

Aus der  
Kinderchirurgischen Klinik und Poliklinik im Dr. von Haunerschen Kinderspital  
Klinik der Universität München  
Direktor: Prof. Dr. Oliver Muensterer

**Epigenetische Veränderungen an Genen  
des WNT/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs in  
Wilms-Tumoren**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Amei Katharina Karst

aus  
Pforzheim

Jahr  
2025

---

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Roland Kappler  
Mitberichterstatter: Prof. Dr. Dr. Fabian Hauck  
Prof. Dr. Stephan Kellnar

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Prof. Dr. Jochen Hubertus

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 15.05.2025

**Meinem Mann und meinen Eltern in großer Dankbarkeit**

## Verzeichnis

<b>Verzeichnis</b> .....	<b>I</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>IV</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Klinik</b> .....	<b>1</b>
1.1.1 Geschichte und Epidemiologie .....	1
1.1.2 Pathogenese und Histologie .....	1
1.1.3 Symptome und assoziierte Fehlbildungen.....	3
1.1.4 Diagnose und Differentialdiagnosen .....	4
1.1.5 Stadieneinteilung.....	5
1.1.6 Therapie .....	7
1.1.7 Prognose und Spätfolgen .....	8
<b>1.2 Molekulargenetische Aspekte</b> .....	<b>9</b>
1.2.1 Genetik.....	9
1.2.2 Epigenetik .....	10
<b>1.3 WNT/<math>\beta</math>-Catenin-Signalweg</b> .....	<b>13</b>
1.3.1 Überblick über den Signalweg .....	13
1.3.2 <i>SFRP</i> .....	14
<b>2 Zielsetzung der Arbeit</b> .....	<b>16</b>
<b>3 Materialien</b> .....	<b>17</b>
<b>3.1 Patienten- und Patientinnenkollektiv und Probengewinnung</b> .....	<b>17</b>
<b>3.2 Enzyme</b> .....	<b>18</b>
<b>3.3 Längenstandard</b> .....	<b>18</b>
<b>3.4 Primer</b> .....	<b>19</b>
<b>3.5 Kits</b> .....	<b>20</b>
<b>3.6 Chemikalien und Reagenzien</b> .....	<b>20</b>
<b>3.7 Verbrauchsmaterialien</b> .....	<b>21</b>
<b>3.8 Geräte</b> .....	<b>21</b>
<b>3.9 Software</b> .....	<b>22</b>
<b>4 Methoden</b> .....	<b>23</b>
<b>4.1 Genexpressionsanalyse</b> .....	<b>23</b>
4.1.1 RNA-Isolation.....	23
4.1.2 Konzentrationsbestimmung der RNA .....	24

4.1.3	cDNA-Synthese .....	24
4.1.4	Quantitative real-time-PCR.....	25
<b>4.2</b>	<b>Sequenzierung .....</b>	<b>27</b>
4.2.1	DNA-Isolation.....	27
4.2.2	Gelelektrophorese .....	27
4.2.3	DNA-Extraktion aus Gel.....	28
4.2.4	Sanger-Sequenzierung .....	29
<b>4.3</b>	<b>DNA-Methylierungsanalyse .....</b>	<b>30</b>
4.3.1	Bisulfit-Konversion der DNA .....	30
4.3.2	PCR.....	31
4.3.3	Pyrosequenzierung.....	32
<b>4.4</b>	<b>Statistik .....</b>	<b>34</b>
<b>5</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>35</b>
<b>5.1</b>	<b>Expressionsanalyse für <i>AXIN2</i>.....</b>	<b>35</b>
<b>5.2</b>	<b><i>CTNNB1</i> .....</b>	<b>36</b>
5.2.1	Mutationsanalyse für <i>CTNNB1</i> .....	36
5.2.2	<i>AXIN2</i> -Expression in <i>CTNNB1</i> -mutierten und nicht mutierten WT .....	36
<b>5.3</b>	<b><i>APC</i>.....</b>	<b>37</b>
5.3.1	Methylierungsanalyse für <i>APC</i> .....	37
5.3.2	Expressionsanalyse für <i>APC</i> .....	37
5.3.3	Korrelation <i>APC</i> -Expression mit <i>AXIN2</i> -Expression.....	37
<b>5.4</b>	<b><i>SFRP1, 2, 4, 5</i>.....</b>	<b>39</b>
5.4.1	Expressionsanalyse für <i>SFRP1</i> .....	39
5.4.2	<i>SFRP2, 4, 5</i> .....	39
5.4.3	Methylierungsanalyse für <i>SFRP1</i> .....	40
5.4.4	Korrelation <i>SFRP1</i> -Expression mit <i>AXIN2</i> -Expression.....	42
<b>5.5</b>	<b>Statistische Analyse der Expressions- und Mutationsergebnisse in Bezug auf die Histologie.....</b>	<b>43</b>
5.5.1	<i>AXIN2</i> -Expression und Histologie .....	43
5.5.2	<i>SFRP1</i> -Expression und Histologie.....	47
5.5.3	<i>CTNNB1</i> -Mutation und Histologie .....	48
<b>5.6</b>	<b>Statistische Analyse der Expressions- und Mutationsergebnisse in Bezug auf die klinischen Parameter .....</b>	<b>49</b>
5.6.1	<i>AXIN2</i> -Expression und klinische Parameter .....	49
5.6.2	<i>SFRP1</i> -Expression und klinische Parameter .....	53
<b>6</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>55</b>

6.1	Ursachen der <i>AXIN2</i> -Überexpression .....	56
6.2	Zusammenhänge zwischen den Expressions-/ Mutationsergebnissen und den histologischen und klinischen Ausprägungen .....	60
6.3	Weiterführende Forschungsansätze und Ausblick.....	62
6.4	Schlussfolgerung.....	64
7	Zusammenfassung .....	66
8	Abstract .....	68
9	Abbildungsverzeichnis .....	70
10	Tabellenverzeichnis .....	71
11	Literaturverzeichnis .....	72
12	Wissenschaftliche Beiträge .....	77
13	Danksagung.....	78
14	Anhang .....	79

## Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
APC	engl.: Adenomatous-Polyposis-Coli
bp	<b>Basenpaare</b>
Ca	engl.: <b>Carcinoma</b>
cDNA	engl.: complementary <b>DNA</b>
CK1	<b>Casein-Kinase-1</b>
COG	<b>Cildren's Oncology Group</b>
CT	<b>Computertomographie</b>
ddH <sub>2</sub> O	bidestilliertes Wasser
DK	<b>Destruction-Komplex</b>
DKK	<b>Dickkopf-Proteine</b>
dsDNA	<b>doppelsträngige DNA</b>
EtBr	<b>Ethidiumbromid</b>
Fz	engl.: <b>Frizzle</b>
GSK-3β	<b>Glykogen-Synthase-Kinase-3β</b>
h	engl.: <b>hour</b>
i.v.	<b>intravenös</b>
TCF/LEF	<b>T-Cell-Factor/Lymphoid-Enhancer-Factor</b>
LOH	engl.: loss of <b>heterozygosity</b>
LRP	engl.: <b>Lipoprotein-Receptor-Related-Protein</b>
min	<b>Minute</b>
ml	<b>Milliliter</b>
MRT	<b>Magnetresonanztomographie</b>
ng	<b>Nanogramm</b>
nm	<b>Nanometer</b>
PCR	engl.: <b>polymerase chain reaction</b>
PP2A	<b>Protein-Phosphatase-2A</b>
PPi	<b>Pyrophosphat</b>
qPCR	engl.: <b>quantitative polymerase chain reaction</b>
RNA	engl.: <b>ribonucleid acid</b>
rpm	engl.: rounds <b>per minute</b>

RT	<b>Raumtemperatur</b>
SCF	<b>Skp1/Cullin/F-box-Komplex</b>
SD	engl.: <b>Standard deviation</b>
sec	engl.: <b>second</b>
SFRP	engl.: <b>secreted-frizzled-related-proteins</b>
SIOP	franz.: <b>Société Internationale d'Oncologie Pédiatrique</b>
ssDNA	engl.: <b>single strand DNA</b>
TBP	<b>TATA-Binding-Box-Protein</b>
WIF1	<b>Wnt-Inhibitory-Factor 1</b>
Wnt	engl.: <b>wingless</b>
WT	<b>Wilms-Tumor</b>
WT1	<b>Wilms-Tumor-Gen 1</b>
$\beta$ -TrCP	engl.: <b><math>\beta</math>-Tranducin-repeat-Containing-Protein</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Klinik

### 1.1.1 Geschichte und Epidemiologie

Der Wilms-Tumor (WT) ist nach dem deutschen Chirurgen Max Wilms benannt worden, der 1899 in seiner Monografie „Die Mischgeschwülste der Niere“ seine Untersuchungen zu Tumoren der Niere niedergeschrieben hat. Darin hat er als Erster die sich morphologisch unterscheidenden Tumoren zu einer Einheit zusammengefasst und deren gemeinsame Entstehung in einer fehlerhaften Embryogenese gesehen [1].

Er hat damit den auch heute noch häufigsten pädiatrischen Nierentumor beschrieben, der insgesamt 5 % aller malignen Tumoren bei Kindern vor dem Erreichen des 15. Lebensjahres ausmacht [2].

Die Inzidenz liegt bei 1:100.000 Kindern [3, 4]. Mädchen sind geringfügig häufiger betroffen als Jungen und auch ca. sechs Monate älter bei Diagnosestellung [5]. 70-75 % der WT-Fälle werden vor dem Erreichen des fünften Lebensjahres diagnostiziert, wobei es einen Peak im zweiten Lebensjahr gibt. Eine Ausnahme bilden hierbei die bilateralen Tumoren, die durchschnittlich früher entdeckt werden, jedoch nur mit einem Anteil von 3-6 % aller WT vorkommen [3]. Die meisten WT treten sporadisch auf und in nur 1 % der Fälle kann ein familiärer Zusammenhang festgestellt werden [6].

### 1.1.2 Pathogenese und Histologie

Es wird vermutet, dass WT-Zellen aus embryonalen Zellen hervorgehen, den sogenannten nephrogenen Resten. Dies sind prämaligne Läsionen innerhalb der Niere und sind in der normalen Entwicklung nur pränatal, während der Nephrogenese vorhanden. Bei resezierten, unilateralen WT können sie jedoch in bis zu 40 % der Fälle auch postnatal nachgewiesen werden. In bilateralen WT ist diese Zahl sogar noch deutlich höher. Außerdem sind Patienten und Patientinnen, bei denen nephrogene Reste gefunden werden, deutlich jünger bei Diagnosestellung [7]. Die nephrogenen Reste weisen eine hohe Rate an mitotischer Teilung auf und werden als Vorstufe des WT gesehen, die bei Persistenz entarten können. Man teilt sie nach ihrer Lokalisation innerhalb des Nierenlappens in intralobäre und perilobäre Reste ein. Intralobäre Reste befinden sich eher einzeln und zufällig verteilt im Inneren der Nierenlappen. Sie entstehen schon früh in der Entwicklung und sind unscharf vom gesunden Gewebe abgegrenzt. Perilobäre Reste entwickeln sich eher später und am Rande der Nierenlappen. Meist findet man sie gruppiert vor und sie sind scharf abgrenzbar. Gibt es innerhalb der Niere multiple, diffus verteilte nephrogene Reste, spricht man von einer Nephroblastomatose [8].

Aufgrund der Pathogenese können im WT alle Stufen der nephrogenen Differenzierung vorkommen. Es lassen sich häufig primitive blastemale Zellen finden, die den embryonalen Zellen am ähnlichsten sind. In diesen Bereichen überlagern sich hyperchrome, oval bis rundliche Kerne und häufig sind verschiedene Mitosefiguren erkennbar. Dagegen sind die epithelialen Zellen differenzierter und bilden tubuläre, rosettenartige Strukturen. WT mit stromaler Histologie stellen sich äußerst heterogen dar. Es können hypozelluläre Bereiche mit locker verteilten oder sternförmigen Zellen auftauchen sowie dicht gepackte spindelförmige Zellen. Auch werden darin nicht selten Muskelfasern, Fett- oder auch Knorpelgewebe gefunden [9]. Die meisten WT sind Mischtumoren, die eine triphasische Histologie mit unterschiedlich großen blastemalen, epithelialen und stromalen Anteilen aufweisen. Jedoch gibt es auch WT mit biphasischer oder monomorpher Histologie [10]. Sobald eine Komponente mehr als 65 % des Tumors bildet wird der Tumor nach dieser Zellart benannt.

In 5-10 % der Tumoren lassen sich außerdem anaplastische Zellen finden [2]. Diese können in allen zuvor beschriebenen Komponenten vorkommen und stellen ein wichtiges Kriterium in Hinblick auf Therapie und Prognose dar. Eine Anaplasie ist gekennzeichnet durch Zellen mit vergrößertem, hyperchromem Zellkern und polyploiden, mitotischen Figuren [11]. Es wird zwischen fokaler und diffuser Anaplasie unterschieden. Fokale anaplastische Bereiche beschränken sich auf einen oder wenige gut abgrenzbare Bereiche innerhalb des Tumors, wohingegen diffuse Anaplasien auch außerhalb der Tumorgrenze auftreten können.

Je nach Therapieschema wird der WT vor der histologischen Untersuchung chemotherapeutisch behandelt. Dann lässt sich außerdem regressives oder nekrotisches Gewebe finden [9].

Die Histologie des WT hat prognostisch eine hohe Aussagekraft. Deshalb teilt man sie in Gruppen mit niedriger, intermediärer und hoher Malignität ein (Tabelle 1). Unterschieden wird hierbei, ob vor der Nierenresektion eine Chemotherapie stattgefunden hat oder nicht. So zählt der blastemale Typ bei primär resezierten Tumoren in die intermediäre Risikogruppe, wobei nach präoperativer Chemotherapie von hoher Malignität gesprochen wird. Dies ist damit zu begründen, dass die Blasten aufgrund ihrer hohen Teilungsrate meist gut auf die Chemotherapie ansprechen. Persistieren sie nach der chemotherapeutischen Behandlung, kann dies bedeuten, dass sie Resistenzen bilden und schwerer zu therapieren sind [9].

Tabelle 1: Klassifikation und Risikostratifizierung des Nephroblastoms entsprechend der S1-Leitlinie [4]

	<b>Histologie der Tumoren nach präoperativer Chemotherapie</b>	<b>Histologie der primär resezierten Tumoren</b>
<b>niedrige Malignität</b>	zystisch, partiell differenziert komplett nekrotisch	zystisch, partiell differenziert
<b>intermediäre Malignität</b>	epithelialer Typ stromaler Typ Mischtyp regressiver Typ fokale Anaplasie	blastemaler Typ epithelialer Typ stromaler Typ Mischtyp regressiver Typ fokale Anaplasie
<b>hohe Malignität</b>	blastemaler Typ diffuse Anaplasie	diffuse Anaplasie

### 1.1.3 Symptome und assoziierte Fehlbildungen

Die meisten WT bleiben sehr lange asymptomatisch und fallen zunächst als abdominale Schwellung auf. In ca. 11 % der Fälle werden die Tumoren durch Palpation während Vorsorgeuntersuchungen festgestellt. Nur in 25 % der Fälle treten Schmerzen und in 18 % Hämaturie als Erstsymptom der Tumorerkrankung auf [12, 13]. Zusätzlich wird bei einem Viertel der Patienten und Patientinnen über Gewichtsverlust, Übelkeit und Erbrechen, allgemeines Unwohlsein oder einer Mischung aus diesen Symptomen berichtet. Es kann außerdem in 25 % der Fälle ein Hypertonus festgestellt werden [14].

1964 haben Miller et al. zum ersten Mal einen Zusammenhang zwischen WT und kongenitalen Anomalien, wie zum Beispiel Aniridie, Hemihypertrophie und genitalen Fehlbildungen hergestellt [15]. Weitere Assoziationen gibt es zwischen dem WT und einigen Syndromen, wie dem WAGR-Syndrom, dem Denys-Drash-Syndrom und dem Beckwith-Wiedemann-Syndrom. Ihre Häufigkeit unter WT-Patienten und -Patientinnen ist in Tabelle 2 dargestellt. Diese Kinder werden bei Diagnose der Symptome routinemäßig auf das Vorhandensein eines WT untersucht, um mögliche Malignitäten möglichst früh diagnostizieren und behandeln zu können. Insgesamt sind zwischen 8-17 % der WT-Patienten und -Patientinnen von solchen Anomalien betroffen [16].

Tabelle 2: assoziierte Fehlbildungen bei WT-Erkrankten [17, 18]

<b>assoziierte Fehlbildungen</b>	<b>Symptome</b>	<b>Häufigkeit unter WT-Betroffenen</b>	<b>Risiko eines zusätzlichen Wilms-Tumors</b>
<b>WAGR-Syndrom</b>	WT, Aniridie, Genitalfehlbildungen, mentale Retardierung	1-2 %	hoch
<b>Denys-Drash-Syndrom</b>	WT, Pseudohermaphroditismus, Glomerulopathie	2 %	hoch
<b>Beckwith-Wiedemann-Syndrom</b>	WT, Omphalozele, Makroglossie, Hemihypertrophie,	0,5 %	moderat
<b>Aniridie</b>	inkomplettes bis komplettes Fehlen der Iris	1 %	
<b>urogenitale Fehlbildungen</b>	z.B. Nierendysplasien, Hufeisenniere, Doppelnieren, Hodenaplasie, Hypospadie, Kryptorchismus	4-8 %	gering

#### 1.1.4 Diagnose und Differentialdiagnosen

Zur Diagnostik des WT werden eine Anamnese und eine körperliche Untersuchung durchgeführt. Es schließt sich die Labordiagnostik mit Differentialblutbild, Elektrolyten, Nieren- und Leberwerten an. Außerdem werden die Katecholamine im Urin zum Ausschluss eines Neuroblastoms untersucht, eine der wichtigsten Differentialdiagnosen des Nephroblastoms [10].

Obligat für die Diagnosestellung sind bildgebende Verfahren. Als erste Wahl dient hier die Abdomen-Sonographie, bei der beide Nieren vermessen und auf mögliche nephrogene Reste und andere Anomalien in drei Ebenen überprüft werden. Außerdem wird auf Organmetastasen und Thromben, vor allem der Vena renalis und Vena cava, untersucht. Als weiterführende Diagnostik wird die abdominelle Magnetresonanztomographie (MRT) mit intravenöser (i.v.) Kontrastmittelgabe empfohlen. Falls diese nicht zugänglich ist oder eine Kontraindikation besteht, gilt die Computertomographie (CT) mit i.v. Kontrastmittelgabe als Alternative. Da die Diagnose primär durch die Bildgebung gestellt wird, sollte sie sehr sorgfältig durchgeführt

werden und eine referenzradiologische Beurteilung erfolgen. Die Rate der Fehldiagnosen lag laut Tournade et al. 2001 bei 7 % [19]. Zum Ausschluss von Lungenmetastasen wird außerdem eine Röntgendiagnostik des Thorax in zwei Ebenen durchgeführt. Bei neurologischen Auffälligkeiten ist zur Abklärung möglicher zerebraler Metastasierungen zusätzlich eine MRT des Schädels indiziert.

Eine histopathologische Untersuchung in Form einer Feinnadelbiopsie ist bei Kindern > 6 Monate und < 16 Jahren nicht indiziert. Diese erfolgt nach Tumorresektion zur Diagnosesicherung [4].

Neben dem Neuroblastom gibt es noch einige weitere pädiatrische Tumoren, die als Differentialdiagnosen beachtet werden sollten. Diese sind in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: Differentialdiagnosen des WT [20, 21]

	<b>Alter bei Diagnose</b>	<b>Häufigkeit</b>
<b>WT</b>	<15 Jahre	85 %
<b>Klarzellsarkom</b>	< 10 Jahre	3 %
<b>mesoplastisches Nephrom</b>	Kongenital	2-3 %
<b>Nierenzellkarzinom</b>	>11 Jahre	5 %
<b>Rhabdoid Tumor</b>	<1 Jahr	2 %

### 1.1.5 Stadieneinteilung

WT werden neben ihrer histologischen Klassifikation auch nach ihrer morphologischen Ausbreitung eingeteilt. Hierbei geht es darum, ob nur eine oder beide Nieren befallen sind und ob bereits eine Metastasierung vorliegt.

Die Children's Oncology Group (COG) in Nordamerika und die International Society of Paediatric Oncology (SIOP) in Europa haben dabei zwei verschiedene Staging-Systeme entwickelt, basierend auf ihren jeweiligen Therapieschemata. Beide Konzepte sind jedoch gleich erfolgreich in der Behandlung [22]. Der größte Unterschied liegt im Zeitpunkt der Chemotherapie. Im COG-Schema steht primär die Resektion, das Staging findet also vor der Chemotherapie statt. Dagegen bevorzugt die SIOP eine präoperative Chemotherapie, weswegen

die betroffenen Kinder zum Staging-Zeitpunkt schon eine Behandlung erhalten haben [23]. Die beiden Staging-Protokolle sind in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4: Staging-Schemata [23]

<b>Stage</b>	<b>COG-Staging (vor Chemotherapie)</b>	<b>SIOP-Staging (nach Chemotherapie)</b>
<b>I</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>a) Tumor auf Niere beschränkt und vollständig reseziert</li> <li>b) keine Tumorrupitur</li> <li>c) maximale Involvierung in die Nierensinusgefäße von 2 mm</li> <li>d) kein Residualtumor</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>a) Tumor auf Niere beschränkt und vollständig reseziert</li> <li>b) Tumor kann sich in Nierenbecken einwölben</li> <li>c) keine Involvierung der Nierensinusgefäße</li> <li>d) Nierenvenen können infiltriert sein</li> </ul>
<b>II</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>a) Tumor nicht auf Niere beschränkt, aber vollständig reseziert</li> <li>b) kein Residualtumor</li> <li>c) Tumorthrombus außerhalb der Niere, en Bloc Resektion mit Tumor</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>a) Tumor nicht auf Niere beschränkt, aber vollständig reseziert</li> <li>b) Infiltration des Nierensinus oder der Blut-/Lymphgefäße außerhalb des Nierenparenchyms, aber ist vollständig reseziert</li> <li>c) Infiltration benachbarter Organe, der Vena cava, aber vollständig reseziert</li> </ul>
<b>III</b>	Residualtumor auf Abdomen beschränkt: <ul style="list-style-type: none"> <li>a) Tumor in Lymphknoten paraaortal, im Nierenhilus oder außerhalb</li> <li>b) diffuse peritoneale Tumorzellen</li> <li>c) Tumorzellen auf Peritonealoberfläche</li> <li>d) Tumorausbreitung über Resektionsränder</li> <li>e) kein vollständig resezierbarer Tumor</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>a) unvollständige Tumorsektion</li> <li>b) Involvierung abdominaler Lymphknoten</li> <li>c) Tumorrupitur</li> <li>d) Tumor durchbricht Peritonealoberfläche</li> <li>e) Tumorthromben</li> <li>f) Biopsie vor Operation</li> </ul>
<b>IV</b>	hämatogene Metastasen, Lymphknotenmetastasen extraabdominal	hämatogene Metastasen, Lymphknotenmetastasen extraabdominal, -pelvical
<b>V</b>	bilateral	bilateral

### 1.1.6 Therapie

Wie schon in 1.1.5 erwähnt werden Kinder mit WT je nach Land gemäß unterschiedlicher Therapieprotokolle behandelt. Grundsätzlich wird jeder WT transperitoneal radikal reseziert. Außerdem werden die ipsilateralen lokalen Lymphknoten für die histologische Untersuchung mitentfernt. Die SIOP lässt allen betroffenen Kinder, die älter als 6 Monate sind, eine präoperative Chemotherapie zukommen [24]. Dies hat den Vorteil, dass der Tumor vor der Operation schon an Größe und Masse verliert, das Blutungs- und Rupturrisiko vor und während der Resektion sinkt und eine bessere Zugänglichkeit für den Operateur geschaffen wird, der meist auch nephronsparender reseziieren kann. Außerdem kann der Erfolg der Chemotherapie direkt in-vivo beurteilt werden [18].

