (1989). Post-transcriptional downregulation of MHC class I expression in oncogene-transformed cells is reverted by IFN-gamma and TNF-alpha. *J. Immunogenet.* 16, 315-320.
- Sevinc,M., Kirkali,Z., Yorukoglu,K., Mungan,U., und Sade,M. (2000). Prognostic significance of microvascular invasion in localized renal cell carcinoma. *Eur. Urol.* 38, 728-733.
- Sgambati,M.T., Stolle,C., Choyke,P.L., Walther,M.M., Zbar,B., Linehan,W.M., und Glenn,G.M. (2000). Mosaicism in von Hippel-Lindau disease: lessons from kindreds with germline mutations identified in offspring with mosaic parents. *Am. J. Hum. Genet.* 66, 84-91.
- Shiina,H., Igawa,M., Urakami,S., Shirakawa,H., Ishibe,T., und Kawanishi,M. (1997). Clinical significance of immunohistochemically detectable p53 protein in renal cell carcinoma. *Eur. Urol* 31, 73-80.
- Shimazui,T., Bringuier,P.P., van Berkel,H., Ruijter,E., Akaza,H., Debruyne,F.M., Oosterwijk,E., und Schalken,J.A. (1997). Decreased expression of alpha-catenin is associated with poor prognosis of patients with localized renal cell carcinoma. *Int. J. Cancer* 74, 523-528.
- Shipley,J.M., Birdsall,S., Clark,J., Crew,J., Gill,S., Linehan,M., Gnarr,J., Fisher,S., Craig,I.W., und Cooper,C.S. (1995). Mapping the X chromosome breakpoint in two papillary renal cell carcinoma cell lines with a t(X;1)(p11.2;q21.2) and the first report of a female case. *Cytogenet Cell Genet* 71, 280-284.
- Shtivelman,E., Lifshitz,B., Gale,R.P., und Canaani,E. (1985). Fused transcript of abl and bcr genes in chronic myelogenous leukaemia. *Nature* 315, 550-554.
- Shuin,T., Kondo,K., Sakai,N., Kaneko,S., Yao,M., Nagashima,Y., Kitamura,H., und Yoshida,M.A. (1996). A case of chromophobe renal cell carcinoma associated with low chromosome number and microsatellite instability. *Cancer Genet Cytogenet* 86, 69-71.
- Sidhar,S.K., Clark,J., Gill,S., Hamoudi,R., Crew,A.J., Gwilliam,R., Ross,M., Linehan,W.M., Birdsall,S., Shipley,J., und Cooper,C.S. (1996). The t(X;1)(p11.2;q21.2) translocation in papillary renal cell carcinoma fuses a novel gene PRCC to the TFE3 transcription factor gene. *Hum Mol Genet* 5, 1333-1338.
- Siprashvili,Z., Sozzi,G., Barnes,L.D., McCue,P., Robinson,A.K., Eryomin,V., Sard,L., Tagliabue,E., Greco,A., Fusetti,L., Schwartz,G., Pierotti,M.A., Croce,C.M., und Huebner,K. (1997). Replacement of Fhit in cancer cells suppresses tumorigenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 13771-13776.

- Solinas-Toldo, S., Lampel, S., Stilgenbauer, S., Nickolenko, J., Benner, A., Dohner, H., Cremer, T., und Lichter, P. (1997). Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. *Genes Chromosomes. Cancer* 20, 399-407.
- Speicher, M.R., Gwyn, B.S., und Ward, D.C. (1996). Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nat. Genet.* 12, 368-375.
- Speicher, M.R., Schoell, B., du Manoir, S., Schrock, E., Ried, T., Cremer, T., Störkel, S., Kovacs, A., und Kovacs, G. (1994). Specific loss of chromosomes 1, 2, 6, 10, 13, 17, and 21 in chromophobe renal cell carcinomas revealed by comparative genomic hybridization. *Am. J. Pathol* 145, 356-364.
- Srigley, J.R., Hutter, R.V., Gelb, A.B., Henson, D.E., Kenney, G., King, B.F., Raziuddin, S., und Pisansky, T.M. (1997). Current prognostic factors--renal cell carcinoma: Workgroup No. 4. Union Internationale Contre le Cancer (UICC) and the American Joint Committee on Cancer (AJCC). *Cancer* 80, 994-996.
- Steger, G.G., Kaboo, R., deKernion, J.B., Figlin, R., und Belldgrun, A. (1995). The effects of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on tumour-infiltrating lymphocytes from renal cell carcinoma. *Br. J. Cancer* 72, 101-107.
- Stolle, C., Glenn, G., Zbar, B., Humphrey, J.S., Choyke, P., Walther, M., Pack, S., Hurley, K., Andrey, C., Klausner, R., und Linehan, W.M. (1998). Improved detection of germline mutations in the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. *Hum. Mutat.* 12, 417-423.
- Störkel, S. (1999). [Epithelial tumors of the kidney. Pathological subtyping and cytogenetic correlation]. *Urologe A* 38, 425-432.
- Störkel, S., Eble, J.N., Adlakha, K., Amin, M., Blute, M.L., Bostwick, D.G., Darson, M., Delahunt, B., und Iczkowski, K. (1997). Classification of renal cell carcinoma: Workgroup No. 1. Union Internationale Contre le Cancer (UICC) and the American Joint Committee on Cancer (AJCC). *Cancer* 80, 987-989.
- Störkel, S., Pannen, B., Thoenes, W., Steart, P.V., Wagner, S., und Drenckhahn, D. (1988). Intercalated cells as a probable source for the development of renal oncocytoma. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl. Mol Pathol* 56, 185-189.
- Störkel, S., Steart, P.V., Drenckhahn, D., und Thoenes, W. (1989). The human chromophobe cell renal carcinoma: its probable relation to intercalated cells of the collecting duct. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl. Mol Pathol* 56, 237-245.
- Stumm, M., Koch, A., Wieacker, P.F., Phillip, C., Steinbach, F., Allhoff, E.P., Buhtz, P., Walter, H., Tonnies, H., und Wirth, J. (1999). Partial monosomy 2p as the single chromosomal anomaly in a case of renal metanephric adenoma. *Cancer Genet. Cytogenet.* 115, 82-85.
- Sütkösd, F., Kuroda, N., Beothe, T., Kaur, A.P., und Kovacs, G. (2003). Deletion of Chromosome 3p14.2-p25 Involving the VHL and FHIT Genes in Conventional Renal Cell Carcinoma. *Cancer Res.* 63, 455-457.
- Swanson, D.A., Rothenberg, H.J., Boynton, A.L., Consigliere, D., Halling, K.C., Oda, H., und Smith, D. (1997). Future prognostic factors for renal cell carcinoma: Workgroup No. 5. Union Internationale Contre le Cancer (UICC) and the American Joint Committee on Cancer (AJCC). *Cancer* 80, 997-998.
- Symbas, N.P., Townsend, M.F., El Galley, R., Keane, T.E., Graham, S.D., und Petros, J.A. (2000). Poor prognosis associated with thrombocytosis in patients with renal cell carcinoma. *BJU. Int.* 86, 203-207.
- Szucs, S., Muller Brechlin, R., de Riese, W., und Kovacs, G. (1987). Deletion 3p: the only chromosome loss in a primary renal cell carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet* 26, 369-373.
- Taniguchi, T., Garcia-Higuera, I., Andreassen, P.R., Gregory, R.C., Grompe, M., und D'Andrea, A.D. (2002). S-phase-specific interaction of the Fanconi anemia protein, FANCD2, with BRCA1 and RAD51. *Blood* 100, 2414-2420.
- Teh, B.T., Blennow, E., GIRAUD, S., Sahlen, S., Hii, S.I., Brookwell, R., Brauch, H., Nordenskjöld, M., Larsson, C., und Nicol, D. (1998). Bilateral multiple renal oncocytomas and cysts associated with a constitutional translocation (8;9)(q24.1;q34.3) and a rare constitutional VHL missense substitution. *Genes Chromosomes. Cancer* 21, 260-264.