Im Gegensatz dazu werden betroffenen Kindern nach dem COG-Schema primär operativ behandelt und erst dann einer Chemotherapie unterzogen. Kinder < 2 Jahre im Stadium I und mit einer günstigen Histologie des WT (niedriges bis intermediäres Risiko), deren Tumor <550 g wiegt, werden nach diesem Protokoll auch postoperativ nicht chemotherapeutisch behandelt. Das COG-Schema bietet den Vorteil, dass die Diagnose durch histologische Untersuchungen schneller gesichert werden kann und auch das Staging früher stattfindet. Damit kann Patienten und Patientinnen mit geringem histologischem Risiko eine unnötige Chemotherapie erspart werden [18].

In beiden Protokollen werden die gleichen Chemotherapeutika verwendet. In Stadium I und II mit günstiger Histologie werden Vincristin und Actinomycin-D verwendet. In Stadium III kommt im COG-Schema noch Doxorubicin hinzu. In Stadium II-IV mit hohem histologischem Risiko wird jeweils eine vierfache Kombination verwendet, die komplettiert werden kann durch Cyclophosphamid, Ifosfamid, Carboplatin oder Etoposid. Hinzu kommt eine Radiatio. Bei bilateralen Tumoren des Stadiums V wird immer mit einer neoadjuvanten Chemotherapie mit Vincristin, Actinomycin-D und evtl. Doxorubicin für 6-12 Wochen therapiert.

Die Operation wird außerdem soweit möglich, nephronschonend durchgeführt, um einer Dialysepflichtigkeit entgegenzuwirken [24].

Die Nachsorgeuntersuchungen bestehen aus Abdomen-Sonographien und werden vor allem betroffenen Kindern mit einem erhöhten Risiko empfohlen. Dazu zählen Kinder, bei denen in der genetischen Untersuchung Mutationen, das Beckwith-Wiedemann-Syndrom vorliegen oder familiäre Häufungen bekannt sind. Die Sonographie findet hierbei alle drei Monate statt [24].

### 1.1.7 Prognose und Spätfolgen

Dank der guten Therapiemöglichkeiten liegt die 5-Jahres-Überlebensrate bei über 90%. Dies hängt jedoch stark von der Histologie und vom Stadium des Tumors ab (Tabelle 5).

Ca. 1 % der unilateralen WT entwickeln kontralateral ein Rezidiv, Kinder mit bilateralem Tumor sogar in bis zu 10 % der Fälle [25]. Die meisten dieser Rezidive treten innerhalb 24 Monate nach Beendigung der Therapie auf. Das ist besonders schwerwiegend, da bei auftretenden Rezidiven die Überlebensrate auf nur 50 % zurückgeht. Bei betroffenen Kindern mit anaplastischer oder blastemaler Histologie des Rezidivs sogar auf nur 10 % [26, 27].

Chronische Spätfolgen, verursacht durch Chemotherapie oder Bestrahlung, können bei bis zu 25 % der Patienten und Patientinnen im Erwachsenenalter nachgewiesen werden [28]. Am häufigsten sind dabei kongestive Herzinsuffizienz, Auftreten von Zweittumoren und chronisches Nierenversagen. Dies tritt vor allem bei betroffenen Kindern mit beidseitigen WT oder mit kongenitalen Fehlbildungen auf. Die Zahl hat sich jedoch in den letzten Jahren durch den differenzierten Einsatz von Chemotherapeutika und nephronschonenden Operationen deutlich verbessert [18, 25].

Weitere Spätfolgen können Hypertonus, muskuloskelettale Probleme, das Metabolische Syndrom oder beeinträchtigte Fruchtbarkeit sein [28].

Tabelle 5: 5-Jahresüberleben und 2-Jahre-Eventfreies Überleben [28]

Histopathologie	Stage I	Stage II	Stage III	Stage IV	alle
<b>niedriges Risiko</b>					
- 5-J.-Überleben	99 %	100 %	100 %	94 %	98 %
- 2 Jahre ohne Spätfolgen	97 %	100 %	100 %	91 %	95 %
<b>intermediäres Risiko</b>					
- 5-J.-Überleben	98 %	97 %	94 %	89 %	96 %
- 2 Jahre ohne Spätfolgen	92 %	89 %	88 %	81 %	89 %
<b>hohes Risiko</b>					
- 5-J.-Überleben	97 %	82 %	70 %	35 %	76 %
- 2 Jahre ohne Spätfolgen	91 %	84 %	68 %	31 %	74 %
<b>alle</b>					
- 5-J.-Überleben	98 %	94 %	90 %	82 %	93 %
- 2 Jahre ohne Spätfolgen	92 %	88 %	84 %	76 %	87 %

## 1.2 Molekulargenetische Aspekte

Schon seit den 1970er Jahren ist nach genetischen Ursachen für die Entstehung von WT gesucht worden. Knudson et al. haben 1972 eine „Two-Hit“-Hypothese zur Kanzerogene entwickelt, zuerst anhand des Retinoblastoms, die sie dann auch auf den WT übertragen haben. Diese besagt, dass zur Entstehung eines malignen Tumors zwei Mutationen stattfinden müssen. Die erste Mutation kann hierbei schon in der Keimbahn auftreten oder auch später als somatische de-novo Mutation. Die zweite Mutation muss jedoch als sporadische Mutation postzygot auftreten. Dies erklärt, warum z.B. familiäre WT bei Kindern schon in früherem Alter auftreten. Ein Allel ist kongenital verändert und im Laufe der ersten Lebensmonate bedarf es nur noch der Veränderung des anderen Allels [29].

Diese These ist schon bald widerlegt worden, da mehrere Mutationen verschiedener Gene und auch epigenetische Modifikationen in WT gefunden worden sind. Außerdem ist über Tumoren berichtet worden, bei denen nur ein Allel eine Mutation aufgewiesen hat [30, 31]. Die genetische Basis der WT-Entstehung scheint sehr heterogen und komplex zu sein. Deshalb ist sie bis heute noch nicht im Detail verstanden.

### 1.2.1 Genetik

Mutationen im WT können sowohl die Keimbahn betreffen als auch somatisch auftreten. Sie können entweder auf nur einem Allel oder auch auf beiden mutiert sein, was als „loss of heterozygosity“ (LOH) bezeichnet wird [32]. Die Frequenz solcher Genomveränderungen ist jedoch nicht sehr hoch. Es ist dennoch wichtig den Locus solcher Tumorgene zu identifizieren, um mögliche klinische Zusammenhänge ableiten zu können. 1990 konnten Call et al. zum ersten Mal ein spezifisches Gen, welches sie *Wilms-Tumor-Gen 1 (WT1)* nannten, genau lokalisieren und identifizieren. Das Tumorsuppressorgen liegt am Genlocus 11p13 und codiert für ein Zinkfingerprotein [33]. Es ist in ca. 12-18 % der WT mutiert und häufig mit dem Auftreten des WAGR- oder des Denys-Drash-Syndroms assoziiert. Insgesamt weisen 82 % der WT-Patienten und -Patientinnen mit urogenitalen Anomalien oder Nierenversagen eine Mutation des *WT1* auf [32, 34, 35].

Ein weiteres Tumorsuppressorgen, das *Wilms-Tumor-Gen auf dem x-Chromosom (WTX)* wurde erst 2007 identifiziert und ist in bis zu 32 % der Fälle mutiert [35-37]. Dieses Gen liegt auf dem x-Chromosom. Bei weiblichen WT-Patienten und -Patientinnen ist bei Heterozygotie immer das aktive x-Chromosom von der Mutation befallen [36]. Es wurde später nach seiner Funktion umbenannt in *APC-Membran-Rekrutierungsprotein (AMER1)* [38]. *AMER1* codiert für ein Gen, welches den sogenannten WNT/ $\beta$ -Catenin-Signalweg negativ reguliert [39]. Es gibt jedoch Zweifel an einer kausalen Rolle von *AMER1* an der WT-Entwicklung [40].

In < 5 % der WT ist auch *Tp53* betroffen, welches für das Protein p53 codiert und allgemein in Tumoren das am häufigsten mutierte Gen darstellt [41]. Die *Tp53*-Mutation wird mit diffuser Anaplasie assoziiert und damit auch mit einer eher schlechten Prognose für Betroffene [42].

Weitere Gene, die in Zusammenhang mit WT gebracht werden, sind *MYCN*, *SIX1*, *SIX2*, *DROSHA* und *DGCR8*, welche jedoch mit Mutationsraten von jeweils <5 % nur sehr selten vorkommen [43-45].

Das dritte Gen neben *WT1* und *AMER1*, welches in mehr als 10 % der WT-Fälle Auffälligkeiten im Genom aufweist ist *CTNNB1*. Es codiert für das Protein  $\beta$ -Catenin, welches an der Zelladhäsion beteiligt ist und im Rahmen des WNT/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs als Transkriptionsfaktor reguliert wird [46]. Mutationen in diesem Gen sind in vielen Tumoren, wie dem Hepatoblastom, Prostata-, Endometrium- und Ovarial-Karzinom, Melanom und auch in geringer Zahl im Kolon-Karzinom, beschrieben [47]. Im WT kommen sie mit einer Häufigkeit von 12-15 % vor und sind häufig assoziiert mit *WT1*-Mutationen [35, 48, 49]. Meist lassen sich intralobäre nephrogene Reste im Tumor finden und es wird angenommen, dass die Mutation im *WT1* ein frühes Event darstellt, welches zur Entstehung der intralobären Reste führt, während die *CTNNB1*-Mutationen erst später entstehen und dann nur in den entarteten WT-Zellen zu finden sind [50]. Die Mutation des *CTNNB1* ist meist auf Exon 3 zu finden [51]. Ein deutlicher kleinerer Teil der Mutationen betrifft Exon 7-9 [38].

### 1.2.2 Epigenetik

Die Entstehung von ca. 30 % der WT lassen sich durch eine Mutation in *WT1*, *AMER1*, *CTNNB1* und anderen Genen erklären [36, 37]. Weitere Ursachen der Tumorgenese sind im Laufe der Zeit in epigenetischen Modifikationen vermutet worden. Als epigenetische Veränderungen bezeichnet man vererbare Modifikationen der Chromosomen, die ohne eine Veränderung der DNA-Sequenz einhergehen. Sie sind also im Phänotyp, nicht aber im Genotyp sichtbar.

Solche Mechanismen sind z.B. die Methylierung bestimmter regulierender Genabschnitte oder Histonmodifikationen. Histone verhindern die Expression von Genen durch Kondensation der DNA [40]. Durch diese Modifikationen werden z.B. genomisch geprägte Gene reguliert. Das sind Gene, die nur uniparental, also entweder vom mütterlichen oder vom väterlichen Allel exprimiert werden, während das jeweils andere Allel „ausgeschaltet“ ist. Dieser Mechanismus ist in der Embryonalentwicklung von großer Bedeutung und eine fehlerhafte Regulation kann eine Tumorentstehung begünstigen oder verursachen [52]. Genomisch geprägte Gene liegen oft in Clustern mit einer gemeinsamen Regulationsstelle zur Steuerung ihrer Expression vor.

Ein weiterer Mechanismus zur Steuerung der Expression stellt die DNA-Methylierung dar [53]. Hierbei werden Cytosine, die vor einem Guanin innerhalb der DNA liegen durch die

DNA-Methyltransferase zu 5-Methylcytosin umgewandelt (Abbildung 1). Solche Cytosin-Guanin-Dinukleotide kommen in hoher Dichte in regulatorischen Regionen vor und werden CpG-Inseln genannt. Ist eine CpG-Insel methyliert, können Transkriptionsfaktoren die DNA-Sequenz nicht binden und die zugehörigen Gene werden nicht exprimiert. Die DNA-Methylierung ist jedoch reversibel, wodurch eine variable Steuerung der Genexpression in der Zelle ermöglicht wird.

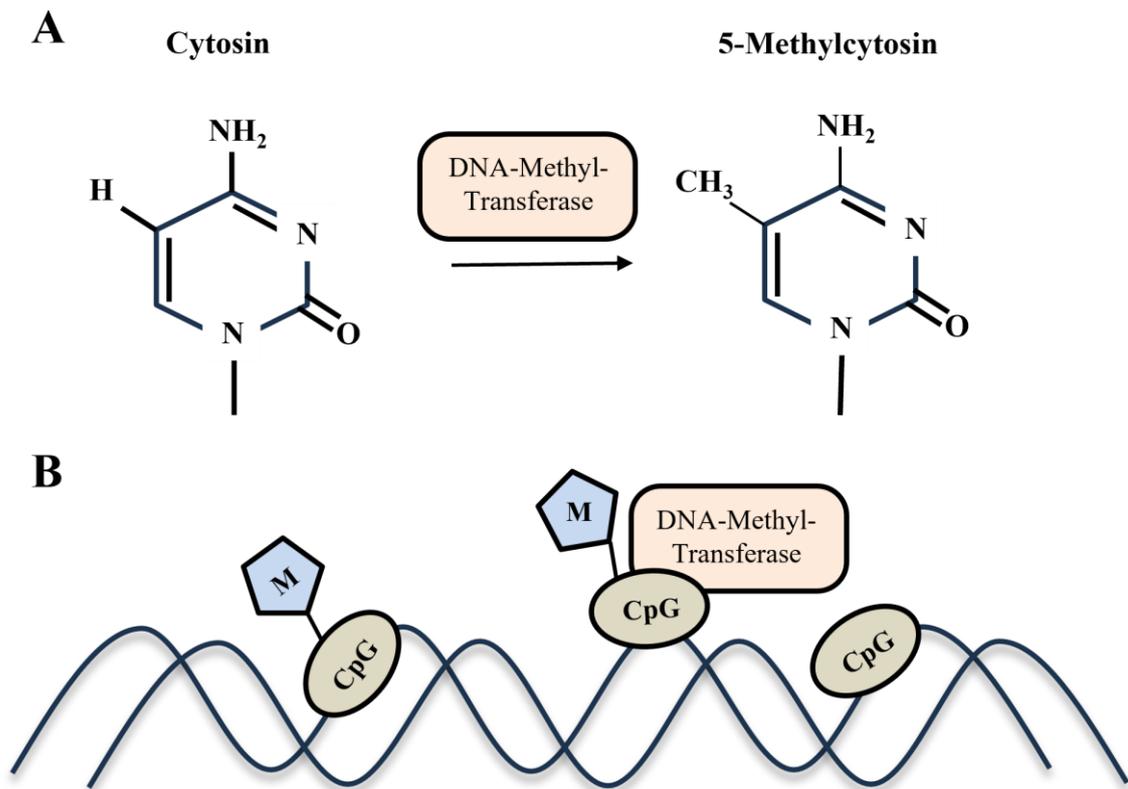


Abbildung 1: Schematische Darstellung der DNA-Methylierung, modifiziert nach [54].

A) Durch die Methyltransferase wird an der 5. Position des Cytosins eine Methylgruppe angehängt.

B) CG-Dinukleotide (CpG) in regulatorischen Regionen von Genen können reversibel durch die Methyltransferase methyliert werden (M). Das Gen kann so deaktiviert werden.

Die erste epigenetische Veränderung im WT haben Scott et al. 1985 beschrieben. Sie haben eine Überexpression des *Insulin-like-growth-factor2* (*IGF2*) nachgewiesen, welches mit *H19* in einem Cluster (*H19DMR*) liegt und simultan reguliert wird [55]. Normalerweise ist das väterliche Allel am *H19DMR* methyliert. Dann wird *IGF2* transkribiert, *H19* jedoch nicht. Im mütterlichen, unmethylierten Allel ist genau das Gegenteil der Fall. Im Falle eines LOH oder „loss of imprinting“ (LOI) geht z.B. die Methylierung der regulatorischen Region auf dem mütterlichen Allel verloren. Dann wird *IGF2* stärker exprimiert. Dies konnte am *H19DMR* für somatische WT gezeigt werden [56].

Auch für andere Gene, wie z.B. *NNAT* und *MEST*, die auch in diesem Cluster liegen, wurden von der Norm abweichende Expressionsraten festgestellt [57]. CpG-Inseln liegen des Weiteren auch in Promotorregionen einzelner Gene, sodass auch diese selektiv durch Methylierung reguliert werden können [58]. Auch hier können Veränderungen auftreten, die potenziell tumorauslösend wirken. So wurde im WT schon für mehrere Gene, wie *p72* oder *SIX2*, modifizierte Methylierung festgestellt [59, 60].

### 1.3 WNT/ $\beta$ -Catenin-Signalweg

Signalwege spielen eine wichtige Rolle in der Entwicklung von Organen. Folglich können Fehlregulationen fatale Folgen nach sich ziehen, wie z.B. die Entstehung von Tumoren. Die Untersuchung solcher Signalwege ist für das Verständnis der Tumorgenese z.B. auch beim WT von großer Bedeutung.

Signalwege sind gekennzeichnet durch eine komplexe Interaktion von Proteinen und membrangebundenen Rezeptoren, die Signale von außerhalb der Zelle kontrolliert ins Innere weiterleiten. Endpunkt eines Signalweges kann beispielsweise eine veränderte Genexpression innerhalb einer Zelle sein [61].

Ein solcher Signalweg ist der WNT/ $\beta$ -Catenin-Signalweg, der an der Nierenentwicklung beteiligt ist. Er spielt beim mesenchymalen zum epithelialen Übergang der Zellen eine entscheidende Rolle [62]. Eine abnorme Aktivierung des Signalwegs wird für die Entstehung vieler Tumoren verantwortlich gemacht. Eine pathologisch veränderte Aktivität ist zuerst in kolorektalen Karzinomen festgestellt worden, konnte jedoch auch schon in WT nachgewiesen werden [63-65]. In ca. 15-20 % der WT mit einer günstigen Histologie ist eine Aktivierung des Signalwegs nachgewiesen worden [62]. Bisher sind die genauen Ursachen der fehlerhaften Regulierung aber noch nicht gänzlich geklärt. Zwar könnten die in 1.2.1 aufgeführten Mutationen des *CTNNB1* eine Rolle spielen, es wurde jedoch auch schon von Tumoren berichtet, bei denen eine Überaktivität des WNT/ $\beta$ -Catenins festgestellt werden konnte, eine *CTNNB1*-Mutation aber nicht [64].

#### 1.3.1 Überblick über den Signalweg

Die Aktivierung des WNT/ $\beta$ -Catenin-Signalweges (Abbildung 2) erfolgt über die Glykoproteine der Wingless-Familie (Wnt), von denen 19 bekannt sind [66]. Ihnen sind schon 1982 von Nusse et al. protoonkogene Eigenschaften in Mäusen zugeschrieben worden. Jedoch gibt es bisher keinerlei Hinweise auf eine direkte Beteiligung an der Tumorentstehung im Menschen. Es ist keine erhöhte mRNA-Expressionsraten für die Wnt-Proteine festgestellt worden, lediglich Zielgene des Signalwegs wurden vermehrt exprimiert [67, 68]. Wnt-Proteine binden extrazellulär an die transmembranösen Frizzled-Rezeptoren (Fz-Rezeptoren) und ihre Co-Rezeptoren Lipoprotein-Receptor-Related-Protein 5 oder 6 (LRP5/LRP6). Dies sorgt innerhalb der Zelle für eine Akkumulation des  $\beta$ -Catenins, welches dann in den Zellkern wandern kann, um dort als Co-Aktivatoren für den Transkriptionsfaktor T-Cell-Factor/Lymphoid-Enhancer-Factor (TCF/LEF) zu wirken [62, 69]. Das Ziel von TCF/LEF sind Gene zur Proliferations-, Apoptose- und Wachstumssteuerung der Zellen, unter anderem das Onkogen *MYC* und *CCND1* [65, 70, 71]. Extrazellulär kann das Wnt-Signal durch verschiedene Inhibitoren, wie Proteine der Dickkopf-Familie (DKK), die Secreted-Frizzled-Related-Proteine (SFRP) oder auch den Wnt-Inhibitor-Faktor 1 (WIF1) moduliert werden. Diese können beispielsweise LRP5/6 oder die

Wnt-Proteine binden und somit die Interaktion zwischen Wnt und Wnt-Rezeptor verhindern [66, 72].

In Abwesenheit eines Wnt-Signals wird das intrazelluläre  $\beta$ -Catenin kontinuierlich abgebaut. Dies geschieht mit Hilfe des sogenannten Destruction-Komplexes (DK), der aus der Ser/Thr-Kinasen Glykogen-Synthase-Kinase-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ), Casein-Kinase-1 (CK1), dem Gerüstprotein AXIN, dem Protein Adenomatous-Polypsis-Coli (APC), sowie dem  $\beta$ -Transducin Repeats-Containing Protein ( $\beta$ -TrCP) und der Protein-Phosphatase-2A (PP2A) besteht [73]. Dieser bindet und phosphoryliert das  $\beta$ -Catenin. Durch diese Phosphorylierung wird  $\beta$ -Catenin vom  $\beta$ -Transducin-Repeat-Containing-Protein ( $\beta$ -TrCP), einer Untereinheit der E3-Ubiquitin-Ligase, erkannt und ubiquitiniert. Die Ubiquitinierung dient dem 26S-Proteasom als Erkennungsstruktur, woraufhin es das  $\beta$ -Catenin degradiert.  $\beta$ -Catenin kann den Zellkern nicht erreichen und die Expression der Zielgene bleibt aus [65]. Wenn die Phosphorylierungsstellen von  $\beta$ -Catenin mutiert oder deletiert sind oder Komponenten des DK fehlen, wird  $\beta$ -Catenin stabilisiert, transloziert in den Zellkern und fördert die Expression von Zielgenen wie *AXIN2* und *MYC* durch Interaktion mit TCF/LEF-Transkriptionsfaktoren.