- Telenius,H., Carter,N.P., Bebb,C.E., Nordenskjold,M., Ponder,B.A., und Tunnacliffe,A. (1992a). Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer. *Genomics* 13, 718-725.
- Telenius,H., Pelmeur,A.H., Tunnacliffe,A., Carter,N.P., Behmel,A., Ferguson Smith,M.A., Nordenskjold,M., Pfragner,R., und Ponder,B.A. (1992b). Cytogenetic analysis by chromosome painting using DOP-PCR amplified flow-sorted chromosomes. *Genes Chromosom. Cancer* 4, 257-263.
- Thoenes,W., Rumpelt,H.J., und Störkel,S. (1990a). [Klassifikation der Nierenzellkarzinome / Tumoren und ihre Beziehung zum Nephron-Sammelrohrsystem. *Klin. Wochenschr.* 68, 1102-1111.
- Thoenes,W., Störkel,S., und Rumpelt,H.J. (1986). Histopathology and classification of renal cell tumors (adenomas, oncocytoomas and carcinomas). The basic cytological and histopathological elements and their use for diagnostics. *Pathol Res. Pract.* 181, 125-143.
- Thoenes,W., Störkel,S., Rumpelt,H.J., und Moll,R. (1990b). Cytomorphological typing of renal cell carcinoma--a new approach. *Eur. Urol* 18 Suppl 2, 6-9.
- Thomas,D., Scot,A.D., Barbey,R., Padula,M., und Boiteux,S. (1997). Inactivation of OGG1 increases the incidence of G . C-->T . A transversions in *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for endogenous oxidative damage to DNA in eukaryotic cells. *Mol Gen. Genet.* 254, 171-178.
- Thrash Bingham,C.A., Greenberg,R.E., Howard,S., Bruzel,A., Bremer,M., Goll,A., Salazar,H., Freed,J.J., und Tartof,K.D. (1995). Comprehensive allelotyping of human renal cell carcinomas using microsatellite DNA probes. *Proc Natl. Acad Sci. U. S. A* 92, 2854-2858.
- Timmers,C., Taniguchi,T., Hejna,J., Reifsteck,C., Lucas,L., Bruun,D., Thayer,M., Cox,B., Olson,S., D'Andrea,A.D., Moses,R., und Grompe,M. (2001). Positional cloning of a novel Fanconi anemia gene, FANCD2. *Mol. Cell* 7, 241-248.
- Tjio,J.H. und Levan,A. . (1956). The chromosome number in man. *Hereditas* 42, 1-6.
- Tomlinson,I.P., Alam,N.A., Rowan,A.J., Barclay,E., Jaeger,E.E., Kelsell,D., Leigh,I., Gorman,P., Lamlum,H., Rahman,S., Roylance,R.R., Olpin,S., Bevan,S., Barker,K., Hearle,N., Houlston,R.S., Kiuru,M., Lehtonen,R., Karhu,A., Vilkki,S., Laiho,P., Eklund,C., Vierimaa,O., Aittomaki,K., Hietala,M., Sistonen,P., Paetau,A., Salovaara,R., Herva,R., Launonen,V., und Aaltonen,L.A. (2002). Germline mutations in FH predispose to dominantly inherited uterine fibroids, skin leiomyomata and papillary renal cell cancer. *Nat. Genet.* 30, 406-410.
- Tommasi,S., Dammann,R., Jin,S.G., Zhang,X., X, Avruch,J., und Pfeifer,G.P. (2002). RASSF3 and NORE1: identification and cloning of two human homologues of the putative tumor suppressor gene RASSF1. *Oncogene* 21, 2713-2720.
- Traut,W. (2000). *Klassische und molekulare Cytogenetik*. (Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hong Kong, Barcelona, Budapest: Springer-Verlag).
- Tsujimoto,Y., Finger,L.R., Yunis,J., Nowell,P.C., und Croce,C.M. (1984). Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science* 226, 1097-1099.
- Tsukamoto,T., Takahashi,T., Ueda,R., Hibi,K., Saito,H., und Takahashi,T. (1992). Molecular analysis of the protein tyrosine phosphatase gamma gene in human lung cancer cell lines. *Cancer Res.* 52, 3506-3509.
- van den Berg,E. und Dijkhuizen,T. (1999). Classification of renal cell cancer based on (cyto)genetic analysis. *Contrib. Nephrol.* 128, 51-61.
- van den Berg,E., Dijkhuizen,T., Oosterhuis,J.W., van Kessel,A.G., de Jong,B., und Störkel,S. (1997). Cytogenetic Classification of Renal Cell Cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 95, 103-107.
- van den Berg,E., Dijkhuizen,T., Störkel,S., de la Riviere,G.B., Dam,A., Mensink,H.J., Oosterhuis,J.W., und de Jong,B. (1995). Chromosomal changes in renal oncocytoomas. Evidence that t(5; 11)(q35;q13) may characterize a second subgroup of oncocytoomas. *Cancer Genet Cytogenet* 79, 164-168.
- van den Berg,E., van der Hout,A.H., Oosterhuis,J.W., Dijkhuizen,T., Störkel,S., Dam,A., Zweers,H.M.M., Mensink,H.J.A., Buys,C.H.C.M., de Jong,B., Störkel,S., Zweers,H.M.,

- Mensink,H.J., und Buys,C.H. (1993). Cytogenetic Analysis of Epithelial Renal-Cell Tumors: Relationship with a New Histopathological Classification. *Int. J. Cancer* 55, 223-227.
- van der Hout,A.H., Kok,K., van den Berg,A., Oosterhuis,J.W., Carritt,B., und Buys,C.H. (1988). Direct molecular analysis of a deletion of 3p in tumors from patients with sporadic renal cell carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet* 32, 281-285.
- van der Hout,A.H., van der Vlies,P., Wijmenga,C., Li,F.P., Oosterhuis,J.W., und Buys,C.H. (1991). The region of common allelic losses in sporadic renal cell carcinoma is bordered by the loci D3S2 and THRB. *Genomics* 11, 537-542.
- van Engeland,M., Roemen,G.M., Brink,M., Pachen,M.M., Weijenberg,M.P., de Bruine,A.P., Arends,J.W., van den Brandt,P.A., de Goeij,A.F., und Herman,J.G. (2002). K-ras mutations and RASSF1A promoter methylation in colorectal cancer. *Oncogene* 21, 3792-3795.
- Van-Den-Berg,A., Draaijers,T.G., Kok,K., Timmer,T., Van,d., V, Veldhuis,P.M., de-Leij,L., Gerhartz,C.D., Naylor,S.L., Smith,D.I., und Buys,C.H. (1997). Normal FHIT transcripts in renal cell cancer- and lung cancer-derived cell lines, including a cell line with a homozygous deletion in the FRA3B region. *Genes Chromosomes. Cancer*.
- Vartanian,A., Alexandrov,I., Prudowski,I., McLennan,A., und Kisselev,L. (1999). Ap4A induces apoptosis in human cultured cells. *FEBS Lett.* 456, 175-180.
- Velickovic,M., Delahunt,B., und Grebe,S.K. (1999). Loss of heterozygosity at 3p14.2 in clear cell renal cell carcinoma is an early event and is highly localized to the FHIT gene locus. *Cancer Res.* 59, 1323-1326.
- Verma,R.S. und Babu,A. (1989). *Human Chromosomes. Manual of Basic Techniques.* (New York: Pergamon Press), p. -240.
- Walter,T.A., Berger,C.S., und Sandberg,A.A. (1989). The cytogenetics of renal tumors. Where do we stand, where do we go. *Cancer Genet Cytogenet* 43, 15-34.
- Wang,L., Darling,J., Zhang,J.S., Qian,C.P., Hartmann,L., Conover,C., Jenkins,R., und Smith,D.I. (1998). Frequent homozygous deletions in the FRA3B region in tumor cell lines still leave the FHIT exons intact. *Oncogene*.
- Watson,M.L. (1997). Complications of polycystic kidney disease. *Kidney Int.* 51, 353-365.
- Wechsel,H.W., Bichler,K.H., Feil,G., Loeser,W., Lahme,S., und Petri,E. (1999). Renal cell carcinoma: relevance of angiogenetic factors. *Anticancer Res.* 19, 1537-1540.
- Weirich,G., Glenn,G., Junker,K., Merino,M., Störkel,S., Lubensky,I., Choyke,P., Pack,S., Amin,M., Walther,M.M., Linehan,W.M., und Zbar,B. (1998). Familial renal oncocytoma: clinicopathological study of 5 families. *J. Urol* 160, 335-340.
- Weirich,G., Klein,B., Wohl,T., Engelhardt,D., und Brauch,H. (2002). VHL2C phenotype in a German von Hippel-Lindau family with concurrent VHL germline mutations P81S and L188V. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 87, 5241-5246.
- Welter,C., Kovacs,G., Seitz,G., und Blin,N. (1989). Alteration of mitochondrial DNA in human oncocytomas. *Genes Chrom Cancer* 1, 79-82.
- Wessendorf,S., Fritz,B., Wrobel,G., Nessling,M., Lampel,S., Goettel,D., Kuepper,M., Joos,S., Hopman,T., Kokocinski,F., Dohner,H., Bentz,M., Schwaenen,C., und Lichter,P. (2002). Automated screening for genomic imbalances using matrix-based comparative genomic hybridization. *Lab Invest* 82, 47-60.
- Wessendorf,S., Schwaenen,C., Kohlhammer,H., Kienle,D., Wrobel,G., Barth,T.F., Nessling,M., Moller,P., Dohner,H., Lichter,P., und Bentz,M. (2003). Hidden gene amplifications in aggressive B-cell non-Hodgkin lymphomas detected by microarray-based comparative genomic hybridization. *Oncogene* 22, 1425-1429.
- Weterman,M.A., Wilbrink,M., und Geurts-van,K.A. (1996a). Fusion of the transcription factor TFE3 gene to a novel gene, PRCC, in t(X;1)(p11;q21)-positive papillary renal cell carcinomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 15294-15298.
- Weterman,M.A., Wilbrink,M., Janssen,I., Janssen,H.A., van den Berg,E., Fisher,S.E., Craig,I., und Geurts van Kessel,A. (1996b). Molecular cloning of the papillary renal cell carcinoma-associated translocation (X;1)(p11;q21) breakpoint. *Cytogenet Cell Genet* 75, 2-6.