Der DK wird bei vorhandenem Wnt-Signal vom phosphorylierten LRP5/6 gebunden und an der Membran festgehalten, sodass es das  $\beta$ -Catenin nicht zum Abbau markieren kann. Dies zeigt, dass der DK ein wichtiger Baustein in der Regulierung der zytoplasmatischen  $\beta$ -Catenin-Konzentration ist. Ist seine Funktion oder die einer seiner Komponenten durch Mutation, verminderte Expression oder aus anderen Gründen eingeschränkt, führt dies zur abnormen Akkumulation von  $\beta$ -Catenin im Zellkern und somit zur vermehrten Expression der Zielgene.

### 1.3.2 *SFRP*

Finch et al. haben 1997 die Gruppe der SFRP beschrieben. Sie ähneln strukturell Frizzled-Proteinen, besitzen jedoch keine transmembranöse Region. Es sind fünf verschiedene menschliche SFRP bekannt, die die ersten beschriebenen Antagonisten des Wnt-Signalwegs darstellen [74]. Durch Bindung der Wnt und Fz-Rezeptoren verhindern sie die Aktivierung des Signalwegs [75]. Sie werden zu den Tumorsuppressorgenen gezählt, da es bei verminderter Expression zur Tumorentstehung kommen kann. Dies konnte in vielen Tumoren, wie dem Mamma-, Prostata und Ovarial-Ca nachgewiesen werden [76-78]. Die verminderte Expression wird in diesen Fällen meist durch Hypermethylierung der Promotorregionen einzelner *SFRP* verursacht. Mutationen der Gene wurden bisher nicht festgestellt [79].

Für WT gibt es noch keine Untersuchungen zu epigenetischen Veränderungen der *SFRP*, obwohl dies wie beschrieben ein verbreiteter Mechanismus in verschiedensten Tumorarten darstellt.

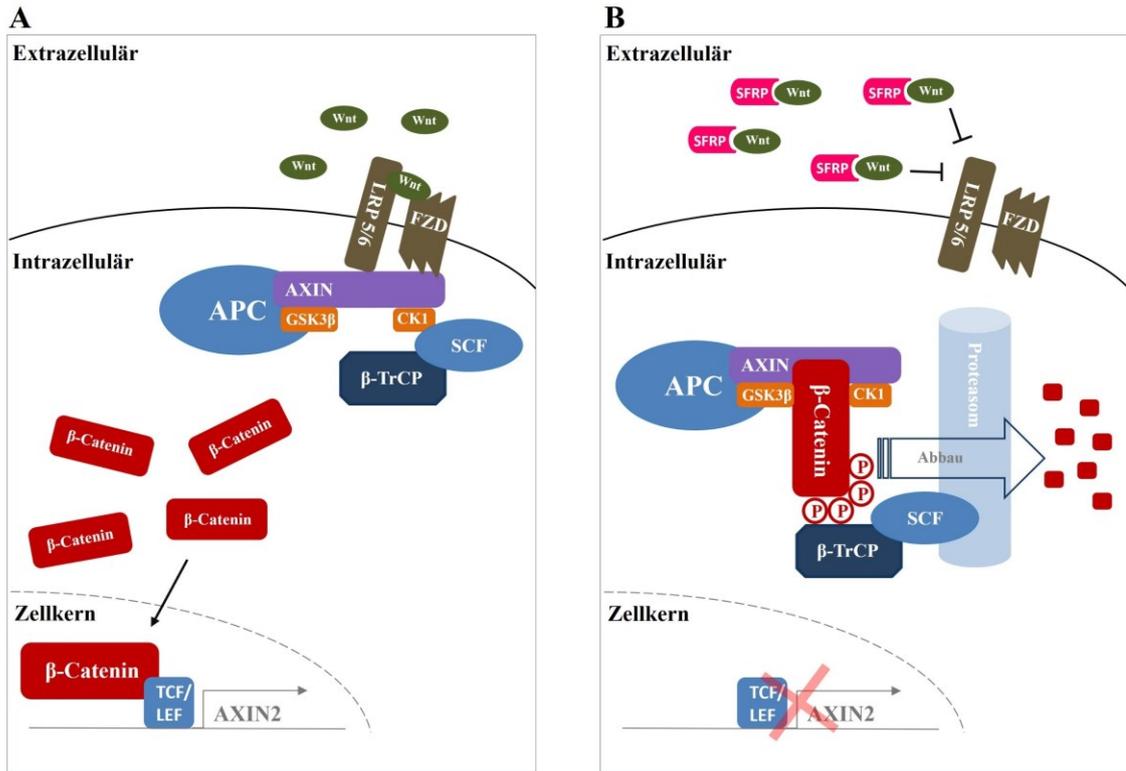


Abbildung 2: Schematische Darstellung des WNT/β-Catenin-Signalwegs, modifiziert nach [73, 75].

A) Aktiver Signalweg: Wnt-Proteine binden extrazellulär an FZD und seinen Co-Rezeptor LRP 5/6. Diese binden den Destruction-Komplex, bestehend aus APC, AXIN, GSK3β, CK1, SCF und β-TrCP, sodass β-Catenin nicht abgebaut wird und im Zellkern akkumuliert. Dort fungiert es als Co-Aktivator für TCF/LEF. Es kommt zur Expression von Zielgenen, wie z.B. *AXIN2*.

B) Inaktiver Signalweg: Extrazellulär blockieren SFRP die Wnt-Proteine, welche deshalb nicht an FZD binden können. Der Destruction-Komplex ist deshalb intrazellulär frei, bindet und phosphoryliert β-Catenin, sodass es vom Proteasom abgebaut wird.

## 2 Zielsetzung der Arbeit

Allgemein zeigen WT eine gute Prognose. Da sie jedoch zu den häufigsten Tumoren im Kindesalter gehören, ist die Zahl derer mit schlechter Prognose noch zu groß. Auch resultieren aus der Behandlung der WT, durch z.B. Chemotherapie, nicht zu unterschätzende Spätfolgen für die betroffenen Kinder. Weitergehende Forschung zur Entstehung und dem klinischen Erscheinungsbild sind deshalb unbedingt erforderlich.

Es sind bereits einige genetische und epigenetische Veränderungen in WT untersucht, die an der Entstehung der Tumoren beteiligt sein könnten. Ein Ansatzpunkt ist der WNT/ $\beta$ -Catenin-Signalweg, der direkt an der Nierenentwicklung beteiligt ist. Es konnte nachgewiesen werden, dass dieser Signalweg in einem Teil der WT fehlreguliert ist. Die genauen Mechanismen sind jedoch noch unbekannt und sollen in dieser Arbeit genauere Betrachtung finden.

Zunächst soll festgestellt werden, ob eine abnorme Aktivität des WNT/ $\beta$ -Catenin-Signalweges in WT besteht. Dies soll durch eine Expressionsanalyse des Zielgens *AXIN2* geschehen. Bei abnormer Aktivität des Signalwegs soll eine Sequenzierung des  $\beta$ -Catenins erfolgen, um zu sehen, mit welchem Anteil diese Veränderung an der abnormen Signalweg-Aktivierung beteiligt ist. Anschließend sollen andere Komponenten des Signalwegs wie *APC*, *SFRP1*, 2, 4 und 5 auf Fehlfunktionen auf epigenetischer und transkriptioneller Ebene überprüft werden.

Zuletzt sollen die gewonnenen Erkenntnisse zu genetischen und epigenetischen Veränderungen klinischen Parametern, unter anderem der Histologie, dem Geschlecht oder dem Alter bei Diagnosestellung, zugeordnet werden.

Die Untersuchungen sollen in erster Linie ein besseres Verständnis der Entstehung von WT bringen. Dieses Wissen kann als Ausgangspunkt dienen, um die WT genauer klassifizieren zu können. Anhand solcher Klassifikationen können individualisierte und wirksamere Therapien für bestimmte Gruppen von WT entwickelt und unnötige Therapie mit eventuellen Spätfolgen verhindert werden.

### 3 Materialien

#### 3.1 Patienten- und Patientinnenkollektiv und Probengewinnung

Es wurden insgesamt 101 WT-Proben untersucht, die in der Kinderchirurgischen Klinik des Dr. von Haunerschen Kinderspitals behandelt und operiert worden sind. Die Kontrollgruppe bestand aus 26 Proben, die aus gesunden Teilen der entnommenen Nierenteile stammen. Alle Patienten und Patientinnen waren mit der Verwendung des entnommenen Materials für wissenschaftliche Untersuchungen einverstanden. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität München geprüft und genehmigt.

Sowohl die Proben der WT, sowie das Gewebe für die Kontrollen wurden ausschließlich im Rahmen medizinisch indizierter Operationen gewonnen. Nach Entnahme wurden die Gewebeproben in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -196 °C gelagert.

55 % der Patienten und Patientinnen der entnommenen Proben waren männlich und 45 % weiblich. Das mediane Alter der betroffenen Kinder bei Diagnosestellung betrug 38 Monate, wobei der jüngste Patient bei Diagnosestellung ein Monat und der älteste 201 Monate alt war. Von 2 Kindern lag das Alter nicht vor. Zum Zeitpunkt der Operation betrug das mediane Alter der betroffenen Kinder 40 Monate. Bei Mädchen wurde der Tumor im Durchschnitt 24 Monate später diagnostiziert, mit ca. 5 Jahren und 2 Monaten. Außer bei 6 % der Proben wurde präoperativ eine Chemotherapie durchgeführt, was an der Leitlinie der SIOP liegt, die in Deutschland angewendet wird. Von einer der Proben ist nicht bekannt, ob eine Chemotherapie im Vorhinein stattfand.

Die histologische Klassifizierung der Proben wurde vom Pathologischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität durchgeführt und referenzpathologisch der Pathologie der Universität Kiel vorgestellt. Die histologische Einteilung der verwendeten Proben ist Tabelle 6 zu entnehmen.

Bei 16 der Proben (16 %) wurde bei Diagnosestellung histologisch oder bildmorphologisch eine Metastasierung diagnostiziert. Von Metastasen betroffen waren Lunge, Lymphknoten, Leber oder das Abdomen. Keine Informationen zum Metastasierungsstatus gab es bei zwei der Proben.

In der Zeit der Nachkontrolle bis zum 27.04.2017 wurde bei 17 (17 %) der betroffenen Kinder ein Rezidiv diagnostiziert. Es verstarben insgesamt sechs (6 %) der Patienten und Patientinnen, deren Proben in die Studie eingeflossen sind. Keine Kenntnis über das Überleben bestand für zwei der Proben.

Tabelle 6: histologische Einteilung der Proben (n = 101)

<b>Histologie</b>	<b>Anzahl Proben</b>	<b>Anteil an Gesamtzahl</b>
<b>stromal</b>	17	16,83 %
<b>epithelial</b>	2	1,98 %
<b>blastemal</b>	14	13,86 %
<b>gemischt</b>	19	18,81 %
<b>fokale Anaplasie</b>	4	3,96 %
<b>diffuse Anaplasie</b>	7	6,93 %
<b>regressiv</b>	32	31,68 %
<b>Nephroblastomatose</b>	5	4,95 %
<b>Unbekannt</b>	1	0,99 %

### 3.2 Enzyme

iTaq SYBR Green Supermix with ROX	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Super Script™ II Reverse Transcriptase	Invitrogen, Karlsruhe
Proteinase K	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Maxima HotStart-Taq-Polymerase	Fermentas, Glen Burnie, USA

### 3.3 Längenstandard

GeneRuler 100 bp DNA, Ladder (0,5 µg/µl)	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
--	------------------------------

### 3.4 Primer

Tabelle 7: Quantitative-PCR

Gen	Sequenz	Exon	Länge
<i>AXIN2</i>	Fw: TATCCAGTGATGCGCTGACG	3/4	91
	Rv: TGTTTCTTACTGCCCACACGAT		
<i>APC</i>	Fw: ACGCTCAACTTCAGAATCTCACTAAA	5/6	101
	Rv: TTCATATTCCAATTGCCTTCTGG		
<i>SFRP1</i>	Fw: CATGACGCCGCCCAAT	1/2	91
	Rv: GATGGCCTCAGATTTCAACTCG		
<i>SFRP2</i>	Fw: ACATGCTTGAGTGCGACCG	1/2	101
	Rv: TACCTTTGGAGCTTCCTCGG		
<i>SFRP4</i>	Fw: AAGCTGTGCAGAGGAGTGGC	4	101
	Rv: GAGCGGGACTTGAGTTCGAG		
<i>SFRP5</i>	Fw: GAAGCTGATTGGAGCCCAGA	3	101
	Rv: GAGCGGGACTTGAGTTCGAG		

Tabelle 8: Methylierungsanalyse

Gen	Sequenz	CpGs
<i>APC</i>	Fw: Biotin-GGGAAGAGGAGAGAGAAGTAGTTG	7
	Rv: ACTACACCAATACAACCACATAT	
	Seq: CACACCCAACCAATC	
<i>SFRP1</i>	Fw: GTTTTTTAAGGGGTGTTGAGT	5
	Rv: Biotin-CCTACCCCAAACCTTCCAAAAACCTC	
	Seq: GTAGTTTTTCGGAGTTAGT	

Tabelle 9: Mutationsanalyse CTNNB1

Gen	Sequenz	Exon	Länge
<i>CTNNB1</i>	Fw: GATTTGATGGAGTTGGACATGG	3	174
	Rv: TGTTCTTGAGTGAAGGACTGAG		

### 3.5 Kits

EpiTect® Bisulfite Kit (48)	Qiagen GmbH, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit (250)	Qiagen GmbH, Hilden
DNeasy® Blood & Tissue Kit (50)	Qiagen GmbH, Hilden

### 3.6 Chemikalien und Reagenzien

6x DNA Loading Dye	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
peqGOLD Universal Agarose	PeQLab, Erlangen
ddH <sub>2</sub> O	Invitrogen, Karlsruhe
Desoxyribonukleosidtriphosphate	Roche Diagnostics, Mannheim
Ethanol absolut	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid (EtBr), 10 mg/ml	Sigma-Aldrich, Steinheim
Isopropanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer (20 X)	Invitrogen, Karlsruhe
PyroMark Annealing Buffer	Qiagen GmbH, Hilden
PyroMark Binding Buffer	Qiagen GmbH, Hilden
PyroMark Denaturation Buffer	Qiagen GmbH, Hilden
PyroMark Washing Buffer	Qiagen GmbH, Hilden
PyroMark Gold Q24 Reagents	Qiagen GmbH, Hilden
Streptavidin Sepharose High Performance	GE Healthcare, Frankfurt
TRI Reagent® RNA Isolation Reagent	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ultra-Pure TM DNase/RNase-Free Distilled Water	Invitrogen, Karlsruhe
MgCl <sub>2</sub> , 25 mM	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich
10 X Hot Start PCR Buffer	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich
Random Hexamere	Roche Diagnostics, Mannheim

Tris-Borat-EDTA-Puffer	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich
5 x First strand buffer	Roche Diagnostics, Mannheim
DTT	Roche Diagnostics, Mannheim
Chloroform	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

### 3.7 Verbrauchsmaterialien

BD Falcon™ Round-Bottom Tubes	BD, Heidelberg
Kryoröhrchen	Nalgene Thermo Scientific, Waltham, USA
Quarzküvette QS 10,00 mm	Hellma, Mühlheim
8-Well PCR stripes	Eppendorf AG, Hamburg
PCR 96 Well Plates	PeQLab, Erlangen
Safe-lock Eppendorf tube 1.5 ml, 2 ml	Eppendorf AG, Hamburg
PyroMark Q24 Plate	Qiagen GmbH, Hilden
Pipettenspitzen 10 µL, 100 µL, 1000 µL	Sarstedt, Nümbrecht
24 Well PCR plate	PeQLab, Erlangen
Cap strips flat	Eppendorf AG, Hamburg

### 3.8 Geräte

Agarosegel Elektrophorese Apparat	Bio-Rad, München
ART-Micra D-8 Homogenisator	ART Prozess- & Labortechnik GmbH & Co. KG, Mühlheim
Bio-Photometer	Eppendorf AG, Hamburg
GEL Jet Imager Version 2004	INTAS Science Imaging, Instruments GmbH, Göttingen
Heraeus Biofuge PICO	Kendro Laboratory Products, Osterode
Mastercycler personal	Eppendorf AG, Hamburg
Mastercycler Realplex2	Eppendorf AG, Hamburg
Microwave	Panasonic, Hamburg

Mini Centrifuge MCF – 2360	LMS Co. LTD, Tokyo, Japan
Mini®-Sub Cell GT	Bio-Rad, München
Minilys	Bertin Technologies, France
Power Pac Basic	Bio-Rad, München
PyroMark Q24 Vacuum Workstation	Qiagen GmbH, Hilden
PyroMark™ Q24 instrument	Qiagen GmbH, Hilden
Scales Vic-5101	Acculab, Edgewood, USA
Suctionssystem „EcoVac“	Schütt, Labortechnik, Göttingen
Thermal Printer DPU-414	Seiko Instruments, Neu-Isenburg
Thermomixer Comfort 1,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Thermomixer Compact	Eppendorf AG, Hamburg
Vortex – Genie 2 G-560 E	Scientific Industries, New York, USA
Micropipetten Research (10 µl, 100 µl, 1 ml)	Eppendorf AG, Hamburg

### 3.9 Software

CHROMAS v1.45 Software	Griffith University, Queensland, Australia
GraphPad Prism 5.0	GraphPad Software, La Jolla, USA
Methyl Primer Express® Software v1.0	Applied Biosystems, Darmstadt
PyroMark Q24 Advanced Software	Qiagen GmbH, Hilden
Realplex	Eppendorf AG, Hamburg
PyroMark Assay Design SW	Qiagen GmbH, Hilden

## 4 Methoden

### 4.1 Genexpressionsanalyse

#### 4.1.1 RNA-Isolation

Zur Gewinnung von Gesamt-RNA aus dem WT-Gewebe wurde die Phenol-Chloroform-Extraktion nach Chomczynski und Sacchi angewandt [80]. Zur Vorbereitung wurden zunächst je 2 ml Tri Reagent in zwei 14-ml-Tubes vorgelegt. Dieses enthält das Phenol, welches die organische, untere Phase bildet und einen wässrigen Anteil, die obere Phase. Da die RNA eine höhere Polarität besitzt, sammelt sie sich später in der wässrigen Phase an, während die zu verwendenden Proteine mit der geringeren Polarität in der unteren Phase lokalisiert sind. Die DNA sammelt sich bei einem pH-Wert des Phenols von ca. 4 in der Interphase an (Abbildung 3).

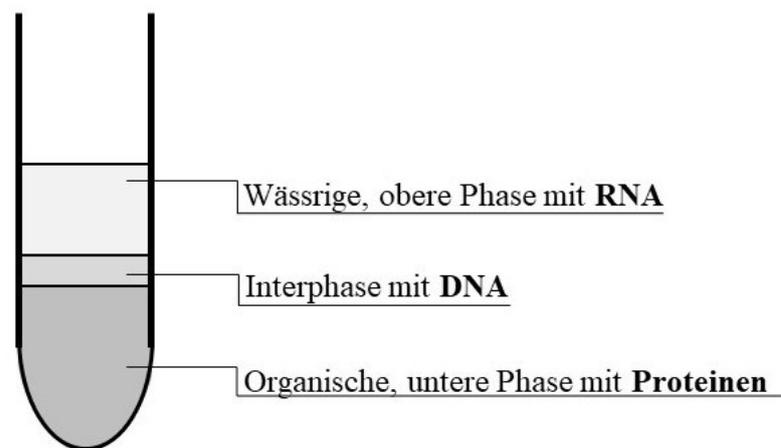


Abbildung 3: Phasentrennung durch Phenol-Chloroform-Extraktion, modifiziert nach [81].

In jedes Tube wurden zehn Dickschnitte des WT-Gewebes mit einer Schnittdicke von 30  $\mu\text{m}$  gegeben und die einzelnen Bestandteile durch den Homogenisator aus den Zellen freigesetzt. Vor und nach jedem Arbeitsschritt wurde der Homogenisator zur Vermeidung von Verunreinigungen mit ddH<sub>2</sub>O und Tri Reagent gewaschen. Das erhaltene Lysat wurde auf zwei 2-ml-Tubes aufgeteilt, die dann jeweils 1 ml der Proben enthielten. Nach einer Inkubationszeit von 5 min bei Raumtemperatur (RT) wurden jeweils 200  $\mu\text{l}$  Chloroform hinzugefügt. Dieses bewirkt durch seine Dichteigenschaften eine bessere Abgrenzung zwischen der oberen und

unteren Phase, sodass die obere Phase besser abgetragen werden kann. Nach kurzem Vermischen durch 15 sec auf dem Schüttelgerät (Vortex) wurden die Ansätze erneut für 3 min bei RT inkubiert. Durch Zentrifugieren mit 12.000 rpm bei 4 °C für 15 min wurden die Phasen getrennt. Die obere Phase, welche die RNA enthielt, wurde in ein neues 2-ml-Tube überführt.

Zur Fällung der RNA wurde in die Tubes jeweils ein Volumen 100 % Isopropanol zugegeben, gemischt und für 10 min bei RT inkubiert. Nach Zentrifugieren (12.000 x g, 4 °C, 15 min) wurde der Überstand verworfen, 1,5 ml gekühltes Ethanol (70 %ig) hinzugegeben und durch den Vortex gemischt. Anschließend wurde erneut zentrifugiert (7.500 x g, 4 °C, 5 min), der Überstand nochmals verworfen und das verbliebene Pellet luftgetrocknet. Zuletzt erfolgte die Lösung des Pellets in 25 µl ddH<sub>2</sub>O bei 55 °C für 15 min, wonach die zuvor aufgeteilten RNA-Proben derselben Gewebsstücke wieder zu einem Pool bestehend aus 50 µl zusammengeführt werden konnten.