- Wimmer-Kleikamp,S., Reutzel,D., Lausch,E., Brenner,W., Zabel,B., und Decker,H.J. (2003). Molecular genetic changes on chromosome 14q correlate with tumor progression and survival probability in clear cell and papillary renal cell carcinoma. In Vorbereitung.
- Wolk,A., Gridley,G., Niwa,S., Lindblad,P., McCredie,M., Mellemgaard,A., Mandel,J.S., Wahrendorf,J., McLaughlin,J.K., und Adami,H.O. (1996). International renal cell cancer study. VII. Role of diet. *Int. J. Cancer* 65, 67-73.
- Wu,S.Q., Hafez,G.R., Xing,W., Newton,M., Chen,X.R., Messing,E., und XING,W.R. (1996). The correlation between the loss of chromosome 14q with histologic tumor grade, pathologic stage, and outcome of patients with nonpapillary renal cell carcinoma. *Cancer* 77, 1154-1160.
- Xian,J., Clark,K.J., Fordham,R., Pannell,R., Rabbitts,T.H., und Rabbitts,P.H. (2001). Inadequate lung development and bronchial hyperplasia in mice with a targeted deletion in the *Dutt1/Robo1* gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 15062-15066.
- Yamakawa,K., Morita,R., Takahashi,E., Hori,T., Ishikawa,J., und Nakamura,Y. (1991). A Detailed Deletion Mapping of the Short Arm of Chromosome 3 in Sporadic Renal Cell Carcinoma. *Cancer Res.* 51, 4707-4711.
- Yang,Z.Q., Yoshida,M.A., Fukuda,Y., Kurihara,N., Nakamura,Y., und Inazawa,J. (2000). Molecular cytogenetic analysis of 17 renal cancer cell lines: increased copy number at 5q31-33 in cell lines from nonpapillary carcinomas [published erratum appears in *Jpn J Cancer Res* 2000 Jul;91(7):767]. *Jpn. J. Cancer Res.* 91, 156-163.
- Yoon,J.H., Dammann,R., und Pfeifer,G.P. (2001). Hypermethylation of the CpG island of the *RASSF1A* gene in ovarian and renal cell carcinomas. *Int. J. Cancer* 94, 212-217.
- Yoshida,M.A., Ochi-Takeuchi,H., Gibas,Z., und Sandberg,A.A. (1985). Updating of chromosome changes in renal carcinoma. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* 28, 31.
- Yoshida,M.A., Ohyashiki,K., Ochi,H., Gibas,Z., Pontes,J.E., Prout,G.R., Jr., Huben,R., und Sandberg,A.A. (1986). Cytogenetic studies of tumor tissue from patients with nonfamilial renal cell carcinoma. *Cancer Res.* 46, 2139-2147.
- Yu,M.C., Mack,T.M., Hanisch,R., Cicioni,C., und Henderson,B.E. (1986). Cigarette smoking, obesity, diuretic use, and coffee consumption as risk factors for renal cell carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 77, 351-356.
- Yuan,J.M., Castela,J.E., Gago-Dominguez,M., Yu,M.C., und Ross,R.K. (1998). Tobacco use in relation to renal cell carcinoma. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 7, 429-433.
- Zajacsek, S., Gronwald, J., Kata, G., Borowka, A., und Lubinski, J. Familial clear renal cell cancer (CRCC) associated with constitutional reciprocal translocation t(2;3)(q33;q21). [85], 172. 1999. *Cytogenet. Cell Genet. Conference Proceeding*
- Zbar,B., Glenn,G., Lubensky,I., Choyke,P., Walther,M.M., Magnusson,G., Bergerheim,U.S., Pettersson,S., Amin,M., Hurley,K. et al (1995). Hereditary papillary renal cell carcinoma: clinical studies in 10 families. *J. Urol* 153, 907-912.
- Zbar,B. und Lerman,M. (1998). Inherited carcinomas of the kidney. *Adv. Cancer Res.* 75, 163-201.
- Zbar,B., Tory,K., Merino,M., Schmidt,L., Glenn,G., Choyke,P., Walther,M.M., Lerman,M., und Linehan,W.M. (1994). Hereditary papillary renal cell carcinoma. *J. Urol* 151, 561-566.
- Zhuang,Z., Park,W.S., Pack,S., Schmidt,L., Vortmeyer,A.O., Pak,E., Pham,T., Weil,R.J., Candidus,S., Lubensky,I.A., Linehan,W.M., Zbar,B., und Weirich,G. (1998). Trisomy 7-harboring non-random duplication of the mutant *MET* allele in hereditary papillary renal carcinomas. *Nat. Genet.* 20, 66-69.

8 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-Triphosphat
BSA	Rinderserum-Albumin (Bovine Serum Albumin)
bzw.	beziehungsweise
CEP	„ <i>chromosome enumeration probe</i> “ (Chromosomenspezifische α -Satellitensonde)
C	Cytidin
CGH	Comparative Genomische Hybridisierung
Ci	Curie
cpm	Impulse pro Minute (counts per minute)
Cy	Cyanin-Fluorochrom
DAPI	DiAminophenyl-Indol
DEAE	DiethylAminoethyl
del	Deletion
der	Derivativ
d. h.	das heißt
DIG	Digoxigenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	2'-Deoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat
EDTA	EthylendiAminetraessigsäure / Tritriplex III
EGFR	Epidermaler-Wachstumsfaktor-Rezeptor („epidermal-growth-factor-receptor“)
et al.	und andere (<i>et altera</i>)
EtOH	Ethanol
ff.	fortfolgend
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
G	Guanin
g	Erdbeschleunigung, 9.81ms^{-2}
ges.	gesättigt
ggf.	gegebenenfalls
h	Stunde
i.d.R.	in der Regel
inv	Inversion
IPTG	Isopropyl-b-D-thio-galaktopyranosid
ISCN	<i>International System for Human Cytogenetic Nomenclature</i>
kb	Kilobasenpaare
LOH	Verlust der Heterozygotie (<i>“loss of heterozygosity”</i>)
Mb	Megabasenpaare
min	Minute
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
NZK	Nierenzellkarzinom
OD	Optische Dichte
PAC	<i>“P1 derived artificial chromosome”</i>
PBS	Natriumphosphatgepufferte Salzlösung (Phosphat-Buffered-Saline)
PCR	Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
PEG	Polyethylenglycol
pers.	persönlich
PHA	Phytohämagglutinin
PWM	<i>„Pokeweed Mitogen“</i>
RFLP	Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus
RNA	Ribonukleinsäure
UpM	Umdrehungen pro Minute
rev ish	reverse in-situ Hybridisierung
RSO	<i>„region of smallest overlap“</i> , kleinster gemeinsamer Überlappungsbereich

RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SSC	Natriumzitrattuffer „standard-saline-citrate“
SSCP	„ <i>single strand conformation polymorphism</i> “,
SDS	Natriumdodecylsulfat (Sodiumdodecylsulphate)
t(;)	Translokation
T	Thymin
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
T _m	Schmelztemperatur von Nukleinsäuren
TRITC	TetrarhodAmin-Isothiocyanat
Tris	Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan
TSG	Tumorsuppressorgen
U	Einheit (unit)
ü.N.	über Nacht
UV	ultraviolettes Licht
VHL	von Hippel-Lindau
VHLS	von Hippel-Lindau Syndrom
WCP	“ <i>whole chromosome probe</i> “, chromosomenspezifischeDNA Sonde
WHO	“ <i>World Health Organization</i> “, Weltgesundheitsorganisation
YAC	“ <i>yeast artificial chromosome</i> “, künstliches Hefe-Chromosom
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
z.Z.	zur Zeit

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Zuordnung der fünf häufigsten epithelialen Neoplasien des Nephrons zu deren Ursprungsort	11
Abbildung 2: Darstellung der Einzelfluoreszenzen der CGH	19
Abbildung 3: Interpretation des Fluoreszenzquotienten	20
Abbildung 4: Prinzip der M-FISH	21
Abbildung 5: Darstellung der CGH Ergebnisse von 46 klarzelligen Nierenkarzinomen	53
Abbildung 6: Kaplan-Meier Überlebenskurve klarzellige Karzinome	55
Abbildung 7: Darstellung der CGH Ergebnisse von 15 papillären Nierenkarzinomen	56
Abbildung 8: Prognosedifferenzen in den mit CGH untersuchten papillären NZK	58
Abbildung 9: Darstellung der CGH Ergebnisse von 14 chromophoben Nierenkarzinomen	59
Abbildung 10: Kaplan-Meier Überlebenskurve im Kollektiv mit chromophoben Nierenkarzinom	62
Abbildung 11: Darstellung der CGH Ergebnisse in 16 Onkozytomen	63
Abbildung 12: Postoperatives Überleben der am Onkozytom der Niere behandelten Patienten	65
Abbildung 13: CGH-Hybridisierungsergebnis der Zelllinie 786-O	66
Abbildung 14: CGH-Hybridisierungsergebnis der Zelllinie CaKi-1	67
Abbildung 15: CGH-Hybridisierungsergebnis der Zelllinie CaKi-2	67
Abbildung 16: CGH-Hybridisierungsergebnis der Zelllinie KTCTL-26A	68
Abbildung 17: Links: CGH-Imbalanzprofil der Zelllinie A498	68
Abbildung 18: CGH-Hybridisierungsergebnis der embryonalen Nieren-Zelllinie HEK293	69
Abbildung 19: Ergebnisvergleich zwischen Matrix-CGH konventioneller, chromosomenbasierter CGH	70
Abbildung 21: Allelverluste von 14q korrelieren unabhängig vom Tumorsubtyp mit einem hohen Entdifferenzierungsgrad	72
Abbildung 22: Kaplan-Meier Überlebenskurven Abhängigkeit eines Allel-Verlustes (LOH) 14q	73
Abbildung 23: Maßstäbliche Schemadarstellung der genomischen Lage der PAC-Klone 85E19 und 102L11	76
Abbildung 24: M-FISH Ergebnis des klarzelligen primären Nierenkarzinoms	77
Abbildung 25: M-FISH Ergebnis der klarzelligen Zelllinie KTCTL-26A	77
Abbildung 26: Familienstammbaum und klinischer Verlauf der drei untersuchten Patienten	78
Abbildung 27: WCP Nachweis der konstitutionell vorhandenen Translokation t(3;8)(q13;p21)	78
Abbildung 28: Konstitutionelle Giemsa gefärbte Karyotypen (GTG-Bandierung)	79
Abbildung 29: Schemadarstellung des Rearrangements zwischen Chromosom 3 und Chromosom 8	80
Abbildung 30: Multiplex-FISH Hybridisierung der t(3;8)	80
Abbildung 31: Hybridisierungsergebnis fluoreszenzmarkierter VHL-Sonde (102L11, 155kb) auf männlichen Metaphasechromosomen (46, XY)	82
Abbildung 32: FISH mit VHL-Sonde 102L11 auf primäre Nierentumorzellen	82
Abbildung 33: Fluoreszenzmarkierte VHL-Sonde (102L11, 155kb) auf männlichen Interphasekernen (46, XY)	83
Abbildung 34: Unterschiedliche Möglichkeiten der Untersuchung des Tumorgenoms	84
Abbildung 35: Histomorphologische Charakteristik unterschiedlicher Karzinome	89
Abbildung 36: Zuordnung der Subtypen der Nierenzell-Adenome und -Karzinome zu Nephronabschnitten	90
Abbildung 37: Hypothetische Entwicklungswege papillärer und klarzelliger Karzinome der Niere.	92
Abbildung 38: Hypothetisches Stufenmodell der Entstehung klarzelliger (konventioneller) Nierenzellkarzinome	95
Abbildung 39: Multiplex-FISH mit mikro-dissezierten bandenspezifischen DNA-Sonden	99
Abbildung 40: 3-Schritt Mechanismus der Tumorentstehung in familiären Nierenkarzinomen mit Chromosom 3 Translokation	101
Abbildung 41: Postulierter Alternativ-Mechanismus der Geninaktivierung auf Chromosomenarm 3p in Tumorgewebe des vorgestellten Falles.	102
Abbildung 42: Ideogramm des humanen Chromosoms 3	103
Abbildung 43: Darstellung der sauerstoffabhängigen Degradation des Transkriptionsfaktors HIF1A	104
Abbildung 44: Derzeitige Modellvorstellung der Fanconi-Anämie Komplex (FA) moderierten Genomstabilisierung	105