#### 4.1.2 Konzentrationsbestimmung der RNA

Zur Bestimmung der RNA-Konzentration wurde das Biophotometer benutzt, welches die Absorption der RNA in ddH<sub>2</sub>O bei einer Wellenlänge von 260 nm, dem Absorptionsmaximum der RNA, misst. Dies wird anschließend mittels Labert-Beer'schem Gesetzes in die Konzentration der Lösung umgerechnet:

$$E_{\lambda} = -\lg\left(\frac{I}{I_0}\right) = \epsilon_{\lambda} \cdot c \cdot d$$

mit

$E_{\lambda}$ : Extinktion

$I$ : Intensität des transmittierten Lichtes

$I_0$ : Intensität des einfallenden Lichtes

$\epsilon_{\lambda}$ : natürlicher Extinktionskoeffizient bei der Wellenlänge  $\lambda$  (260nm für RNA)

$c$ : Konzentration der absorbierenden Substanz in Lösung

$d$ : Weglänge des Lichts

Zu Beginn wurde zur Eichung eine Leerwertmessung mit reinem ddH<sub>2</sub>O durchgeführt.

#### 4.1.3 cDNA-Synthese

Zur Expressionsanalyse von Genen wird DNA benötigt, die nur aus den informationstragenden Exons bestehen. Deshalb wird mRNA, in welcher die Introns bereits entfernt sind, als Template benutzt, um daraus mithilfe der Reversen Transkriptase komplementäre DNA (cDNA) zu synthetisieren. Hierfür wurde zunächst 2 µg Gesamt-RNA in 7 µl ddH<sub>2</sub>O gelöst. Als Primer für die Reverse Transkriptase wurden 5 µl Random Hexamere (20 ng/µl) hinzugegeben und der Ansatz für 10 min bei 70 °C inkubiert. Zu jeder Probe wurden nun jeweils 4 µl 5 x First Strand

Buffer, 2  $\mu\text{l}$  DTT-Puffer (0,1 M) und 1  $\mu\text{l}$  dNTPS (10 mM) für ein Endvolumen von 14  $\mu\text{l}$  zugegeben. Dann wurde für 10 min bei 25 °C inkubiert und noch einmal für 2 min bei 42 °C. Dies stellt die optimale Reaktionstemperatur für die Reverse Transkriptase SuperScript II dar, von der nun 1  $\mu\text{l}$  zum Ansatz hinzugefügt und durch vorsichtiges Kreisen mit der Pipettenspitze eingearbeitet wurde. Es folgten eine Inkubation für 60 min bei 42 °C und anschließend für 10 min bei 70 °C. Schließlich wurde die entstandene cDNA mit 80  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O auf 100  $\mu\text{l}$  aufgefüllt und bei -20 °C gelagert.

#### 4.1.4 Quantitative real-time-PCR

Zur Analyse der Expressionsrate verschiedener Gene wurde eine sogenannte quantitative real-time-PCR durchgeführt (qPCR). Diese basiert auf dem herkömmlichen Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion, bei der die DNA in vitro in drei Schritten amplifiziert wird [82]. Zuerst wird hierbei die eingesetzte doppelsträngige DNA (dsDNA) durch hohe Temperaturen zu Einzelsträngen denaturiert. Es folgt die Anlagerung (Annealing) der Primer bei einer Temperatur, die dem individuellen Arbeitsoptimum des jeweiligen Primers entspricht. Zuletzt erfolgt die Elongation bei einer optimalen Reaktionstemperatur für die DNA-Polymerase, wodurch die komplementären Stränge synthetisiert werden. Dies ist in folgender Abbildung schematisch dargestellt.

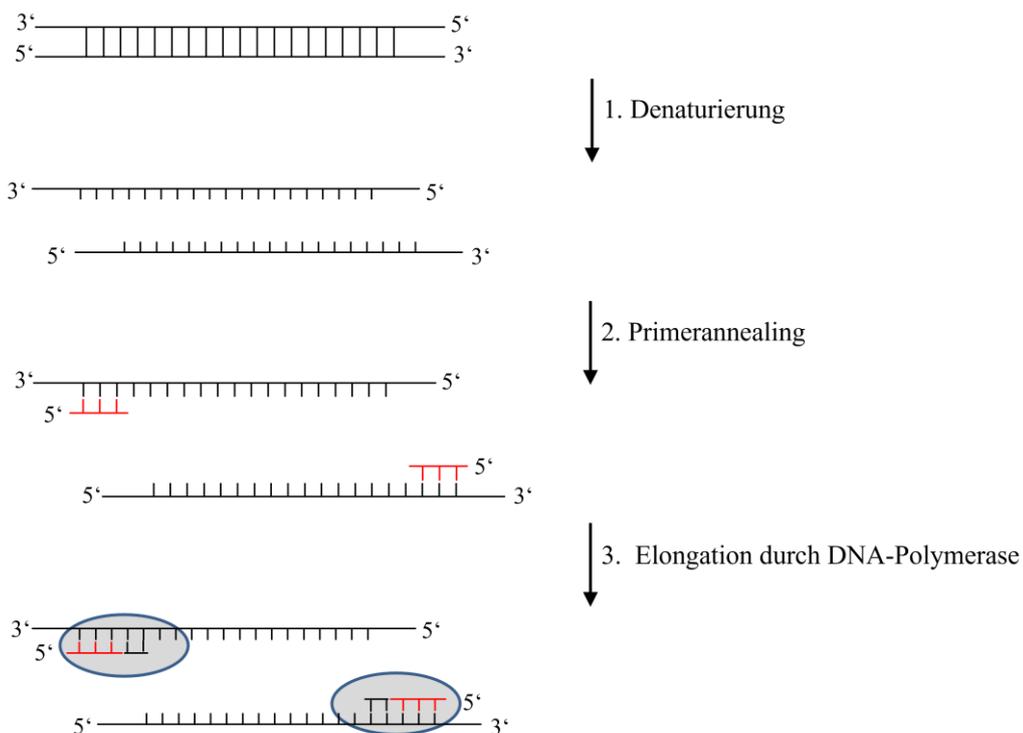


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Polymerase-Kettenreaktion [83].

Die qPCR bietet zusätzlich die Möglichkeit, die entstandenen Produkte in Echtzeit zu quantifizieren. Dies wurde in dieser Arbeit mittels des Fluoreszenzfarbstoffs SYBR Green erreicht, der sich in die DNA einlagert. Die Fluoreszenz steigt proportional zur Anzahl der Amplifikationen an, sodass nach jedem Zyklus anhand der Messung der Fluoreszenz die Amplifikationsrate ermittelt werden kann. Hierfür wurde zunächst ein Mastermix angemischt, der für jede Probe aus den in Tabelle 10 dargestellten Komponenten bestand.

**Tabelle 10: Mastermix der Genexpressionsanalyse, Angaben pro Probe**

<b>iTaq SybrGreen</b>	10 $\mu$ l
<b>Forward-Primer 10 <math>\mu</math>M</b>	1 $\mu$ l
<b>Reverse-Primer 10 <math>\mu</math>M</b>	1 $\mu$ l
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	6 $\mu$ l
<b>gesamt</b>	18 $\mu$ l

Es wurden Genexpressionsanalysen für *APC*, *AXIN2*, sowie *SFRP1*, 2, 4 und 5 durchgeführt. Zur Normalisierung wurde zusätzlich die Aktivität des Haushaltgens *TATA-Binding-Box-Protein (TBP)* für jede Probe ermittelt. Die Sequenzen aller Primer sind Tabelle 7 zu entnehmen. Die Primer wurden mithilfe der Methyl Primer Express® Software v1.0 designt. Die Länge sollten zwischen 20-40 bp liegen und die Schmelztemperatur bei 58-60 °C. Eine gegenseitige Bindung der Primer wurde ausgeschlossen und es wurde zusätzlich überprüft, ob die Primer universell spezifisch für die gewünschte Sequenzen sind. Die Messungen wurden in Doubletten durchgeführt. In jedes Well wurden 2  $\mu$ l der cDNA und 18  $\mu$ l des jeweiligen Mastermixes gegeben, um ein Endvolumen von 20  $\mu$ l zu erreichen. Als Kontrolle wurden in jede Platte noch zwei Negativkontrollen mit ddH<sub>2</sub>O eingefügt.

Die Platte wurde nach Befüllung mit einer selbstklebenden Klarsichtfolie verschlossen und für 1 min bei 2.500 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde die q-PCR mit dem in Tabelle 11 dargestellten Protokoll im Mastercycler Realplex2 gestartet.

**Tabelle 11: PCR-Programm der qPCR**

	<b>Dauer</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Zyklen</b>
<b>Initiale Denaturierung</b>	2 min	95 °C	1
<b>Denaturierung</b>	15 sec	95 °C	} 40
<b>Annealing</b>	15 sec	55 °C	
<b>Elongation</b>	20 sec	68 °C	

Es wurde nun die Anzahl der Zyklen ermittelt, die benötigt wurden, um den Cycle-Threshold-Wert (ct-Wert) zu übersteigen. Die Kontrollen sollten hierbei den ct-Wert nicht übersteigen. Falls dies doch der Fall war, wurden die Proben mittels Gelelektrophorese, wie in 4.2.2 beschrieben, auf Verunreinigungen getestet. Die ct-Werte der Doubletten wurden gemittelt und nur diejenigen mit einer Standardabweichung  $< 0,5$  verwendet. Ausgeschlossen wurden außerdem solche Proben, die den Threshold erst nach  $> 35$  Zyklen überschritten.

Anschließend wurde die relative Genexpression der Proben ermittelt. Als Referenz diente in dieser Arbeit ein unreguliertes Haushaltsgen, das TATA-Box-Binding-Protein. Diese Haushaltsgene werden unabhängig von äußeren Einflüssen und Zelltypen in gleicher Weise exprimiert, da sie meist für Proteine kodieren, deren Funktion für die Zellerhaltung essenziell ist. Die Formel zur Errechnung der relativen Expression wurde unter anderem durch Pfaffl et al. beschrieben [84]:

$$\text{relative Expression} = 2^{-(\text{ct}_{\text{Kandidatengen}} - \text{ct}_{\text{TBP}})_{\text{Patienten und Patientinnen}} - (\text{ct}_{\text{Kandidatengen}} - \text{ct}_{\text{TBP}})_{\text{Kontrolle}}}$$

Als über-/unterexprimiert galten alle Proben, deren relative Expression  $\pm 3$  Standardabweichungen des Medianwertes der Kontrollproben lagen.

## 4.2 Sequenzierung

### 4.2.1 DNA-Isolation

Zur Gewinnung von DNA aus dem WT-Gewebe wurde das DNeasy® Blood & Tissue Kit verwendet. Benutzt wurden hierfür 25 mg des WT-Gewebes und die Isolation erfolgte getreu des Handbuchs des Herstellers mit folgenden Modifikationen: Anstatt der vorgeschlagenen 20  $\mu\text{l}$  Proteinase K wurden 30  $\mu\text{l}$  hinzugegeben. Außerdem wurden statt 200  $\mu\text{l}$  des Elutionpuffers lediglich 50  $\mu\text{l}$  benutzt. Zusätzlich wurde die Inkubationszeit bei RT von 1 min auf 2 h erhöht. Die isolierte DNA wurde anschließend bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert und die Konzentration wurde wie in 4.1.2 beschrieben, bestimmt.

### 4.2.2 Gelelektrophorese

Das Prinzip der Gelelektrophorese zur Auftrennung von Molekülen beruht auf deren negativen Ladung sowie der unterschiedlichen Größe. So wird an eine in TBE-Puffer gelagerte Gelmatrix Strom angelegt, welcher dafür sorgt, dass die Moleküle von der Kathode zur Anode wandern. Kürzere Stücke wandern hierbei schneller als längere, da sie die Gelmatrix besser passieren können. Gleich große Stücke lagern sich am Ende des Versuchs zu Banden zusammen. Um Exon 3 des Gens *CTNNB1* amplifiziert zu erhalten wurde zunächst eine PCR mit den in Tabelle 9 aufgeführten Primern durchgeführt. Diese wurden wie in 4.1.4 beschrieben designt. Der Reaktionsmix, der hierfür verwendet wurde, ist in Tabelle 12 aufgelistet und das verwendete Protokoll in Tabelle 13.

Tabelle 12: Mastermix PCR, Angabe pro Probe

<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	13,4 µl
<b>10 X Hot Start PCR Puffer</b>	2 µl
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	1,2 µl
<b>dNTPs</b>	0,4 µl
<b>Forward-Primer</b>	1 µl
<b>Reverse-Primer</b>	1 µl
<b>Taq Polymerase</b>	0,2 µl
<b>Proben-DNA</b>	1 µl
<b>gesamt</b>	20,2 µl

Tabelle 13: PCR-Programm für die Amplifikation des Exon 3, *CTNNA1*

	<b>Dauer</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Zyklen</b>
<b>Initiale Denaturierung</b>	4 min	95 °C	1
<b>Denaturierung</b>	40 sec	95 °C	} 40
<b>Annealing</b>	40 sec	59 °C	
<b>Elongation</b>	60 sec	72 °C	
<b>Finale Elongation</b>	10 min	72 °C	1

Zur Herstellung der Gelmatrix wurden 1 g Agarosepulver in 100 ml TBE-Puffer bei 800 W für 2 min unter gelegentlichem Schwenken gelöst. Es wurden 6 µl EtBr der Konzentration 10 mg/ml hinzugefügt, welches sich in die DNA einlagert. Dies kann am Ende mittels ultravioletten Lichts sichtbar gemacht werden. Das Gel wurde anschließend in die Kammer gegossen und für ca. 1 h abgekühlt. Zur Proben-DNA wurde Loading Dye im Verhältnis 1:5 hinzugegeben, welches die DNA in den Taschen absinken lässt. Die Mischung wurde in die Taschen der festen Gelmatrix pipettiert und als DNA-Größenstandard wurden 5 µl Gene Ruler 100 bp aufgetragen. Bei 90 V lief der Versuch anschließend für 30-60 min. Mit dem Programm GelJet Imager Version 2003 wurden die Banden mithilfe ultravioletten Lichts dokumentiert.

#### 4.2.3 DNA-Extraktion aus Gel

Die Extraktion der DNA aus der aus der Gelmatrix erfolgte mithilfe des QIAquick Gel Extraction Kits. Hierfür wurden die Banden der gewünschten Fragmentlänge unter ultraviolettem Licht mit einem Skalpell ausgeschnitten und anschließend gemäß den Herstellerangaben weiterverarbeitet.

#### 4.2.4 Sanger-Sequenzierung

Mittels der Didesoxymethode nach Sanger wurde Exon 3 des Gens *CTNNB1* auf Mutationen untersucht. Dies geschieht in vier Ansätzen, die jeweils dNTPs aller Basen enthalten. Jedoch sind in jedem Ansatz zusätzlich Didesoxynukleosidtriphosphate (ddNTPs) einer Base vorhanden, die mit einem Farbstoff markiert sind. Bei Einbau eines ddNTPs kommt es zum Strangbruch. Zunächst werden die Stränge denaturiert. Anschließend folgt die Primeranlagerung. Es wird jedoch nur der Forward-Primer hinzugefügt, sodass nur in eine Richtung synthetisiert wird. Die Stränge werden nun so lange synthetisiert, bis ein ddNTP eingebaut wird. So entstehen in jedem Ansatz unterschiedlich lange Sequenzen, die immer mit der Base enden, deren ddNTPs sich im jeweiligen Ansatz befanden. Mittels Gelelektrophorese können die Fragmente anschließend nach ihrer Größe aufgetrennt und die Sequenz so abgelesen werden.

Dies wurde durch das Sequenzier Center der Ludwig-Maximilians-Universität München mit dem ABI 3730 Capillary Sequencer durchgeführt. Zur Analyse der Ergebnisse wurde die Software CHROMAS v1.45 verwendet. Proben, die eine Mutation oder Deletion aufwiesen, wurden erneut sowohl mit dem Forward- als auch dem Reverse-Primer sequenziert, um das Ergebnis zu sichern.

### 4.3 DNA-Methylierungsanalyse

#### 4.3.1 Bisulfit-Konversion der DNA

Um methylierte von unmethylierten Cytosinen unterscheiden zu können, nutzt man die Bisulfit-Konversion. Hierbei werden, wie in Abbildung 5 dargestellt, unmethylierte Cytosine zu Uracil desaminiert, während methylierte Cytosine unverändert bleiben [85]. Durch anschließende Sequenzierung können methylierte von unmethylierten Cytosinen unterschieden werden.

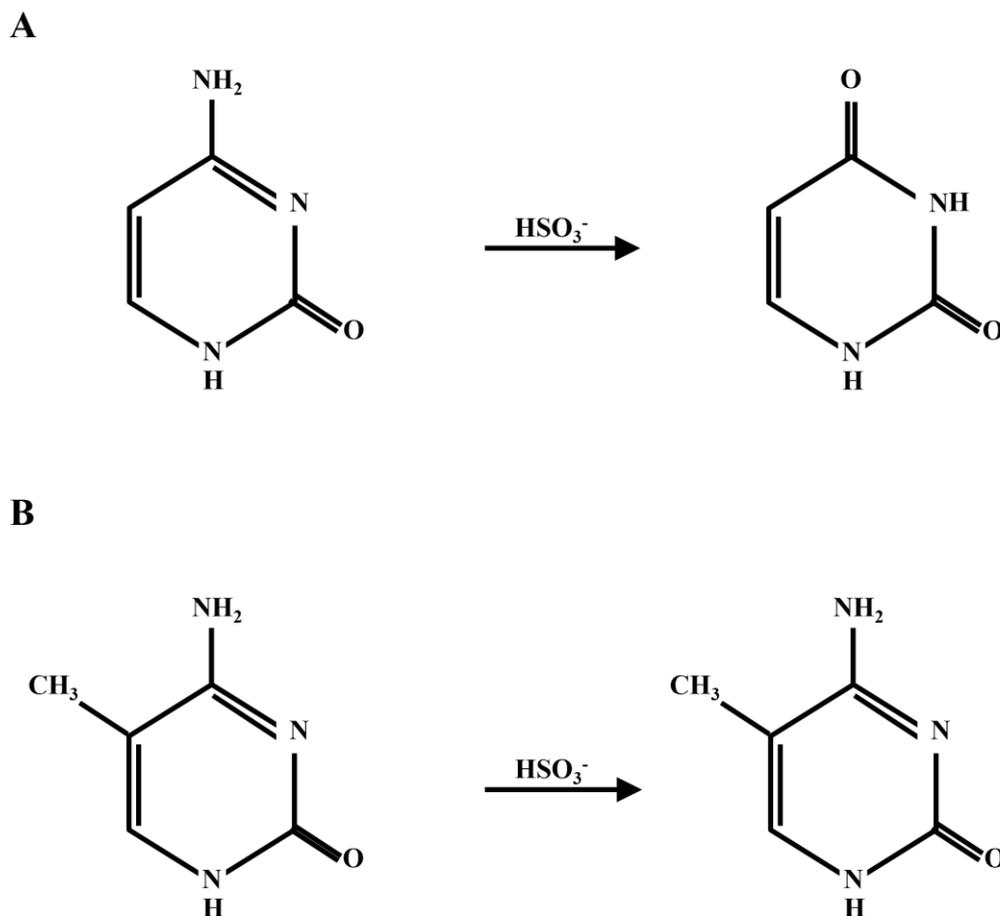


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Bisulfit-Konversion.

A) Unmethyliertes Cytosin wird zu Uracil desaminiert.

B) Methyliertes Cytosin bleibt unverändert.

Untersucht wurde die Methylierung in der Promotorregion der Gene *APC* und *SFRP1*.

Es wurde der EpiTect® Bisulfite Kit verwendet und die Reaktionsschritte nach Protokoll durchgeführt mit einer Änderung: Statt der vorgeschlagenen 15 µl des Elution-Puffers wurden 20 µl benutzt, um die Ausbeute der konvertierten DNA zu erhöhen.

Tabelle 14: PCR-Programm zur Amplifikation der DNA für die Bisulfit-Konversion

Dauer	Temperatur
5 min	95 °C
15 min	60 °C
5 min	95 °C
85 min	60 °C
5 min	95 °C
175 min	60 °C

#### 4.3.2 PCR

Im nächsten Schritt wurden die Loki auf der DNA festgelegt, die später amplifiziert, sequenziert und somit auf den Methylierungsgrad überprüft werden sollten. Hierfür wurden Abschnitte am 5' Ende mit besonders hoher Dichte an CpG-Inseln gesucht, die in der Promotorregion des jeweiligen Gens lagen. Für *APC* mit leichter Modifikation nach Siegel et al. 2015 und Migheli et al. 2013 [86, 87]. Die Primer wurden dann mithilfe des Programms PyroMark Assay Design SW designt

(Tabelle 8), wobei darauf geachtet wurde, dass der Primer selbst keine solcher CpG-Inseln in seiner Sequenz beinhaltet, um die Bindungsspezifität des Primers zu erhalten. Zusätzlich wurde jeweils ein Primer am 5'-Ende biotinyliert. Das Biotin wird von Streptavidin gebunden und Einzelstränge können somit isoliert werden. Für *APC* wurden durch die Primer sieben CpG-Inseln, für *SFRP1* fünf CpGs eingeschlossen.

Die Amplifikation erfolgte nun mittels PCR. Hierfür wurde für jede Probe ein Ansatz mit den in Tabelle 15 aufgeführten Komponenten hergestellt und im Thermo Cycler amplifiziert unter den in Tabelle 16 gelisteten Bedingungen.

Tabelle 15: Mastermix PCR zur Amplifikation bisulfitkonvertierter DNA, Angabe pro Probe

<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	13,4 µl
<b>10 X Hot Start PCR Puffer</b>	2 µl
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	1,2 µl
<b>dNTPs</b>	0,4 µl
<b>Forward-Primer</b>	1 µl
<b>Reverse-Primer</b>	1 µl
<b>Taq Polymerase</b>	0,2 µl
<b>bisulfitkonvertierte DNA</b>	1 µl
<b>gesamt</b>	20,2 µl

Tabelle 16: PCR-Programm für die Amplifikation zum Pyrosequenzieren

	Dauer	Temperatur	Zyklen
<b>Initiale Denaturierung</b>	4 min	95 °C	1
<b>Denaturierung</b>	45 sec	95 °C	} 45
<b>Annealing</b>	45 sec	59 °C	
<b>Elongation</b>	60 sec	72 °C	
<b>Finale Elongation</b>	5 min	72 °C	1
	2 min	4 °C	1

Als Kontrolle der Amplifikation vor Beginn der Sequenzierung wurden die Proben anschließend, wie in Kapitel 4.2.2 beschrieben, auf ein Gel aufgetragen. Es wurden je 3 µl der DNA mit 3 µl Loading Dye vermischt. Es wurden ebenfalls 5 µl des Längenstandards Gene Ruler 100 bp aufgetragen, um die Länge kontrollieren zu können. Das Ergebnis wurde unter ultraviolettem Licht mit dem GelJet Imager Version 2003 beurteilt. Nur bei klar vorhandenen Banden wurde im nächsten Schritt die Sequenzierung durchgeführt.

### 4.3.3 Pyrosequenzierung

Die Pyrosequenzierung ist eine Echtzeit-Sequenzierungsmethode durch Synthese eines zuvor bisulfitkonvertierten DNA-Einzelstranges. Dies geschieht durch Detektion einer Lichtemission, die proportional zur Anzahl der eingebauten Nukleotide freigesetzt wird.

Für den Sequenzierungsvorgang wird einsträngige DNA (ssDNA) benötigt, damit sich der Sequenzier-Primer anlagern kann. Dieser Primer (Tabelle 8) wurde wie die Primer für die Amplifikation in 4.3.2 mithilfe des Programmes PyroMark Assay Design SW erstellt. Die amplifizierte, bisulfitkonvertierte dsDNA wurde dann durch Streptavidin immobilisiert, indem dieses das Biotin bindet. Es folgte die Ablösung des unbiotinylierten Stranges durch Denaturierung und die Entfernung der restlichen Reaktionskomponenten durch eine Waschung. Dies wurde mittels der im ProMark24 Kit bereitgestellten Puffer getreu der Herstellerangaben durchgeführt.

Nun konnten die Sequenzier-Primer hybridisieren. Durch Inkubation der Proben mit einem Enzym- und Substratmix, sowie der Nukleotide im PyroMark24 wurde die Sequenzierung gestartet. Bei Einbau einer Base durch die DNA-Polymerase wird ein Pyrophosphat (PPi) freigesetzt, welches augenblicklich durch die Sulfurylase zu ATP konvertiert wird. Das ATP dient wiederum als Substrat für die Decarboxylierung von Luziferin zu Oxyluziferin, katalysiert durch die Luziferase. Das Oxyluziferin generiert das Licht, welches detektiert wird und als Peak in der Analyse dargestellt wird. Die Höhe des Peaks ist dabei proportional zur Anzahl der eingebauten Nukleotide.

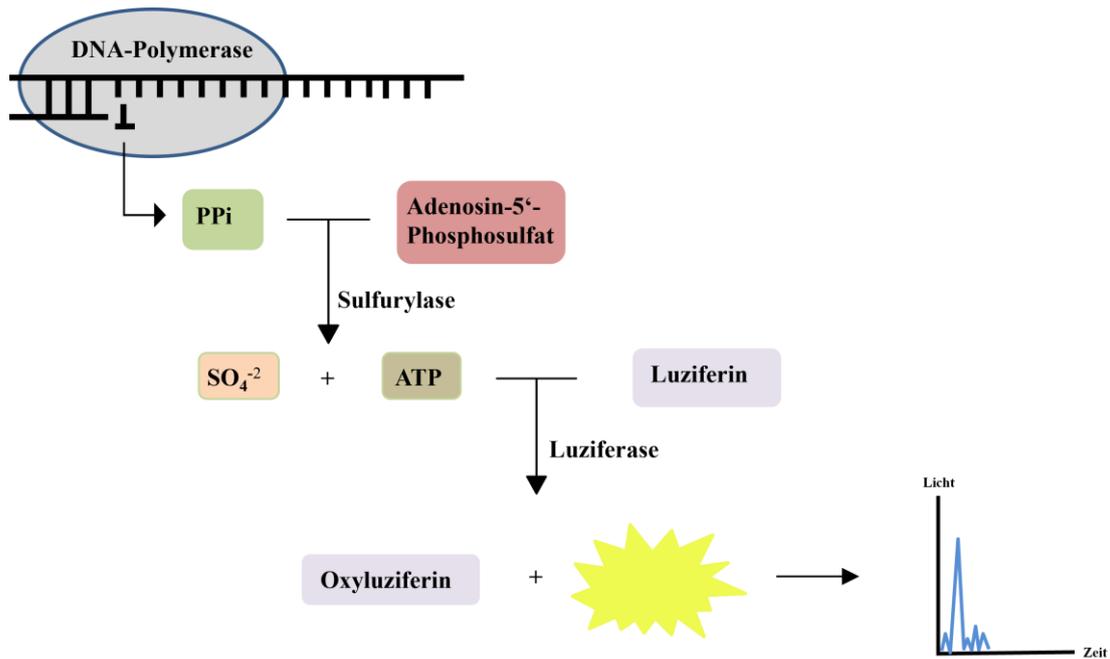


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Pyrosequenzierung, modifiziert nach [88].

In jedem Durchgang wird vom Gerät jeweils nur eine der vier Basen hinzugefügt und nach Ablauf der Reaktion wieder ausgespült, sodass am Ende entsprechend der Abfolge der Lichtemissionen die gesuchte Sequenz abgelesen werden kann. Wenn sowohl in der Ausgangssequenz als auch in der bisulfitkonvertierten Sequenz ein Cytosin an derselben Stelle nachweisbar ist, wird davon ausgegangen, dass das Cytosin methyliert ist. Als Kontrolle wurde zusätzlich aus Speichel gewonnene DNA mit Methyltransferase M.SssI behandelt, welche alle Cytosine eines CG-Dinukleotids methyliert. Die Speichel-DNA sollte also einen Methylierungsgrad von 100 % aufweisen. Hierzu wurde zunächst noch eine Verdünnungsreihe der methylierten Speichel-DNA erstellt, um die optimale Konzentration für die Pyrosequenzierung zu erhalten.

Die Analyse wurde von der PyroMark Q24 Advanced Software durchgeführt.

## 4.4 Statistik

Die Statistik und die Graphiken wurden mit GraphPad Prism durchgeführt. Die Ergebnisse der Proben wurden anhand verschiedener Eigenschaften gruppiert und einander oder der Kontrollgruppe gegenübergestellt.

Für den Vergleich zwischen zwei Gruppen wurde der Mann-Whitney-U-Test für nicht-normalverteilte Daten benutzt. Für den Vergleich mehrerer unabhängiger Gruppen miteinander wurde der Kruskal-Wallis-Test verwendet. Um eine Assoziation zwischen zwei Variablen nachzuweisen, wurde der Fisher's-Exact-Test verwendet. Die Korrelation wurde mithilfe der Spearman-Korrelation für nicht-normalverteilte Daten bestimmt. Das Überleben verschiedener Gruppen wurde durch Kaplan-Meier-Kurven dargestellt und die Signifikanz mittels Log-Rank-Test ermittelt. Ein p-Wert  $< 0,05$  wurde als statistisch signifikant betrachtet, um die Wahrscheinlichkeit zu minimieren, dass die Unterschiede zufällig sind.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Expressionsanalyse für *AXIN2*

Bislang gab es keine Untersuchungen bezüglich der WNT/ $\beta$ -Catenin-Signalweg-Aktivierung in WT. Um diese darzustellen, sollte als erster Schritt die Expression von *AXIN2* als Zielgen des Signalwegs untersucht werden. Mittels qPCR wurde die Genexpressionsanalyse für die Kohorte von 101 WT-Proben und 25 Kontrollen durchgeführt. Es zeigte sich eine signifikant erhöhte relative Genexpression für *AXIN2* ( $p < 0,0001$ ) in WT (Abbildung 7). 31 WT-Proben (31 %) zeigten eine erhöhte Expression gegenüber normalem Nierengewebe (Median der Kontrollwerte + 3 Standardabweichungen). Somit kann festgestellt werden, dass in knapp einem Drittel der WT-Proben der WNT/ $\beta$ -Catenin-Signalweg aktiviert ist.

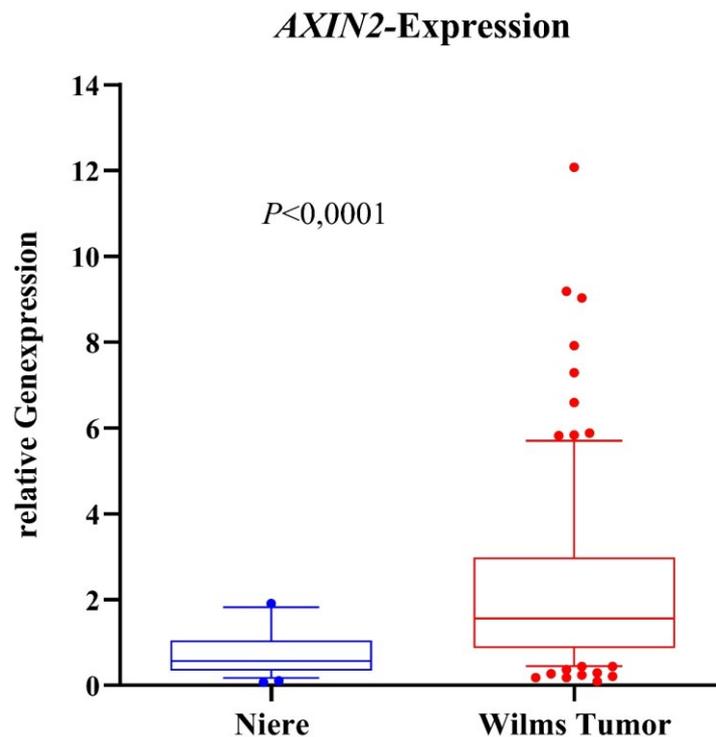


Abbildung 7: Relative Genexpression von *AXIN2* der 101 WT (rot), 25 Kontrollen (blau). Die Genexpression wird in Relation zum Haushaltsgen *TBP* berechnet und in Boxplots mit Ausläufern von der 9.-91. Perzentile dargestellt. Die mediane Expression ist als horizontale Linie dargestellt.

## 5.2 *CTNNB1*

### 5.2.1 Mutationsanalyse für *CTNNB1*

Um zu untersuchen, ob die festgestellte Aktivierung des WNT/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs durch Veränderungen des  $\beta$ -Catenins verursacht wird, wurde die Hotspot-Region auf Exon 3 in *CTNNB1* mittels Sanger-Sequenzierung auf Mutationen untersucht. In 7 (6,9 %) der 101 untersuchten Proben konnte eine Mutation nachgewiesen werden (Abbildung 8 A). 6 davon wiesen eine Punktmutation mit dem Austausch einer Aminosäure auf (Thr41Ala, Ser45Phe, Ser45Cys, 3x Ser45Pro). In einer Probe konnte eine Deletion erkannt werden (Ser45del).

### 5.2.2 *AXIN2*-Expression in *CTNNB1*-mutierten und nicht mutierten WT

5 der 6 mutierten Proben wiesen eine signifikant erhöhte relative Genexpression für *AXIN2* auf. Im Vergleich zu den WT ohne *CTNNB1*-Mutation zeigte sich ein signifikanter Unterschied im Mann-Whitney-U-Test ( $p = 0,0160$ ), wie in Abbildung 8 B dargestellt. Dies kann als Bestätigung interpretiert werden, dass eine Mutation von *CTNNB1* zu einer Überexpression von *AXIN2* führen kann und somit verantwortlich für die Aktivierung des WNT- $\beta$ -Catenin-Signalweges ist.

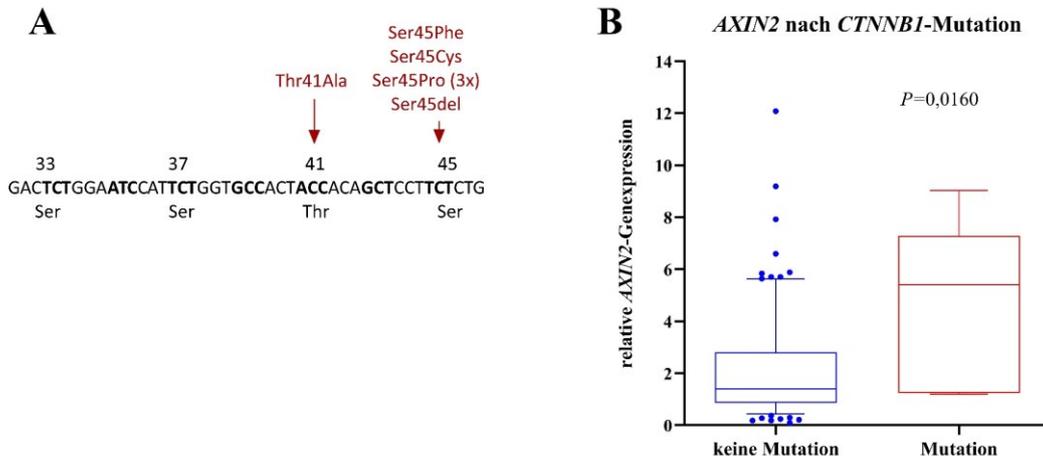


Abbildung 8: A) Mutations-Hotspot auf Exon 3 des *CTNNB1*, welches die Phosphorylierungsstellen an den Aminosäuren 33, 37, 41 und 45 umfasst. Dargestellt sind die in unserer Kohorte festgestellten Mutationen (rot).

B) Relative Genexpression von *AXIN2* von 7 WT mit (rot) und 94 WT ohne (blau) *CTNNB1*-Mutation. Die Genexpression wird in Relation zum Haushaltsgen *TBP* berechnet und in Boxplots mit Ausläufern von der 9.-91. Perzentile dargestellt. Die mediane Expression ist als horizontale Linie dargestellt.

## 5.3 *APC*

### 5.3.1 Methylierungsanalyse für *APC*

Eine weitere Ursache für eine übermäßige WNT/ $\beta$ -Catenin-Signalweg-Aktivierung könnte eine fehlerhafte Funktion des APC sein. Zwar konnten bisher in WT keine Mutationen in *APC* gefunden werden. Eine verminderte *APC*-Expression durch Methylierung der Promotorregion ist jedoch ein weit verbreiteter Mechanismus in anderen Tumoren mit WNT/ $\beta$ -Catenin-Signalweg-Aktivierung. Deshalb wurde eine CpG-reiche Region der Promotorregion des *APC*-Gens in allen 101 WT-Proben und in 16 Kontrollen auf ihren Methylierungsstatus untersucht (Abbildung 9 A). Die Methylierungsrate der WT lag median bei nur 4,07 %, sodass es keine signifikante Differenz zu den Kontrollen gab ( $p = 0,8891$ ).

### 5.3.2 Expressionsanalyse für *APC*

Um auszuschließen, dass die *APC*-Expression durch andere Mechanismen beeinflusst wird, wurde für alle 101 Tumorproben und 25 der Kontrollen auch eine Expressionsanalyse von *APC* durchgeführt (Abbildung 9 B). Bestätigend zeigte sich keine Unterexpression von *APC* in den WT-Proben ( $p = 0,8043$ ). Auch ließ sich keine Korrelation ( $r = -0,01333$ ;  $p = 0,8871$ ) zwischen der *APC*-Expression und der Methylierung der Promotorregion feststellen (Abbildung 9 C).

### 5.3.3 Korrelation *APC*-Expression mit *AXIN2*-Expression

Um einen Zusammenhang zwischen der WNT/ $\beta$ -Catenin-Signalweg-Aktivierung und veränderter *APC*-Expression zu untersuchen, wurden die *APC*-Expressionswerte mit der *AXIN2*-Genexpression korreliert (Abbildung 9 D). Auch hier zeigte sich mit  $r = 0,1505$  und  $p = 0,1329$ , dass zwischen den untersuchten Parametern keine Korrelation besteht und keine Unterexpression von *APC* nachzuweisen ist, die zu einer WNT/ $\beta$ -Catenin-Signalweg-Aktivierung führt. Die Aktivierung des WNT/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs ist in Zusammenschau der Daten in der von uns getesteten Kohorte nicht durch Hypermethylierung oder Unterexpression von *APC* zu erklären.

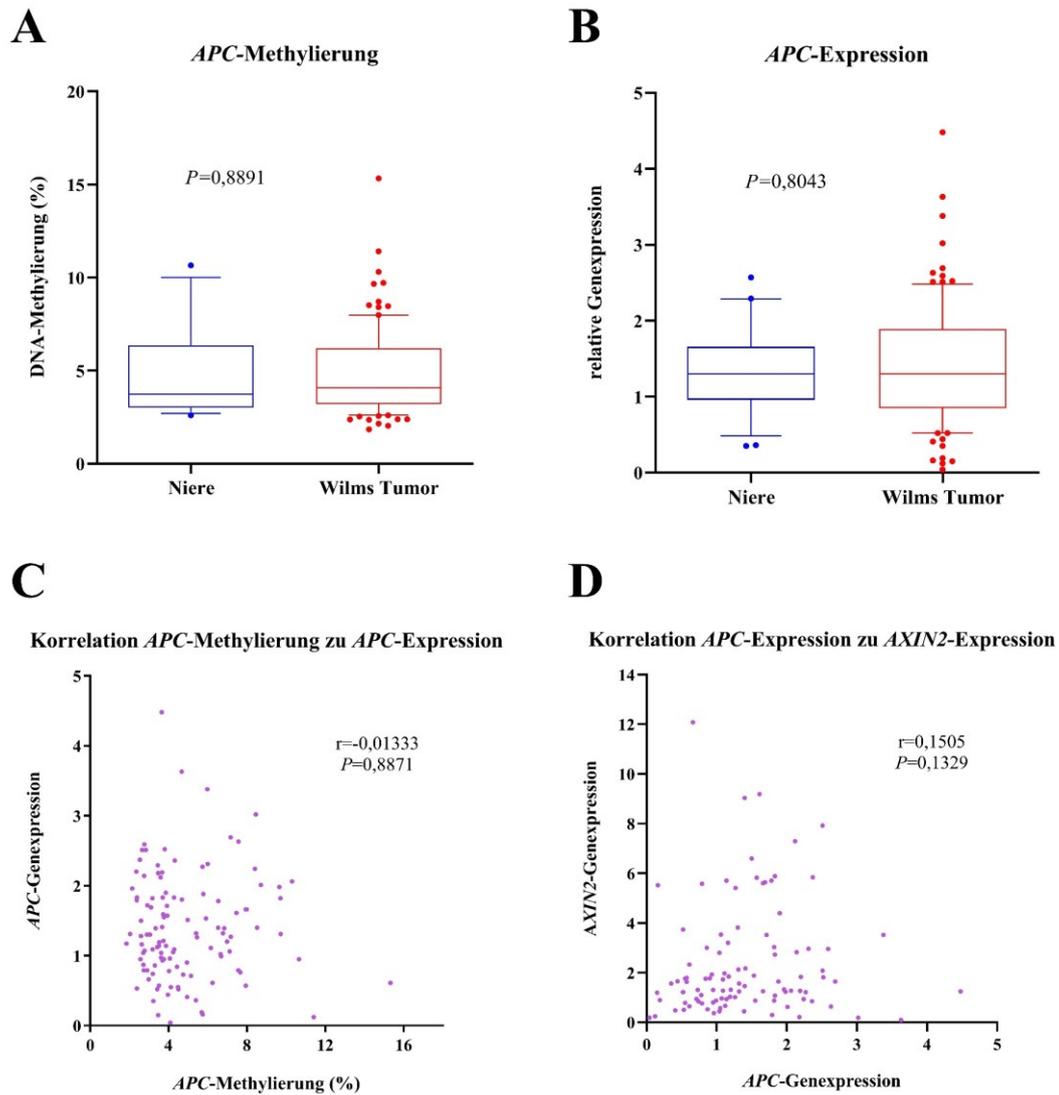


Abbildung 9: A) *APC*-Methylierung von sieben CpGs in der *APC*-Promotorregion in 101 WT (rot) und 16 Kontrollen (blau). B) *APC*-Genexpression in 101 WT (rot) im Vergleich zu 25 Kontrollen (blau). Berechnet in Relation zum Haushaltsgen *TBP* und dargestellt in A und B als Boxplots mit Ausläufern von der 9.-91. Perzentile. Die mediane Expression ist jeweils als horizontale Linie dargestellt. C) Korrelation der durchschnittlichen CpG-Methylierung im *APC*-Promotor mit der relativen *APC*-Expression mittels Spearman-Korrelation. D) Korrelation der *APC*-Expression mit der *AXIN2*-Expression mittels Spearman-Korrelation.

## 5.4 *SFRP1, 2, 4, 5*

Auch eine epigenetische Veränderung anderer im WNT/ $\beta$ -Catenin-Signalweg beteiligter Proteine könnte dessen übermäßige Aktivierung erklären. Für die Gruppe der *SFRP* konnte in anderen Tumoren bereits gezeigt werden, dass sie unterexprimiert sind, wie in 1.3.2 beschrieben. Jedoch gibt es für WT keine Untersuchungen diesbezüglich. Es wurde deshalb zunächst entsprechend der Expressionsanalyse für *AXIN2* eine Expressionsanalyse für *SFRP1*, *SFRP2*, *SFRP4* und *SFRP5* durchgeführt. *SFRP3* wurde nicht in die Methylierungsanalyse eingeschlossen, da seine Promotorregion keine CpG-Inseln beinhaltet. Aufgrund von Materialmangel konnte hier nur ein kleiner Anteil der WT untersucht werden (Tabelle 17). Hierunter waren alle WT-Proben, die eine *CTNNB1*-Mutation aufzeigten und 19 Proben mit einer signifikant erhöhten *AXIN2*-Expression.

### 5.4.1 Expressionsanalyse für *SFRP1*

Für die geprüften 36 WT ließ sich für *SFRP1* eine signifikant verminderte Expression in WT im Vergleich zu den untersuchten Kontrollen zeigen ( $p = 0,0048$ ) (Abbildung 11 A). Bei 11 der WT-Proben (31 %) konnte eine Unterexpression festgestellt werden (Median – drei Standardabweichungen der Kontrollwerte). Von den Proben mit Unterexpression von *SFRP1* war nur bei 3 (27 %) gleichzeitig eine *AXIN2*-Überexpression festzustellen. Die Aktivierung des WNT/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs in unserer Kohorte könnte nur zu knapp einem Drittel durch eine verminderte Expression des Tumorsuppressor-Gens *SFRP1* bedingt sein.