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auszug aus den derzeit gültigen, tumorbezogenen Prognosemarkern	7
Tabelle 2: Tumorstadieneinteilung nach dem TNM-System (nach AJCC/UICC, 1997)	8
Tabelle 3: TNM Stadieneinteilung und deren Überlebenswahrscheinlichkeit	8
Tabelle 4: Pathologische Klassifikation der Nierenkarzinome und zytogenetische Veränderungen	10
Tabelle 5: Pathologische Klassifikation der Nieren-Adenome und zytogenetischen Veränderungen	11
Tabelle 6: Zytogenetisch dokumentierte Verluste des humanen Chromosoms 3p in Nierentumoren	13
Tabelle 7: Primer-Sequenzen der verwendeten Mikrosatelliten-Loci	25
Tabelle 8: Primer zur Durchsuchung der PAC-Bibliothek nach humangenomischen VHL Klonen	26
Tabelle 9: PCR-Puffer zur Optimierung der Mikrosatelliten-PCR.	34
Tabelle 10: PCR-Ansatz für die Amplifikation der Mikrosatelliten	30
Tabelle 11: PCR-Programme für die Applifikation von Mikrosatelliten	35
Tabelle 12: Schema der PAC-Bankanordnung.	36
Tabelle 13: Zusammensetzung der VHL-PCR-Ansätze	37
Tabelle 14: Temperatur und Dauer der Amplifikationsschritte für die VHL-Exons.	37
Tabelle 15: Zusammensetzung der fünf verschiedenen Chromosomen-Pools	47
Tabelle 16: DOP-PCR Pipettierschema zur genomischen Amplifikation geringer Ausgangsmengen	47
Tabelle 17: DOP-PCR Programm	48
Tabelle 18: Optische Charakteristika der verbauten M-FISH Filterblöcke	49
Tabelle 19: Chromosomale Zugewinne und Verluste in klarzelligen Nierenkarzinomen (kzNZK)	52
Tabelle 20: Kontingenztabellen zur Korrelation pathologischer Parameter klarzelliger NZK	54
Tabelle 21: Chromosomale Zugewinne und Verluste in papillären Nierenkarzinomen (pNZK)	57
Tabelle 22: Chromosomale Zugewinne und Verluste in chromophoben Nierenkarzinomen (chNZK)	60
Tabelle 23: Chromosomale Imbalancen chromophoben Nierenkarzinome stehen in Beziehung mit pathologischen Parametern	61
Tabelle 24: Chromosomale Zugewinne und Verluste in Onkozytomen	64
Tabelle 25: Darstellung der einzelnen Mikrosatellitenuntersuchungen mit Aufschlüsselung markerbezogener Einzelbefunde	72
Tabelle 26: Ergebnisvergleich zwischen MSA und CGH des Chromosomenarms 14q in 20 Nierenkarzinomen	74
Tabelle 27: Gegenüberstellung der Nierentumor-Klassifikationen	90
Tabelle 28: Gegenüberstellung genetischer Veränderungen bei familiären und sporadischen Karzinomen der Niere	93
Tabelle 29: Bedeutung biologischer Faktoren für die Tumorprogression	94
Tabelle 30: Übersicht relevanter Chromosomenimbalancen klarzelliger Karzinome und deren Bedeutung als Marker der Progression und Prognoseindikator	96
Tabelle 31: Einteilung der VHL-Erkrankung nach dem Erkrankungsrisiko für die Tumore Hämangioblastom, Nierenzellkarzinom und Phäochromozytom	98
Tabelle 32: VHL-Erkrankungstyp, zugrundeliegende VHL-Mutation und resultierende molekulare Funktionsstörung	98
Tabelle 33: Übersicht familiärer Nierenkarzinome mit Chromosom 3 Translokationen	100
Tabelle 34: Gene des Chromosoms 3 mit Bezug zur Pathogenese des klarzelligen Nierenkarzinoms	103
Tabelle 35: Übersicht relevanter Chromosomenimbalancen in papillären Karzinomen und deren Bedeutung als Marker der Progression und Prognoseindikator	113
Tabelle 36: Übersicht relevanter Chromosomenimbalancen in chromophoben Karzinomen und deren Bedeutung als Marker der Progression und Prognoseindikator	114
Tabelle 37: Ergebnisvergleich der Matrix-CGH und konventioneller CGH	146
Tabelle 38: Eine Auswahl für die im vorliegenden, familiären Fall für die Tumorentwicklung potenziell relevanter Gene.	147

11 Anhang

11.1 Matrix CGH und CGH

Tabelle 37: Ergebnisvergleich der Matrix-CGH und konventioneller CGH. Einzelklon-Detektionen der Matrix-CGH sind rot abgedruckt. Imbalanzen, die den theoretischen Schwellenwert für Zugewinn oder Verlust nicht ganz erreichen, sind in Klammern gesetzt.

Tumornummer	Zugewinne		Verluste	
	Matrix CGH	CGH	Matrix CGH	CGH
611	4q26q28	4q26q28	3p26q13.3	3p26q13.3
	7	7	5q21q23	5q21q23
	15q22.2		6q23q27	6q24q27
	15q25		8q24	
	16q22			
	21q	21		
76	(5)	5	1p36	
	(7)	7	3p	
	20	20	5q32	
			7p22	
			(9p23p21)	
			(14q21q22)	
80	1p33p34		2q35	
	5	5	8	8
	6q26		12q21.3	
	7	7	12q24.32	
	11q13.5		14	14
	16	16		
138	5q21q35	1p36.3-p33	3p14.3p26	3p
	9q34	5q23-q35	5p14.3p15.1	
	7	7	6q26	
		19		Y
		20q		
		21		
		22		
142	1p33p34		2q33q37	3p
	5	5	3q21-pter	3q13-q23
	9q34		6q26	22q13
	(16p13q24)		(17q23)	
172	(5q35)		6p12	
	8	8	(11q22.1)	
	10p11.2p12	10	13q14.2	
	11p15q22	11p15q22	18p11.31-.32	
	12p13.3	12q11q23	18q11	
	12q12q24.3			