### 5.4.2 *SFRP2, 4, 5*

Für alle drei Gene konnte keine Unterexpression festgestellt werden. Jedoch zeigte sich eine signifikante Überexpression für *SFRP2* ( $p < 0,0001$ ) und *SFRP4* ( $p = 0,0027$ ) für die WT-Proben im Vergleich zu den Kontrollen. Für *SFRP2* zeigten sich 28 (80 %) überexprimiert und für *SFRP4* 16 der Proben (44 %) gegenüber normalem Nierengewebe (Median + 3 Standardabweichungen). *SFRP5* zeigte keine signifikante Abweichung der Expression im Vergleich der WT zu den Kontrollen ( $p = 0,4669$ ). Zu erwähnen ist hier die starke Variabilität der Expressionslevel, welche mittels logarithmischer Darstellung in Abbildung 10 abgebildet sind. Stark abweichende Werte wurde bis zu drei Mal überprüft und der Mittelwert aus den einzelnen Messungen bestimmt.

Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass *SFRP2*, *SFRP4* und *SFRP5* in den untersuchten WT keine Rolle spielen in der pathologischen WNT/ $\beta$ -Catenin-Signalweg-Aktivierung.

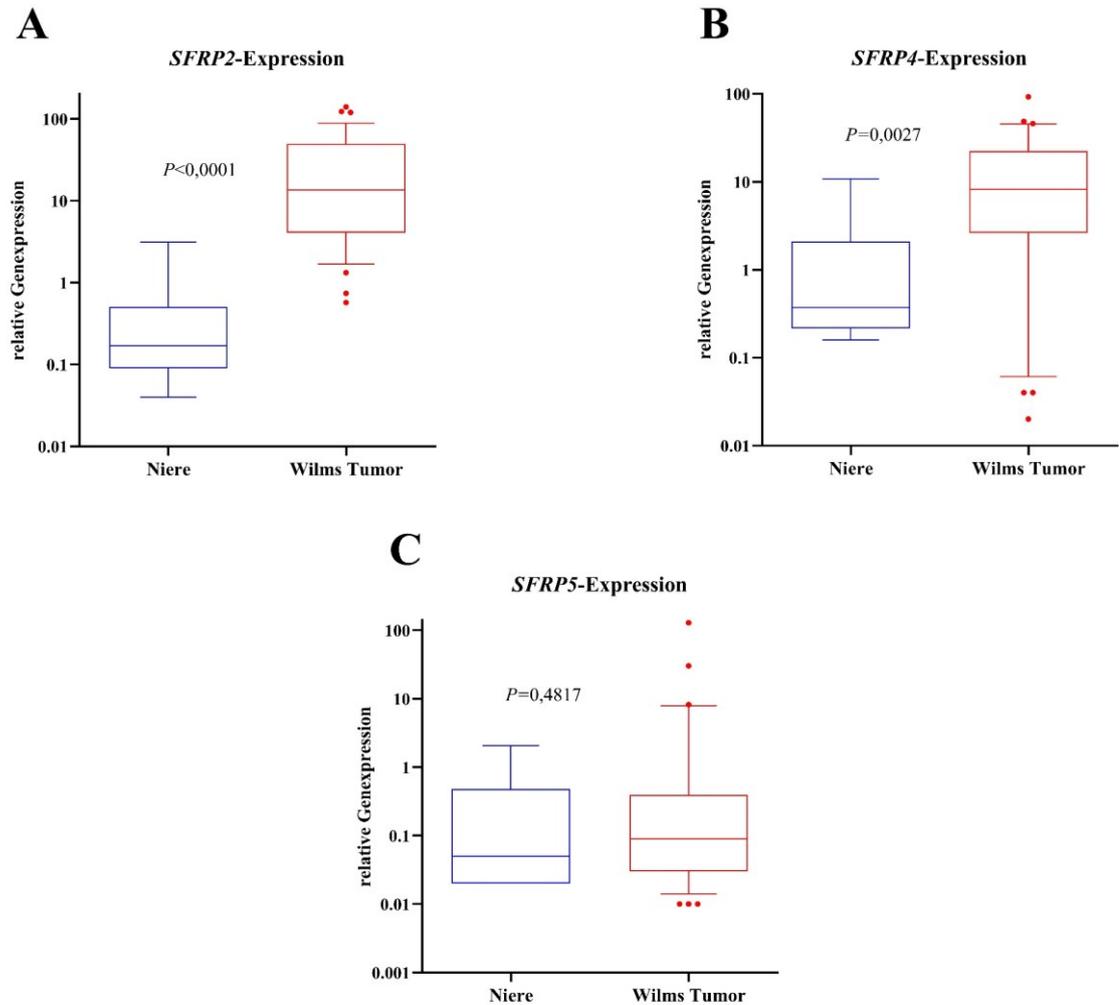


Abbildung 10: Genexpression der WT (rot) und Kontrollen (blau).

A) Genexpression von *SFRP2* (35 WT, 9 Kontrollen).

B) Genexpression von *SFRP4* (36 WT, 9 Kontrollen).

C) Genexpression von *SFRP5* (33 WT, 9 Kontrollen).

Berechnet in Relation zum Haushaltsgen *TBP* und dargestellt als Boxplots mit Ausläufern von der 9.-91. Perzentile. Die mediane Expression ist jeweils als horizontale Linie dargestellt.

### 5.4.3 Methylierungsanalyse für *SFRP1*

Eine Hypermethylierung von *SFRP1* könnte ursächlich für die in 5.4.1 gezeigte signifikante Unterexpression von *SFRP1* in WT sein. Es wurde deshalb eine Methylierungsanalyse einer CpG-reichen Region der Promotorregion des *SFRP1*-Gens durchgeführt. Die Kohorte bestand hierfür aus 23 WT-Proben und 5 Kontrollen (Tabelle 17). Von den 11 WT mit Unterexpression von *SFRP1* waren 9 in der Kohorte für die Methylierungsanalyse enthalten. Es zeigte sich eine durchschnittliche Methylierungsrate von 2,44 %. Es ließ sich keine signifikant erhöhte Methylierung von *SFRP1* im Vergleich zu den Kontrollen nachweisen ( $p = 0,1688$ ). Auch konnte keine Korrelation zwischen der *SFRP1*-Expression und -Methylierung festgestellt

werden ( $r = 0,1576$ ;  $p = 0,4325$ ) (Abbildung 11 B, C). Zu beachten ist, dass die untersuchte Kohorte der *SFRP1*-Methylierung mit 11 WT deutlich kleiner ist als die Expressionsanalyse für *SFRP1* für 36 WT.

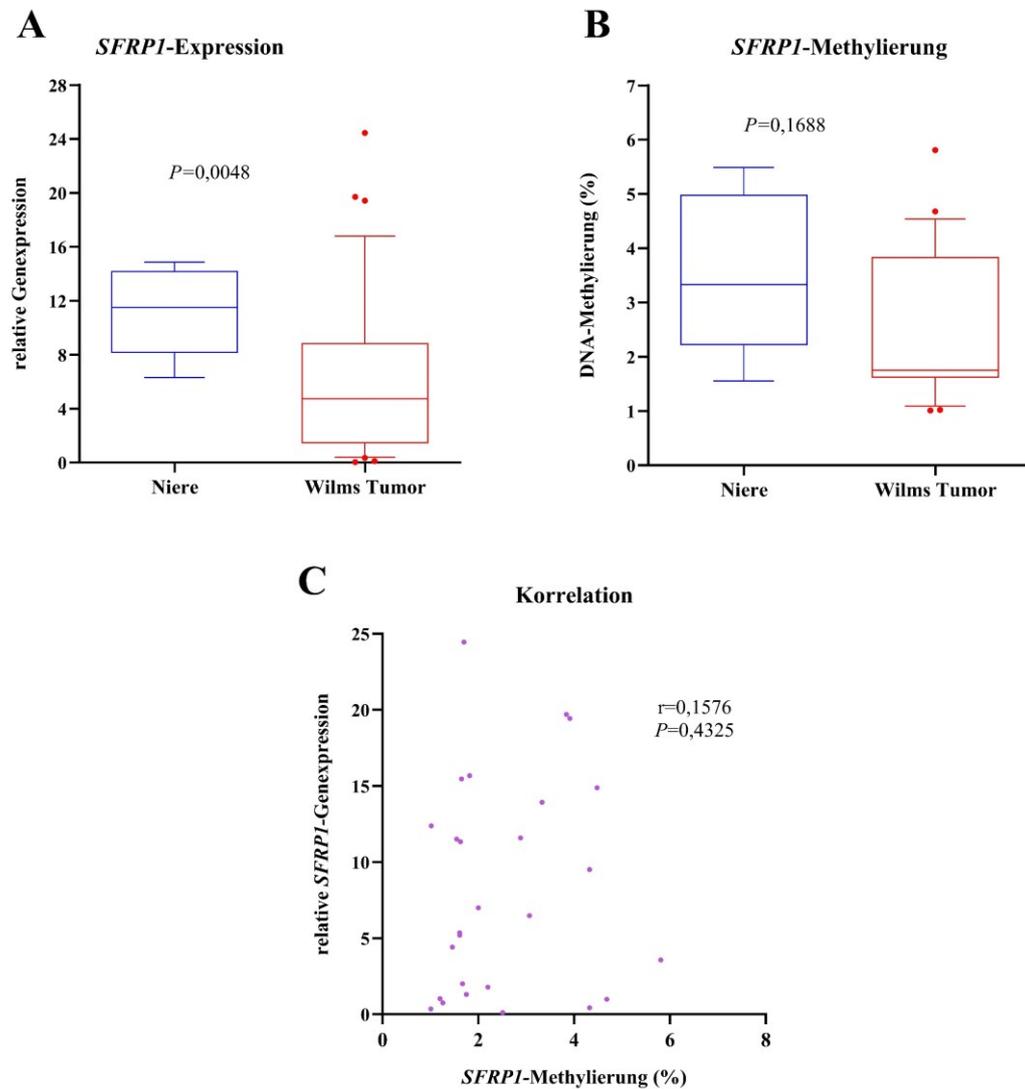


Abbildung 11: A) *SFRP1*-Genexpression (rot) von 36 WT und 9 Kontrollen (blau).

B) *SFRP1*-Methylierung von 5 CpGs in der Promotorregion in 23 WT (rot) und 5 Kontrollen (blau). Berechnet in A und B in Relation zum Haushaltsgen *TBP* und dargestellt als Boxplots mit Ausläufern von der 9.-91. Perzentile. Die mediane Expression ist jeweils als horizontale Linie dargestellt.

C) Korrelation der durchschnittliche CpG-Methylierung im *SFRP1*-Promotor mit der relativen *SFRP1*-Expression mittels Spearman-Korrelation.

#### 5.4.4 Korrelation *SFRP1*-Expression mit *AXIN2*-Expression

Da in 5.4.1 eine verminderte Expression von *SFRP1* gezeigt werden konnte, erfolgte eine Korrelation zur Genexpression von *AXIN2* (Abbildung 12). Eine negative Korrelation könnte ein Hinweis darauf sein, dass eine verminderte Expression des Tumorsuppressorgens *SFRP1* Ursache der WNT/ $\beta$ -Catenin-Signalweg-Aktivierung ist. In der Korrelation nach Spearman ließ sich jedoch kein Zusammenhang nachweisen ( $r = 0,02102$ ;  $p = 0,8910$ ).

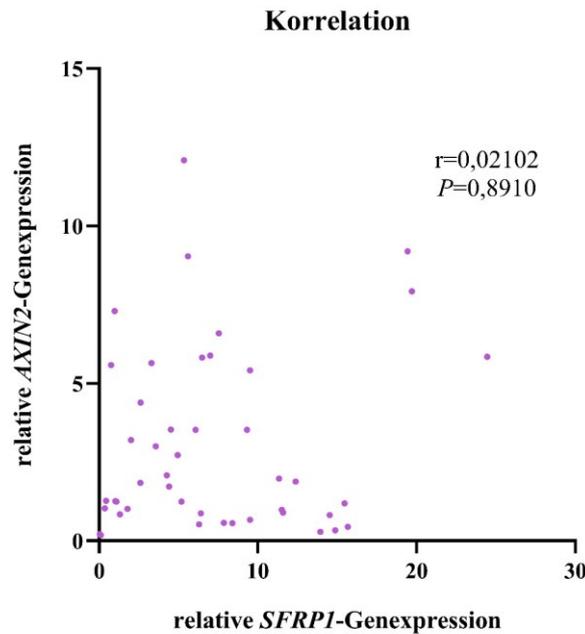


Abbildung 12: Korrelation der relative Genexpression von *AXIN2* mit *SFRP1* mittels Spearman-Korrelation.

Somit konnte kein Zusammenhang zwischen einer verminderten *SFRP1*-Expression und einer Überexpression von *AXIN2* festgestellt werden.

Tabelle 17: Allgemeine Übersicht zur Anzahl der Expressions- und Methylierungsanalyse; rote Markierung: signifikant unterexprimiert, blaue Markierung: signifikant überexprimiert

	Expressionsanalyse		-mit	-mit <i>AXIN2</i> -	Mann-	Methylierungsanalyse		Mann-
	WT	Kontrollen	<i>CTNNB1</i> - Mutation	Überexpression	Whitney- U-Test	WT	Kontrollen	Whitney- U-Test
<i>AXIN2</i>	101	25	7	31	p < 0,0001			
<i>APC</i>	101	25	7	31	p = 0,8043	101	16	p = 0,8891
<i>SFRP1</i>	36	9	7	19 (53 %)	p = 0,0048	23	5	p = 0,1688
<i>SFRP2</i>	35	9	6	19 (54 %)	p < 0,0001			
<i>SFRP4</i>	36	9	7	19 (53 %)	p = 0,0027			
<i>SFRP5</i>	33	9	6	18 (55 %)	p = 0,4817			

## 5.5 Statistische Analyse der Expressions- und Mutationsergebnisse in Bezug auf die Histologie

Die bisherigen Erkenntnisse wurden in einen klinischen Bezug gestellt. Es wurde geprüft, ob die nachgewiesene Überexpression von *AXIN2* sowie die verminderte Expression von *SFRP1* und die bereits bekannten *CTNNB1*-Mutationen einem histologischen Typen zuzuordnen sind.

### 5.5.1 *AXIN2*-Expression und Histologie

Zunächst sollte ermittelt werden, ob signifikante Unterschiede zwischen den WT-Proben nach beschriebener Histologie (Tabelle 6) vorhanden sind. Hierfür wurden die histologischen Gruppen mittels Kruskal-Wallis-Test bezüglich ihrer *AXIN2*-Expression miteinander verglichen. Zu erwähnen ist, dass eine Probe hiervon ausgeschlossen wurde, da die Histologie nicht bekannt war. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied ( $p = 0,0002$ ) zwischen den untersuchten Gruppen, wie in Abbildung 13 dargestellt.

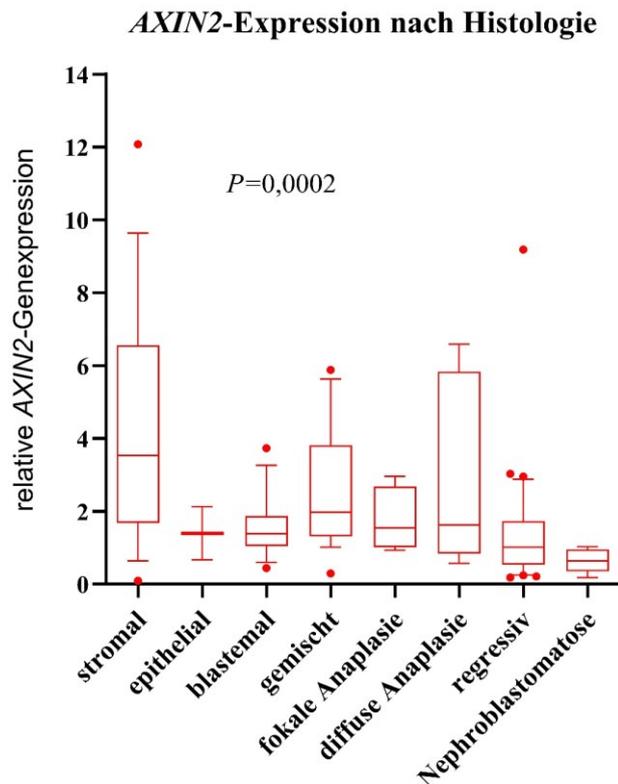


Abbildung 13: Relative Genexpression von *AXIN2* (101 WT-Proben) gruppiert nach Histologie in stromal (17 WT-Proben), epithelial (2 WT-Proben), blastemal (14 WT-Proben), gemischt (19 WT-Proben), fokaler Anaplasie (4 WT-Proben), diffuser Anaplasie (7 WT-Proben), regressiv (32 WT-Proben) und Nephroblastomatose (5 WT-Proben). Berechnet in Relation zum Haushaltsgen *TBP* und dargestellt in Boxplots mit Ausläufern von der 9.-91. Perzentile. Die mediane Expression ist jeweils als horizontale Linie dargestellt.

Für eine genauere Eingrenzung, welche histologische Typen eine signifikant abweichende *AXIN2*-Expression aufweisen, wurden die Gruppen mit ihrer *AXIN2*-Genexpression je einzeln den restlichen WT-Proben gegenübergestellt und mittels Mann-Whitney-U-Test überprüft und das Signifikanzniveau bestimmt.

Da unsere Kohorte lediglich zwei WT mit epithelialer Histologie beinhaltet, wurde von einer Analyse der epithelialen WT abgesehen. Es zeigte sich für WT vom stromalen ( $p = 0,0004$ ), gemischten ( $p = 0,0252$ ), regressiven ( $p = 0,0004$ ) Typen, sowie für die Nephroblastomatose ( $p = 0,0065$ ) eine signifikante Abweichung der Expression von *AXIN2* im Vergleich zu den jeweils restlichen WT-Proben. WT mit stromaler und gemischter Histologie zeigten eine signifikant vermehrte Expression von *AXIN2*, während die Expression in regressiv veränderten WT und solchen mit Nephroblastomatose signifikant vermindert war. Die Ergebnisse sind in Abbildung 14 dargestellt.

Zu erwähnen ist jedoch, dass nur 5 Proben ausschließlich eine Nephroblastomatose aufwiesen und auch die restlichen Fallzahlen eher klein waren, sodass die Ergebnisse vor diesen Hintergrund gestellt und interpretiert werden müssen. Wie in Tabelle 18 durch Angabe der Standardabweichung verdeutlicht, unterliegen die Messwerte einer starken Streuung.

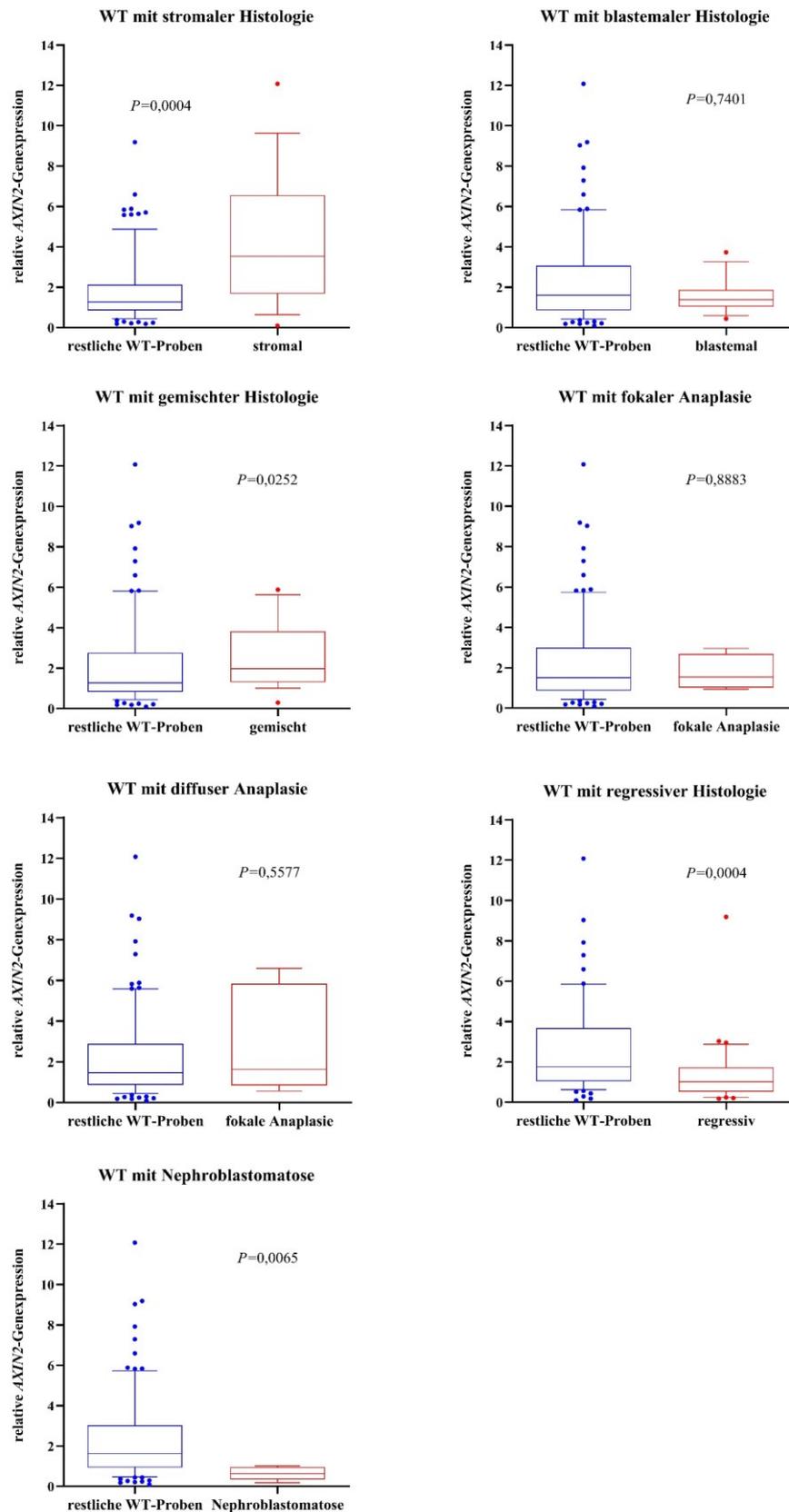


Abbildung 14: Relative Genexpression von *AXIN2* für einzelne histologische Gruppen im Vergleich mit den jeweils restlichen WT-Proben. Berechnet in Relation zum Haushaltgen *TBP* und dargestellt als Boxplots mit Ausläufern von der 9.-91. Perzentile. Die mediane Expression ist jeweils als horizontale Linie dargestellt.

Tabelle 18: Übersicht *AXIN2*-Expression und Histologie; rote Markierung: signifikant unterexprimiert, blaue Markierung: signifikant überexprimiert

Histologischer Typ	Anzahl WT	<i>AXIN2</i> -Expression (Median – 3x SD)	p-Wert (Mann-Whitney-U-Test)
<b>stromal</b>	17	3,53 ± 3,25	0,0004
<b>epithelial</b>	2	1,39 ± 1,03	
<b>blastemal</b>	14	1,38 ± 0,85	0,7401
<b>gemischt</b>	19	1,97 ± 1,78	0,0252
<b>fokale Anaplasie</b>	4	1,55 ± 0,89	0,8883
<b>diffuse Anaplasie</b>	7	1,63 ± 2,73	0,5577
<b>regressiv</b>	32	1,01 ± 1,61	0,0004
<b>Nephroblastomatose</b>	5	0,63 ± 0,33	0,0065
<b>unbekannt</b>	1		

### 5.5.2 *SFRP1*-Expression und Histologie

Auch die signifikant verminderte Expression von *SFRP1* wurde hinsichtlich der Histologie gruppiert. Hierfür wurde wie in 5.5.1 die *SFRP1*-Expression zwischen den histologischen Gruppen mittels Kruskal-Wallis-Test verglichen. Dabei zeigten sich, wie in Abbildung 15 dargestellt, keine signifikanten Unterschiede ( $p = 0,4191$ ). Somit gibt es keinen Zusammenhang zwischen einer abnorm verminderten Expression von *SFRP1* und der histologischen Ausprägung in WT. Eingeschränkte Aussagekraft besteht bezüglich der Nephroblastomatose, blastemaler und fokaler anaplastischer WT, da hier jeweils nur eine Probe analysiert wurde.

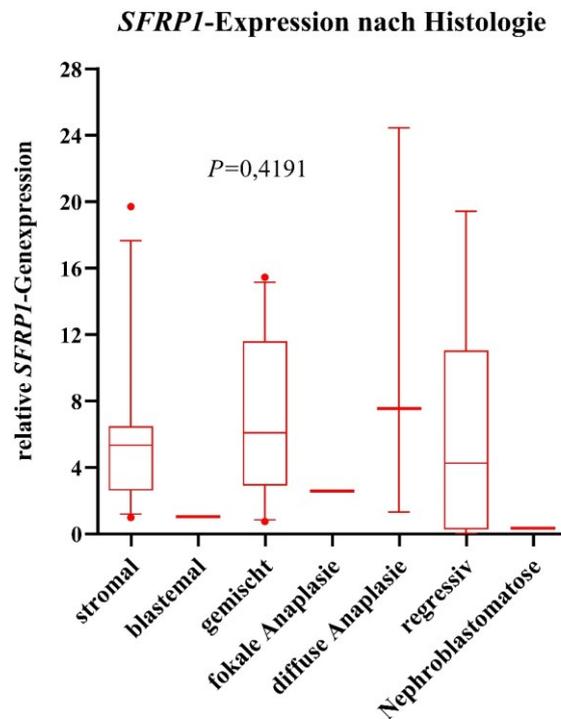


Abbildung 15: Relative Genexpression von *SFRP1* (36 WT) gruppiert nach Histologie in stromal (11 WT), blastemal (1 WT), gemischt (10 WT), fokaler Anaplasie (1 WT), diffuser Anaplasie (3 WT), regressiv (9 WT) und Nephroblastomatose (1 WT).

Berechnet in Relation zum Haushaltsgen *TBP* und dargestellt als Boxplots mit Ausläufern von der 9.-91. Perzentile. Die mediane Expression ist jeweils als horizontale Linie dargestellt.

### 5.5.3 *CTNNB1*-Mutation und Histologie

Mittels Fisher's-Exact-Test wurde untersucht, ob eine Assoziation zwischen den *CTNNB1*-Mutationen und der Histologie der WT vorliegt (Abbildung 16 A). Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen Mutation und Histologie ( $p = 0,0849$ ). Jedoch traten fünf der sieben Mutationen in WT mit stromaler Histologie auf. So ließ sich im Vergleich der stromalen WT mit den restlichen WT ein signifikanter Unterschied aufzeigen, was die Aussage zulässt, dass stromale WT gegenüber anderen Histologie eher mit einer Mutation in *CTNNB1* assoziiert sind ( $p = 0,0014$ ) (Abbildung 16 B).

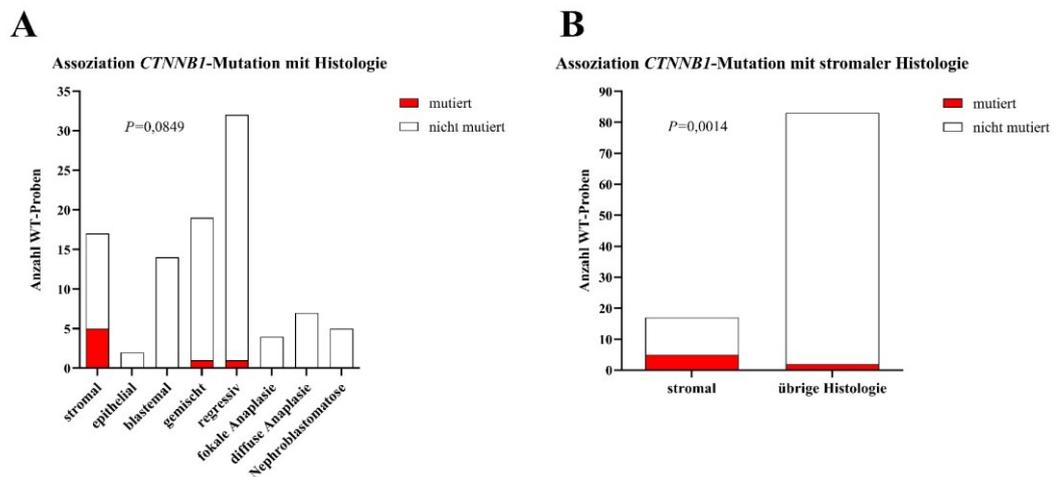


Abbildung 16: Balkendiagramm zur Darstellung der WT mit (rot) und ohne (weiß) Mutation im *CTNNB1*-Gen.

A) Aufstellung aller Histologien.

B) stromale und übrige Histologien.

Durchgeführt wurde der Fisher's-Exact-Test zur Ermittlung einer Assoziation zwischen *CTNNB1*-Mutation und Histologie der WT.

## 5.6 Statistische Analyse der Expressions- und Mutationsergebnisse in Bezug auf die klinischen Parameter

### 5.6.1 *AXIN2*-Expression und klinische Parameter

Im Weiteren sollte untersucht werden, ob es signifikante Unterschiede der *AXIN2*-Expression von den betroffenen Kindern mit bzw. ohne Metastasierung, Rezidiv, neoadjuvanter Chemotherapie, bilateralem oder unilateralem Auftreten gibt und ob die Überexpression bei Mädchen oder Jungen häufiger vorkommt. Eine Auflistung der WT nach ihren klinischen Parametern ist in Tabelle 19 gezeigt. Es wurde jeweils der Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Es konnte zwischen keiner der Gruppen ein signifikanter Unterschied ermittelt werden (Abbildung 17).

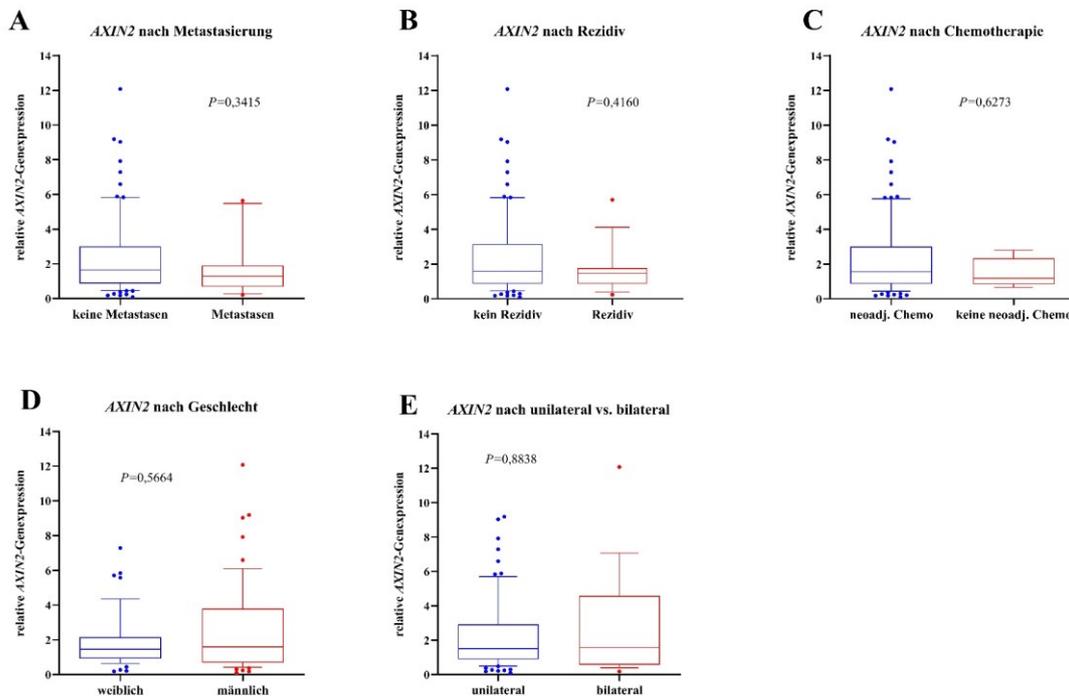


Abbildung 17: Relative Genexpression von *AXIN2* verglichen für klinische Gruppen:

A) mit (16 WT) und ohne Metastasierung (83 WT).

B) mit (17 WT) und ohne Rezidiv (84 WT).

C) mit (94 WT) und ohne neoadjuvante Chemotherapie (6 WT).

D) weiblich (45 WT) und männlich (56 WT).

E) unilateral (84 WT) und bilateral (17 WT).

Berechnet in Relation zum Haushaltsgen *TBP* und dargestellt als Boxplots mit Ausläufern von der 9.-91. Perzentile. Die mediane Expression ist jeweils als horizontale Linie dargestellt.

Weiterhin wurde untersucht, ob es eine Korrelation zwischen der AXIN2-Überexpression und dem Diagnosealter gibt, ob also eher bei früh oder spät auftretenden WT die Aktivierung des WNT/ $\beta$ -Catenin-Signalweges eine Rolle spielen könnte. Hier ließ sich, wie in Abbildung 18 gezeigt, jedoch keine Korrelation nachweisen ( $r = -0,1713$ ,  $p = 0,0901$ ).

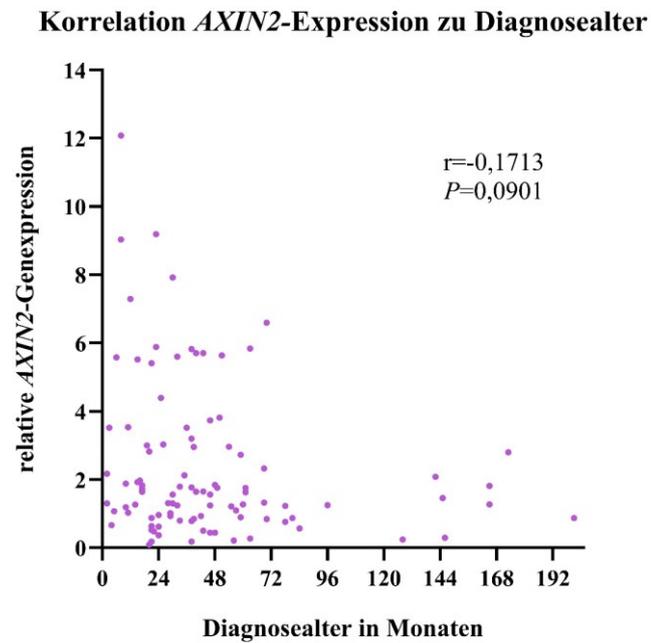


Abbildung 18: Korrelation der AXIN2-Expression zum Diagnosealter in Monaten für 99 WT.

Zur Darstellung und Untersuchung des Überlebens in Bezug auf die WNT/ $\beta$ -Catenin-Signalweg-Aktivierung, wurde eine Kaplan-Meier-Kurve erstellt (Abbildung 19 A). Es zeigten sich im Log-Rank-Test keine signifikanten Unterschiede im Überleben zwischen *AXIN2*-überexprimierten und nicht-überexprimierten WT ( $p = 0,8577$ ). Weiterhin zeigte die *AXIN2*-Expression keinen signifikanten Unterschied im Mann-Whitney-U-Test zwischen den WT, welche bis zum Zeitpunkt der letzten Nachverfolgung (27.04.2017) überlebten und den WT welche innerhalb des Zeitraumes verstarben ( $p = 0,7820$ ) (Abbildung 19 B). WT mit aktiviertem WNT/ $\beta$ -Catenin-Signalweg scheinen demzufolge keine schlechtere Prognose hinsichtlich des Überlebens aufzuweisen.

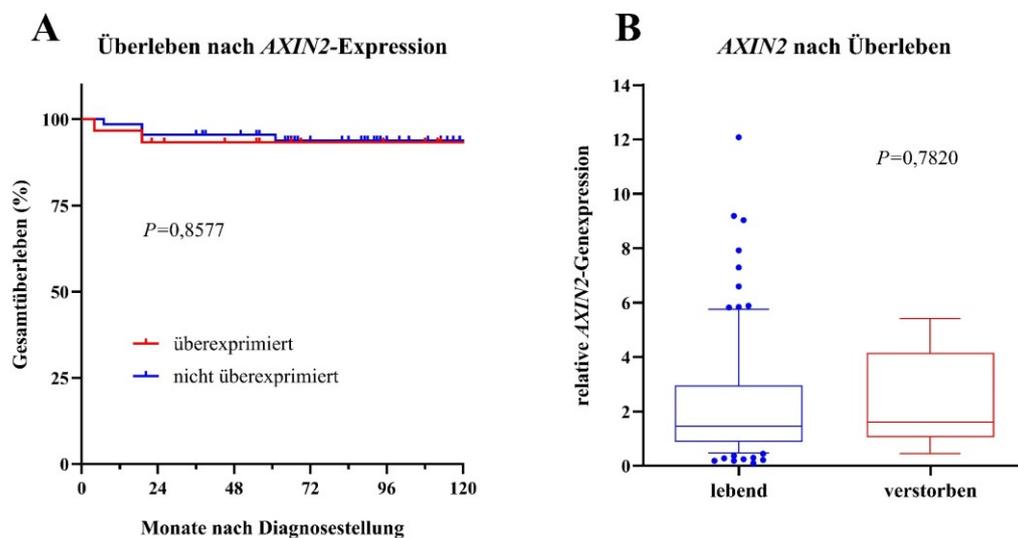


Abbildung 19: A) Kaplan-Meier-Kurve mit Vergleich des Gesamtüberlebens zwischen WT mit (rot) und ohne (blau) Überexpression von *AXIN2*; das Signifikanzniveau wurde mittels Log-Rank-Test bestimmt.

B) Vergleich der relativen Genexpression von *AXIN2* von WT hinsichtlich des Überlebens; Berechnet in Relation zum Haushaltsgen *TBP* und dargestellt als Boxplots mit Ausläufern von der 9.-91. Perzentile. Die mediane Expression ist als horizontale Linie dargestellt.

Tabelle 19: *AXIN2*-Expression nach klinischen Parametern

<b>Klinik</b>		<b>Anzahl WT</b>	<b><i>AXIN2</i>-Expression (Median <math>\pm</math> SD)</b>	<b>p-Wert (Mann-Whitney-U-Test)</b>
<b>Metastasierung</b>	ja	16	1,29 $\pm$ 1,63	p = 0,3415
	nein	83	1,64 $\pm$ 2,36	
	unbekannt	2		
<b>Rezidiv</b>	ja	17	1,46 $\pm$ 1,30	p = 0,4160
	nein	84	1,60 $\pm$ 2,40	
<b>Neoadj. Chemotherapie</b>	ja	94	1,56 $\pm$ 2,30	p = 0,6273
	nein	6	1,18 $\pm$ 0,83	
	unbekannt	1		
<b>Geschlecht</b>	weiblich	45	1,46 $\pm$ 1,55	p = 0,5664
	männlich	56	1,60 $\pm$ 2,67	
<b>Bilateral</b>	ja	17	1,56 $\pm$ 3,06	p = 0,8838
	nein	84	1,51 $\pm$ 2,08	
				<b>p-Wert (Spearman-Korrelation)</b>
<b>Diagnosealter</b>		99		p = 0,0901
				<b>p-Wert (Log-Rank-Test)</b>
<b>Überleben</b>	nein	6	1,59 $\pm$ 1,86	p = 0,8577
	ja	93	1,46 $\pm$ 2,30	
	unbekannt	2		

### 5.6.2 *SFRP1*-Expression und klinische Parameter

Auch für *SFRP1* wurde untersucht, ob es signifikante Unterschiede in der Expression zwischen WT-Gruppen mit verschiedenen klinischen Merkmalen gibt (mit und ohne Metastasierung, Rezidiv und kein Rezidiv, Geschlecht, bilateral und unilateral). Alle WT, die auf ihre *SFRP1*-Expression untersucht wurde, erhielten präoperativ eine Chemotherapie, sodass es hier keine Vergleichsgruppe gab. Die Anzahl der eingeschlossenen WT gruppiert nach den klinischen Merkmalen ist Tabelle 20 zu entnehmen.

Für *SFRP1* konnten mittels Mann-Whitney-U-Test keine signifikanten Unterschiede zwischen den jeweiligen Gruppen ermittelt werden (Abbildung 20).

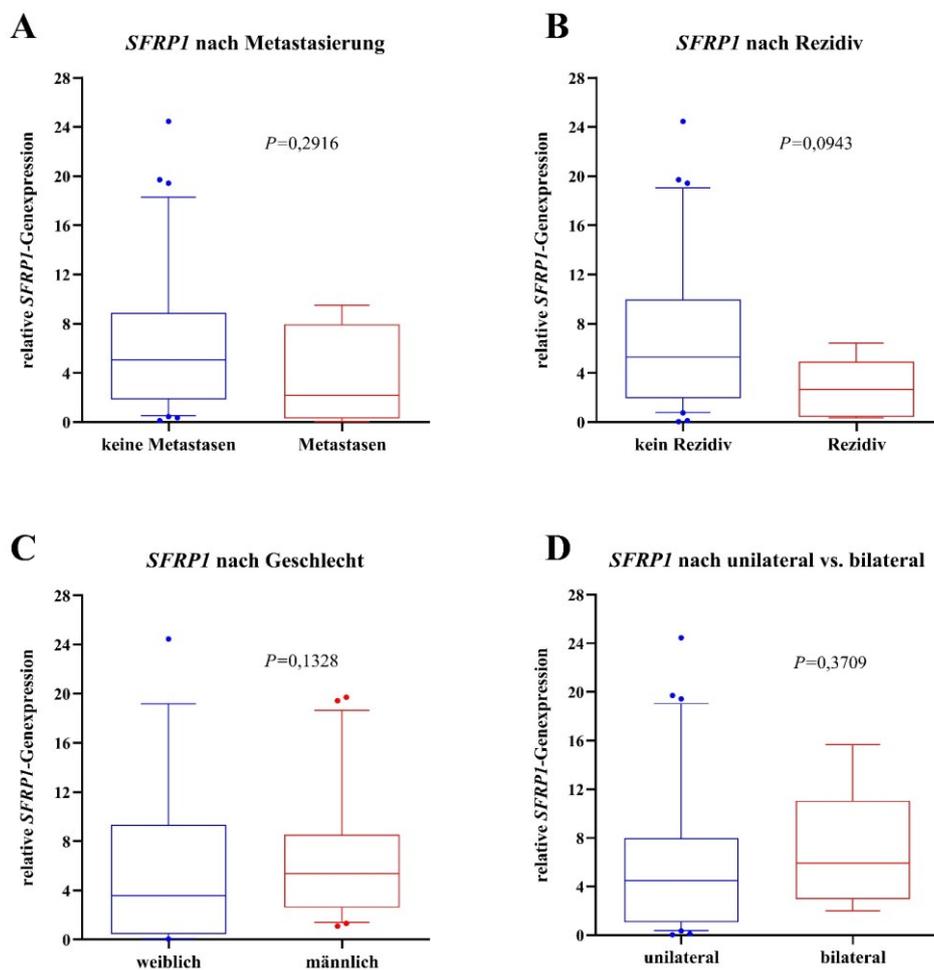


Abbildung 20: Relative Genexpression von *SFRP1* verglichen für klinische Gruppen:

A) mit (4 WT) und ohne Metastasierung (32 WT).

B) mit (6 WT) und ohne Rezidiv (30 WT).

C) weiblich (15 WT) und männlich (21 WT).

D) unilateral (30 WT) und bilateral (6 WT).

Dargestellt in Boxplots von der 9. – 91. Perzentile. Die mediane Expression ist jeweils als horizontale Linie dargestellt.

Auch eine Korrelation zwischen dem Diagnosealter und der *SFRP1*-Expression konnte mittels Spearman-Korrelation ( $r = -0,08422$ ;  $p = 0,6253$ ) ausgeschlossen werden (Abbildung 21).

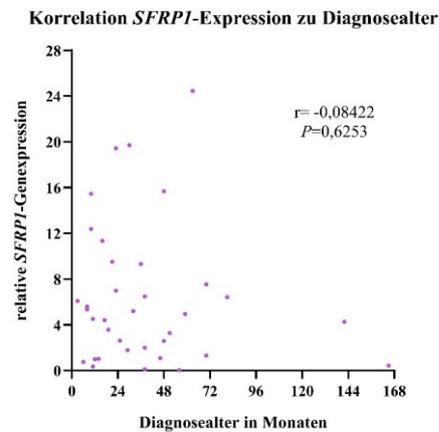


Abbildung 21: Korrelation der *SFRP1*-Expression zum Diagnosealter in Monaten für 36 WT.

Eine Beziehung zwischen den klinischen Parametern, welche uns zur Analyse vorlagen, und dem Expressionsmuster der untersuchten Gene, konnte nicht nachgewiesen werden.