Tumornummer	Zugewinne		Verluste	
	Matrix CGH	CGH	Matrix CGH	CGH
200	1q	1q	1p	
		3q13.3q24	3p14-p26	3p22p26
	6p12			3p12
	(8p23)		4	4
		10	6qter	
	11p15.3p15.4			
	17	17		
		19		
400	5	5	2q35-q37	2q36q37
	14qter		3p	3p
			18q22q23	
493	5	5	3p	3p
	7q22		6p23-p26r	6p25p23
	9p	9p	6q21q27	6q21q27
	11p15		9q	9q
	20q13.2		13q13q21	
	Xq26		13q32q33	
			14	
			22q	
499	1	1	3p25	3p26p24
	2	2	3p21	
	4q32q35	4q23q35	6	6
	5	5	8p	
		7	8q11q24	
	8q24	8q24.1q24.3	9p24p22	9p24p22
	(9q)	9q	9p13p21	
	12	12	18q11.2	
	13q	13q		
		15		
	16q23q24	16		
	17p12p13	17		
	17q22q25			
		19		
		20		
503	5q23q31		3p24p26	3p21p26
	5q33q35		12q21.3	
	7	7	12q24.32	
	20q13.2		14q22q32	
	Xq27q28	Xq26-q28	15 q11q12	
			15q14q21	
507	5	5	3q13qter	3p26q13.3
	(7p14)		10q24q26	
	9q34		14	
	15q21.3			
	17q21			

11.2 Bruchpunktnahe Kandidatengene der Tumorentstehung

Tabelle 38: Eine Auswahl für die im vorliegenden, familiären Fall für die Tumorentwicklung potenziell relevanten Gene. Selektiert wurden Gene Bruchpunkt-flankierender, zytogenetischer Banden, denen in der Regulation von Proliferation und (De-)Differenzierung, Zelladhäsion sowie der Transkriptionsregulation und Apoptoseinduktion eine Rolle zukommt (Auszug aus <http://www.ensembl.org>; Rev. 11.31.1 , Stand 3/2003).

3p13

Bande	HUGO ID	Beschreibung
3p13	MITF	MICROPHthalmia-ASSOCIATED TRANSCRIPTION FACTOR
3p13	FOXP1	FORKHEAD BOX PROTEIN P1 (HSPC215)
3p13	RYBP	RING1 AND YY1 BINDING PROTEIN; RING1 INTERACTOR RYBP; YY1 AND E4TF1 ASSOCIATED FACTOR 1
3p13	PPP4R2	PROTEIN PHOSPHATASE 4 REGULATORY SUBUNIT 2
3p12.3	ROBO1	ROUNDAABOUT 1, ISOFORM A; AXON GUIDANCE RECEPTOR

3q13

Bande	HUGO ID	Beschreibung
3q13.11	CBLB	SIGNAL TRANSDUCTION PROTEIN CBL-B (SH3-BINDING PROTEIN CBL-B)
3q13.12	BBX	HMG-BOX TRANSCRIPTION FACTOR BBX; X 001 PROTEIN
3q13.13	ESRRBL1	ESTROGEN-RELATED RECEPTOR BETA LIKE 1
3q13.13	GUCA1C	GUANYLYL CYCLASE ACTIVATING PROTEIN 3 (GCAP 3) (GUANYLATE CYCLASE ACTIVATOR 1C)

8p21

Bande	HUGO ID	Beschreibung
8p22	FGF20	FIBROBLAST GROWTH FACTOR-20 (FGF-20)
8p22	ZDHHC2	ZINC FINGER, DHHC DOMAIN CONTAINING 2
8p22	CNOT7	CCR4-NOT TRANSCRIPTION COMPLEX, SUBUNIT 7 (CCR4-ASSOCIATED FACTOR 1)
8p22	PDGFRL	PLATELET-DERIVED GROWTH FACTOR RECEPTOR-LIKE PROTEIN
8p21.3	LZTS1	LEUCINE ZIPPER, PUTATIVE TUMOR SUPPRESSOR 1
8p21.3	DOK2	DOCKING PROTEIN 2 (P56(DOK-2)) (DOWNSTREAM OF TYROSINE KINASE 2)
8p21.3	RANBP16	RAN-BINDING PROTEIN 16
8p21.3	FGF17	FIBROBLAST GROWTH FACTOR-17 PRECURSOR (FGF-17)
8p21.3	BMP1	BONE MORPHOGENETIC PROTEIN 1 PRECURSOR (EC 3.4.24.19) (BMP-1)
8p21.3	PPP3CC	SERINE/THREONINE PROTEIN PHOSPHATASE 2B CATALYTIC SUBUNIT, GAMMA ISOFORM (EC 3.1.3.16)
8p21.2	RHOBTB2	RHO-RELATED BTB DOMAIN-CONTAINING PROTEIN 2 (DELETED IN BREAST CANCER 2 GENE PROTEIN) (P83).

8p21.2	TNFRSF10B	TUMOR NECROSIS FACTOR RECEPTOR SUPERFAMILY MEMBER 10B PRECURSOR (DEATH RECEPTOR 5)
8p21.2	TNFRSF10C	TUMOR NECROSIS FACTOR RECEPTOR SUPERFAMILY MEMBER 10C PRECURSOR (DECOY RECEPTOR 1)
8p21.2	TNFRSF10D	TUMOR NECROSIS FACTOR RECEPTOR SUPERFAMILY MEMBER 10D PRECURSOR (DECOY RECEPTOR 2)
8p21.2	TNFRSF10A	TUMOR NECROSIS FACTOR RECEPTOR SUPERFAMILY MEMBER 10A PRECURSOR (DEATH RECEPTOR 4)
8p21.2	NKX3-1	HOMEODOMAIN PROTEIN NKX-3.1
8p21.2	ADAM28	ADAM 28 PRECURSOR (EC 3.4.24.-) (A DISINTEGRIN AND METALLOPROTEINASE DOMAIN 28)
8p21.2	ADAMDEC1	DISINTEGRIN PROTEASE; ADAM-LIKE PROTEIN DECYSIN 1
8p21.2	ADAM7	ADAM 7 PRECURSOR (A DISINTEGRINMETALLOPROTEINASE DOMAIN 7)
8p21.2	EBF2	TRANSCRIPTION FACTOR COE2 (EARLY B-CELL FACTOR 2) (EBF-2) (FRAGMENT)
8p21.2	PPP2R2A	SERINE/THREONINE PROTEIN PHOSPHATASE 2A, 55 KDA REGULATORY SUBUNIT B
8p21.2	BNIP3L	BCL2/ADENOVIRUS E1B 19-KDA PROTEIN-INTERACTING PROTEIN 3 LIKE (NIP3L)
8p21.2	PTK2B	PROTEIN TYROSINE KINASE 2 BETA (EC 2.7.1.112) (FOCAL ADHESION KINASE 2) (FADK 2)
8p21.1	FZD3	FRIZZLED 3 PRECURSOR (FRIZZLED-3) (FZ-3) (HFZ3)
8p21.1	EXTL3	EXOSTOSIN-LIKE 3 (EC 2.4.1.-) (PUTATIVE TUMOR SUPPRESSOR PROTEIN EXTL3)

8p12

<i>Bande</i>	<i>HUGO ID</i>	Beschreibung
8p12	DUSP4	DUAL SPECIFICITY PROTEIN PHOSPHATASE 4, MAPKP 2(EC 3.1.3.48) (EC 3.1.3.16)
8p12	GTF2E2	TRANSCRIPTION INITIATION FACTOR IIE, BETA SUBUNIT (TFIIE-BETA)
8p12	WRN	WERNER SYNDROME HELICASE
8p12	NRG1	NEUREGULIN-1, SENSORY AND MOTOR NEURON-DERIVED FACTOR ISOFORM

11.3 Veröffentlichungen

11.3.1 Artikel in Fachzeitschriften

Reutzel D, Mende M, Naumann S, Störkel S, Brenner W, Zabel B, Decker J. Genomic imbalances in 61 renal cancers from the proximal tubulus detected by comparative genomic hybridization. *Cytogenet. Cell Genet.* 93, 221-227. (2001).

Naumann S, **Reutzel D**, Speicher M, Decker HJ. Complete karyotype characterization of the K562 cell line by combined application of G-banding, multiplex- fluorescence *in situ* hybridization, fluorescence *in situ* hybridization, and comparative genomic hybridization. *Leuk Res* 25 (2001) 313–322

Wimmer-Kleikamp S, **Reutzel D**, Lausch E, Brenner W, Zabel B, Decker HJ. Molecular genetic changes on chromosome 14q correlate with tumor progression and survival probability in clear cell and papillary renal cell carcinoma. In Vorbereitung (2003).

Reutzel D, Liehr T, Lausch E, Holl M, Brauch H, Dürr HR, Claussen U, Zabel B, Decker HJ. Molecular-cytogenetic characterization of a translocation t(3;8)(q13.1;p21.1) predisposing for clear cell carcinoma. In Vorbereitung (2003).

11.3.2 Kongressbeiträge

Naumann S, Speicher M, **Reutzel D**, Reifenrath C, Schroeck E, Fischer T, Huber C, Decker HJ: Genetic analysis of the chronic myelogenous leukemia-derived K562 cell line using G-banding, comparative genomic hybridization (CGH) and multiplex fluorescence *in situ* hybridization (M-FISH). *Ann Hematol* (1998) 77, suppl II: 508 (Seite 128).

Reutzel D, Naumann S, Puranakanitsha C, Weidt E, Löbbert R, Holl M, Brenner W, Zabel B, Huber C, Decker HJ: Comparative Genomic Hybridization, Cytogenetics and molecular studies on a Wilms tumor cell line, and epithelial renal tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 112(1) (1999); (Seite 93).

Naumann S, **Reutzel D**, Brieger J, Reifenrath C, Fischer T, Huber C, Decker HJ: Comparative genomic hybridization reveals a novel aspect of tumor cell type specific progression in blast crisis of chronic myelogenous leukemia. *Cytogenet Cell Genet* (1999); 85 (1-2): P318 (Seite 81).

Reutzel D, Naumann S, Kleikamp S, Mende M, Puranakanitstha C, Baak U, Gansen K, Brenner W, Huber Ch, Decker H.-J: Conventional cytogenetic, molecular cytogenetics (FISH, CGH, M-FISH) and LOH Studies on solid tumors – the combinational genetic characterization results in a highly complementary approach. *Cytogenet Cell Genet* (1999); 85 (1-2): P149 (Seite 42).

Naumann S, **Reutzel D**, Fischer T, Decker HJ: Investigation of three cases of chronic myelogenous leukemia (CML) with variant translocations by G-banding and fluorescence *in situ* hybridization (FISH). *Medizinische Genetik* (2000); 1: P-II-7.16

Reutzel D, Mende M, Kleikamp S, Baak U, Pranich C, Brenner W, Zabel B, Decker HJ: Chromosomal imbalances assessed by Comparative genomic Hybridization and LOH-studies of renal tumors. The Eighth Workshop on Chromosomes in solid Tumors, Tucson, AZ, (30.1.-1.2.2000).

Reutzel D, Brenner W, Zabel B, Decker J: Chromosomal imbalances assessed by Comparative Genomic Hybridization in 97 renal tumors. *Eur. J. Hum. Genet.* 9 (Supplement 1) (2001)(Seite 120).

Decker HJ, **Reutzel D**, Lausch E, Brauch H, Holl M, Zabel B: Familial renal cell carcinoma with novel 3;8 translocation. *Am. J. Hum. Genet.* 71(4) (2002) (Seite 222).

Decker HJ, **Reutzel D**, Wegener B, Holl M, Dürr HR, Brauch H, Zabel B: Hereditäre Nierentumoren – Ein familiärer Fall mit bisher nicht beschriebener Keimbahn-Translokation. 15. Tumorzytogenetische Arbeitstagung 25.-27.4. (2002) Schloss Hohenkammer

Reutzel D, Liehr T, Lausch E, Holl M, Düsterhöft S, Spangenberg C, Prawitt D, Naylor S, Brauch H, Decker HJ, Zabel B: Characterization of a Complex Chromosome 3 Rearrangement in Familial Renal Cell Carcinoma. *Medizinische Genetik* (2003) 3: Seite 338-339.

Wildhardt G, Trübenbach J, **Reutzel D**, Zabel B, Steinberger D, Decker HJ: Germline Mutations in the von Hippel-Lindau Tumorsuppressor Gene. *Medizinische Genetik* (2003) 3: Seite 295.

11.4 Lebenslauf

11.5 Auszeichnungen

Herbst 2002

Preisträger des Lina-Marguerite-Siebert Preises der
Kinderkrebsstiftung Mainz

11.6 Danksagung

11.7 Versicherung

Ich versichere hiermit, die vorliegende Arbeit selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt zu haben.

Mainz, den 12.September.2003

Dirk Reutzel