Tabelle 20: *SFRP1*-Expression nach klinischen Parametern

<b>Klinik</b>		<b>Anzahl WT</b>	<b><i>SFRP1</i>-Expression (Median <math>\pm</math> SD)</b>	<b>p-Wert (Mann-Whitney-U-Test)</b>
<b>Metastasierung</b>	ja	4	2,19 $\pm$ 4,24	p = 0,2916
	nein	32	5,06 $\pm$ 6,30	
<b>Rezidiv</b>	ja	6	2,64 $\pm$ 2,55	p = 0,0943
	nein	30	5,27 $\pm$ 6,44	
<b>Geschlecht</b>	weiblich	15	3,57 $\pm$ 7,03	p = 0,1328
	männlich	21	5,35 $\pm$ 5,55	
<b>Bilateral</b>	ja	6	5,91 $\pm$ 4,96	p = 0,3709
	nein	30	4,46 $\pm$ 6,42	
				<b>p-Wert (Spearman-Korrelation)</b>
<b>Diagnosealter</b>		36		p = 0,6253

## 6 Diskussion

2012 wurde in Rom im Kongress zum Renal Tumors Biology-Driven Drug Development der WNT/ $\beta$ -Catenin-Signalweg stärker ins Auge gefasst. Der Entwicklung von Medikamenten mit dem Ziel die abnorme Aktivierung des Signalwegs zu beeinflussen, wurde ein riesiges Potenzial für die Therapie des WT zugesprochen [62, 89, 90]. Dies wurde aus der Forschung bezüglich anderer Malignome, wie dem kolorektalen oder hepatozellulären Karzinom, abgeleitet [68]. Bei diesen Tumorarten ist eine Dysregulation des WNT/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs bekannt. Zudem weiß man auch, dass in circa 15-20 % der nicht-anaplastischen WT das  $\beta$ -Catenin verändert ist [62]. Es wird beschrieben, dass eine abnorm erhöhte Transkription mit resultierender Akkumulation des  $\beta$ -Catenins zu einem verminderten Wnt-4-Signal führt. Dieses ist innerhalb der Nephrogenese ein wichtiges Signal und essenziell für den mesenchymal-epithelialen Übergang. Eine Störung in der Signalkette durch akkumuliertes  $\beta$ -Catenin kann die terminale Differenzierung in der Nephrogenese blockieren [46, 90, 91].

Um die Rolle eines veränderten WNT/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs in einer großen Kohorte von 101 WT zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit als erster Schritt die Transkriptionsrate eines bekannten Zielgens, *AXIN2*, untersucht. Bei Aktivierung des WNT/ $\beta$ -Catenin-Signalweges scheint nach Valenta et al. *AXIN2* quantitativ am stärksten exprimiert zu werden. Jedoch führt es scheinbar durch Auslösung eines negativen Feedbacks auch zum Abbau des  $\beta$ -Catenins [92]. Interessanterweise konnte auch in dieser Arbeit eine deutliche Überexpression ( $p < 0,0001$ ) in WT gegenüber dem Kontrollgewebe gesehen werden (Abbildung 7). 31 % der WT zeigten eine Expression  $> 3$  Standardabweichungen des Medians der Kontrollen. Diese starke Überexpression als Zeichen einer übermäßigen Aktivierung des WNT/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs ist deutlich häufiger als in der bisherigen Literatur z.B. durch Perotti et al. beschrieben [62]. Eine potenzielle Ursache für diese Divergenz könnte das unterschiedliche Probenmaterial darstellen. In unseren WT-Proben stellten die stromal differenzierten Tumoren mit 16,83 % die dritthäufigste Histologie nach regressiv veränderten Zellen und gemischter Histologie dar. Bekannt ist, dass in stromalen WT häufiger eine WNT/ $\beta$ -Catenin-Signalweg-Aktivierung auftritt als in Tumoren mit anderer Histologie [62]. Ein weiterer Grund könnten unterschiedliche Behandlungsstrategien darstellen. Werden Kinder nach SIOP-Schema präoperativ einer Chemotherapie unterzogen, kann es zu molekularen Veränderungen kommen, in Wilms-Tumoren zum Beispiel nachgewiesen für Genen wie *DROSHA*, *SIX1*, *SIX2* oder *DGCR8* [38]. Zwar wurde eine Dysregulation des WNT/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs in diesem Zusammenhang noch nicht beschrieben, könnte theoretisch zu diesen unterschiedlichen Expressionsergebnissen führen.

Jedoch bestätigt das Ergebnis, wie bereits bekannt, dass der WNT/ $\beta$ -Catenin-Signalweg auch in Wilms-Tumoren weiterhin beachtet werden sollte, da er in einem erheblichen Anteil dysreguliert ist.

## 6.1 Ursachen der *AXIN2*-Überexpression

Ein Mechanismus, der bekanntlich zur Überaktivierung des WNT/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs führt, sind Mutationen auf Exon 3 des *CTNNB1*. Durch diese Mutationen fehlen am N-Terminus des  $\beta$ -Catenins wichtige regulatorische Phosphorylierungsstellen für seinen Abbau [46]. Solche Mutationen sind unter anderem in Hepatoblastomen, Prostata-, Endometrium- und Ovarialkarzinomen sowie in Melanomen bekannt [47]. Koesters et al. beschrieben für WT eine Mutationsrate von 15 % [46]. In einer Studie der TARGET Initiative stellte in einer genomweiten Sequenzierung von WT mit hoher Malignität die Mutation von *CTNNB1* die am häufigsten auftretende Mutation mit 13,5 % dar [93].

In der hier vorliegenden Kohorte konnte jedoch nur bei sieben der Proben eine Mutation des *CTNNB1* detektiert werden (Abbildung 8 A), was lediglich 6,9 % entspricht und somit deutlich geringer ist, als in der Literatur beschrieben. Sechs der detektierten Mutationen betrafen Ser45, eine der Phosphorylierungsstellen des  $\beta$ -Catenins und äußerst wichtig für seinen Abbau [65]. Eine Mutation in diesem Bereich führt zur Akkumulation von  $\beta$ -Catenin im Zellkern und somit zur vermehrten Transkription von kritischen Zielgenen und auch *AXIN2*. Dies konnte für fünf der Proben mit mutiertem *CTNNB1* gezeigt werden, bei denen die Transkriptionsrate für das Zielgen *AXIN2* signifikant erhöht war. Es ließ sich ein signifikanter Unterschied ( $p = 0,0160$ ) Unterschied zwischen WT mit und ohne Mutation in Exon 3 des *CTNNB1* nachweisen (Abbildung 8 B). Dies stärkt die These, dass die *CTNNB1*-Mutationen Auslöser der Signalweg-Aktivierung sein können.

In zwei der Proben mit *CTNNB1*-Mutation konnte keine erhöhte Expression von *AXIN2* festgestellt werden. Möglich wäre, dass die Mutationen hier durch andere Mechanismen kompensiert wurden. Außerdem ist bekannt, dass *CTNNB1*-Mutationen häufig gemeinsam mit *WT1*-Mutationen auftreten [94]. Unter anderem wird vermutet, dass zur Tumorentstehung zusätzlich zu einer *WT1*-Mutation eine *CTNNB1*-Mutation hinzukommen muss und diese nicht allein durch eine *WT1*-Mutation ausgelöst werden kann. In umgekehrter Weise wurde dies bisher nicht berichtet, jedoch ist anzunehmen, dass in den 2 WT ohne nachgewiesene abnorme WNT/ $\beta$ -Catenin-Signalweg-Aktivierung eine weiterer genetische oder epigenetische Veränderung fehlt, die von uns nicht ermittelt werden konnte. Ob in diesen Fällen die Mutation des  $\beta$ -Catenins zur Tumorentstehung führt, ist nicht klar.

Zu erwähnen ist, dass in unserer Studie nur Exon 3 auf Mutationen untersucht wurde, während zum Beispiel bei Gadd et al. eine genomweite Sequenzierung stattfand und hier ca. 20 % der

*CTNNB1*-Mutationen auf Exon 8 gefunden wurden. Weiterhin unterschied sich das Untersuchungsmaterial deutlich, da Gadd. et al. ausschließlich WT mit hoher Malignität einschlossen, welche bei uns lediglich ca. 21 % ausmachten [93]. Daraus könnte geschlossen werden, dass der WNT/ $\beta$ -Catenin-Signalweg in der Tumorentstehung von WT mit hoher Malignität eine größere Rolle spielt als in übrigen WT. In unserer Kohorte zeigten blastemale und diffus anaplastisch veränderte WT jedoch keine *CTNNB1*-Mutation.

Auffällig war, dass alle WT mit *CTNNB1*-Mutation und *AXIN2*-Überexpression eine stromale Histologie aufwiesen. Die übrigen zwei WT mit *CTNNB1*-Mutation ohne vermehrte *AXIN2*-Expression zeigten eine gemischte und regressive Histologie. Dies bestätigt weiter, wie schon bekannt, dass eine WNT/ $\beta$ -Catenin-Signalweg-Aktivierung in stromalen Tumoren gehäuft vorkommt und hier auch eine *CTNNB1*-Mutation häufiger zu finden ist. Jedoch muss insgesamt die geringe Anzahl der Proben, die diese Veränderungen aufwiesen (7 WT), beachtet werden.

Da in nur 15 % der WT mit WNT/ $\beta$ -Catenin-Signalwegaktivierung simultan eine *CTNNB1*-Mutation vorliegt, muss es noch andere Mechanismen in WT geben, die zur Aktivierung führen. Gadd et al. wiesen für *AMER1* in 5,8 % der untersuchten WT eine Mutation nach [93]. *AMER1* codiert für ein Protein, welches durch Beteiligung am Abbau des  $\beta$ -Catenins den WNT/ $\beta$ -Catenin-Signalweg hemmt und somit als Tumorsuppressorgen fungiert [95]. Und auch Mutationen in *WTF1* konnten in derselben genomweiten Sequenzierung in 6,3 % der untersuchten WT gefunden werden. Auch dies stellt nur einen kleinen weiteren Anteil der WT mit Signalweg-Aktivierung dar. Eine Beteiligung des Tumorsuppressorgens *APC* an der WT-Entstehung wäre naheliegend, da es das am häufigsten mutierte Gen in menschlichen Tumorzellen [96] und wichtiger Bestandteil des DK ist. Dieser nimmt im WNT/ $\beta$ -Catenin-Signalweg mit Beteiligung am Abbau des  $\beta$ -Catenins eine wichtige Rolle ein. Esteller et al. beschreiben epigenetische Veränderungen der *APC*-Promotorregion in bis zu 18 % [97]. Dies war eine neue interessante Entdeckung in kolorektalen und anderen Karzinomen. Wir untersuchten deshalb die Promotorregion von *APC* auf veränderte CpG-Methylierung und weiterhin, ob eine veränderte *APC*-Expression vorliegt. Es zeigte sich jedoch weder eine signifikante Änderung der *APC*-Expression, noch eine veränderte Promotor-Methylierung in den untersuchten WT (Abbildung 9). Auch konnten innerhalb der histologischen Gruppen im WT keine signifikanten Unterschiede der *APC*-Expression und -Methylierung nachgewiesen werden. Dass in einigen WT mit stromaler und epithelialer Histologie *APC* vermehrt methyliert sein soll, konstatierten Lai et al. [98]. In der Studie wurden jedoch nur 6 WT untersucht, was die Aussagekraft im Vergleich zu unseren Untersuchungen mit 101 WT in Frage stellt. Auch konnte in WT bisher nur Mutationen in unbedeutender Anzahl oder gar nicht im *APC* nachgewiesen werden [93, 99]. Ein Hinweis, dass *APC* trotzdem an der Überregulation des WNT/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs beteiligt sein könnte, liefert die Gruppe um Maschietto et al. Sie

zeigten eine stark erhöhte Präsenz von APC im Zellkern in WT, wogegen es im reifen Nierengewebe weniger vorkommt [100]. Da APC im Zellkern seiner Funktion beim Abbau des  $\beta$ -Catenins weniger nachkommen kann, könnte es in Folge der Verlagerung zu einer Akkumulation von  $\beta$ -Catenin im Zellkern mit erhöhter Expression der Zielgene kommen. Diese These wurde bisher jedoch nicht weiterverfolgt.

Dagegen ist die abweichende Methylierung von Genen ein vielversprechender Ansatz für weitere Forschung und stellt in WT am Genlocus von *H19* die am häufigsten bisher bekannte molekulare Veränderung dar [101]. Auch für weitere Gene, wie *TP73*, *WT1*, *RPS6KA4/MIR1237* und *AURKC* konnte eine veränderte Methylierung gezeigt werden, jedoch bisher bei keinem am WNT/ $\beta$ -Catenin-Signalweg beteiligtem Gen [102].

Wichtige am WNT/ $\beta$ -Catenin-Signalweg beteiligte Gene stellen die *SFRP* dar. Sie bestehen im Menschen aus fünf Typen, wobei *SFRP3* das Ortholog des Frizzled-related-Proteins der *Drosophila* darstellt. Dieses wurde als erstes Protein der Gruppe mit seiner antagonistischen Wirkung auf den WNT/ $\beta$ -Catenin-Signalweg entdeckt [103, 104]. Dies geschieht durch Bindung an Wnt-Liganden, welche in Folge nicht an Fz-Rezeptoren binden können und die Aktivierung des Signalwegs ausbleibt. *SFRP1-5* werden deshalb auch zur Gruppe der Tumorsuppressoren gezählt. Jedoch gibt es Hinweise darauf, dass sich die Wirkungsweise abhängig von der lokalen Konzentration verändern kann. Für *SFRP2* wurde gezeigt, dass wenn es in hoher Konzentration vorliegt, Wnt-Liganden blockiert werden können und die WNT/ $\beta$ -Catenin-Signalweg-Aktivierung ausbleibt. In niedriger Konzentration soll *SFRP2* durch direkte Bindung an den Fz-Rezeptor zu einer Aktivierung des Signalwegs führen [105]. Unter welchen Bedingungen dies geschieht ist jedoch noch nicht bekannt.

Im WT und auch anderen Tumoren sind bisher keine Mutationen bekannt, welche zum Funktionsverlust der verschiedenen *SFRP* führen. In vielen Tumoren, wie beispielsweise Brust-, Nieren- und Ovarial-Karzinomen ist jedoch eine stark verminderte Expression der *SFRP* beschrieben [79]. In unseren Untersuchungen konnte dies allein für *SFRP1* festgestellt werden (Abbildung 11), nicht für *SFRP2,4,5*. Jedoch wurde nur bei 3 der 11 WT-Proben mit Unterexpression gleichzeitig eine *AXIN2*-Überexpression festgestellt. Dies impliziert, dass eine verminderte Expression von *SFRP1* nicht zwingend zur WNT/ $\beta$ -Catenin-Signalweg-Aktivierung führt. Eventuell sind andere Mechanismen vorhanden, die der Aktivierung entgegenwirken. Auch stellen diese Befunde in Frage, ob alle *SFRP*, wie zuvor für *SFRP2* beschrieben, in verminderter Konzentration eine direkte Aktivierung des Signalwegs herbeiführen können. Zu erwähnen ist jedoch die im Vergleich zur *AXIN2*-Expressionsanalyse geringe Anzahl an untersuchten WT-Proben. Um einen klaren Zusammenhang darlegen oder widerlegen zu können, sollten alle WT, welche der *AXIN2*-Expressionsanalyse unterzogen wurden, auch auf ihre *SFRP1*-Expression untersucht werden. Dies war leider nicht möglich, da das Material nicht ausreichte. Es könnte durch diese Einschränkung zur Verzerrung der

Ergebnisse kommen. 19 der 31 WT-Proben mit angenommener WNT/ $\beta$ -Catenin-Signalweg-Aktivierung waren jedoch in der Kohorte zur Expressionsanalyse von *SFRP1* eingeschlossen, sodass hier eine mögliche Korrelation hätte nachgewiesen werden können, was jedoch nicht der Fall war (Abbildung 11).

Eine Ursache für die festgestellte Unterexpression könnte auch hier eine epigenetische Veränderung in Form einer veränderten Promotor-Methylierung des *SFRP1* sein. Verstärkte Methylierung ist in verschiedenen Tumoren wie Brust-, Ovarial- oder klarzelligem Nierenkarzinomen bekannt und auch eine damit einhergehende Akkumulation von  $\beta$ -Catenin als Zeichen der Aktivierung des WNT/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs konnte nachgewiesen werden [75]. Für WT gab es dazu bisher keine Daten. In unserer Methylierungsanalyse konnte keine abweichende Methylierung in der untersuchten Genregion des *SFRP1* in 23 WT im Vergleich zu gesundem Nierengewebe nachgewiesen werden. Die Methylierungsrate lag innerhalb der WT bei nur 2,44 %, obwohl die untersuchte Kohorte 9 der Proben mit Unterexpression von *SFRP1* beinhaltete. Es lässt sich in unserer Gruppe der WT also nicht wie in vielen anderen Tumoren bestätigen, dass eine Hypermethylierung zur Unterexpression des *SFRP1* führt (Abbildung 11). Die Frage, weshalb die *SFRP1*-Expression in WT signifikant von der in normalem Nierengewebe abweicht, welche Folgen dies für den Organismus bedeutet und ob *SFRP1* in WT als Onkogen fungiert, bleibt weiterhin offen. Auch hier bedarf es noch weiterer Untersuchungen in größeren Kohorten.

Für die restlichen *SFRP* wurde keine signifikant verringerte Expression in WT festgestellt. Es zeigte sich jedoch im Vergleich zum gesunden Nierengewebe eine signifikant erhöhte Expression für *SFRP2* und *SFRP4*. Eine Erklärung hierfür könnte der Mechanismus des negativen Feedbacks sein. Als Folge der verstärkten Aktivierung des WNT/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs könnte die Expression der genannten Gene gesteigert werden, um deren antagonistische Wirkung auf den Signalweg zu verstärken und der übermäßigen Aktivierung entgegenzuwirken.

Jedoch muss die starke Streuung bei der Expressionsanalyse von *SFRP2, 4, 5* beachtet werden. Warum hier eine solche Divergenz der Werte besteht, welche bei der Untersuchung von normalem Nierengewebe nicht festgestellt werden konnte, ist nicht genau nachvollziehbar. Die Messungen wurden mehrfach wiederholt, jedoch mit derselben cDNA. Eine neue RNA-Isolation aus dem Tumorgewebe wurde nicht durchgeführt, hätte zur Sicherung der Ergebnisse ggf. noch ergänzt werden können. Jedoch spielen sie für unsere Fragestellung eine untergeordnete Rolle, da vor allem eine signifikante Unterexpression der Gene von Interesse gewesen wäre.

## 6.2 Zusammenhänge zwischen den Expressions-/ Mutationsergebnissen und den histologischen und klinischen Ausprägungen

Es wird immer wichtiger Tumorentstehung und -wachstum auf genetischer und zellulärer Ebene zu verstehen. Es lassen sich so individuelle Therapiemöglichkeiten und Prognosen ableiten, die das Outcome der betroffenen Kinder verbessern. Bisher ist wenig bekannt zum Phänotyp von WT, die eine Dysregulation des WNT/ $\beta$ -Catenin-Signalweg aufweisen. Für unsere Proben wurde deshalb versucht, eine Assoziation zwischen den neuen Ergebnissen und den uns vorliegenden klinischen Parameter festzustellen.

WT werden hinsichtlich ihrer Histologie in Risikogruppen eingeteilt (Tabelle 5). Vor allem WT mit diffuser Anaplasie und mit blastemaler Histologie nach neoadjuvanter Chemotherapie stellen eine Gruppe mit bekanntlich schlechter Prognose dar [38]. Bisher ist in dieser Kohorte noch keine vermehrte Aktivierung im WNT/ $\beta$ -Catenin-Signalweg beschrieben worden. Dies konnte auch in den von uns geprüften WT nicht festgestellt werden. Die *AXIN2*-Überexpression war lediglich in stromalen und gemischten WT nachweisbar (Abbildung 14). Ein Zusammenhang zwischen der WNT/ $\beta$ -Catenin-Signalweg-Aktivierung und stromaler Histologie wurde bereits in der Vergangenheit mehrfach beschrieben [62, 63]. Auch *CTNNB1*-Mutationen treten vermehrt in stromalen WT auf [63], was sich auch in unseren Untersuchungen zeigte mit 71 % stromaler WT innerhalb der Gruppe mit nachgewiesener Mutation.

Die WT mit definitionsgemäß gemischter Histologie weisen jeweils auch gewisse Anteile an stromaler Histologie auf. Es könnte vermutet werden, dass die vermehrte WNT/ $\beta$ -Catenin-Signalweg-Aktivierung auf diese Anteile zurückzuführen sind. Jedoch konnte in unserer Analyse die Expressionsraten zwischen den einzelnen histologischen Anteilen in gemischten WT nicht abgegrenzt werden. Dagegen zeigte sich in WT mit ausschließlich Nephroblastomatose und regressiver Histologie eine signifikant verminderte Expression von *AXIN2*. Ursache in regressiven WT könnte die neoadjuvante Chemotherapie sein, die auch den WNT/ $\beta$ -Catenin-Signalweg blockieren und stören könnte.

Die Nephroblastomatose stellt eine Vorstufe des WT dar. Es wird angenommen, dass aus den nephrogenen Resten die entarteten WT-Zellen entstehen können. Intralobäre Reste wurden in Verbindung mit WNT/ $\beta$ -Catenin-Signalweg-Aktivierung und spezifischer vor allem in WT mit *WT1*-, *CTNNB1*-Mutation und 11p15 LOH gestellt [64]. Dies konnte in unserer kleinen Kohorte nicht festgestellt werden. Die *AXIN2*-Expression war signifikant vermindert und auch *CTNNB1*-Mutationen konnten nicht belegt werden innerhalb der Nephroblastomatose. In unseren Untersuchungen könnte bemängelt werden, dass die Nephroblastomatose als eigene histologische Klasse der WT gesehen wird, obwohl es sich um prämaligne und keine entarteten Zellen handelt. Da die Diagnosestellung rein bildmorphologisch erfolgt, kann es immer wieder zu Fehldiagnosen kommen, sodass es zur operativen Entfernung der Nieren kommt und in der

postoperativen histologischen Aufarbeitung lediglich eine Nephroblastomatose und keine entarteten Zellen gefunden werden. Jedoch sind auch genetische und epigenetische Veränderung innerhalb dieser Zellen für das Verständnis der WT-Genese äußerst wichtig und aufschlussreich, sodass diese von uns nicht ausgeschlossen wurden.

Für die veränderte *SFRP1*-Expression liegen bisher keine Korrelationen zu histologischen Subgruppen vor. Auch in unserem Vergleich fanden sich zwischen den Gruppen keine signifikanten Unterschiede, sodass nicht davon ausgegangen werden kann, dass diese Veränderung im WT zu einer bestimmten histologischen Ausprägung führt.

Des Weiteren sollten auch Zusammenhänge zwischen dem Phänotyp und den genetischen Merkmalen herausgearbeitet werden. Detailliertes Wissen über solche Zusammenhänge können im klinischen Alltag helfen, betroffene Kinder besser und gezielter zu behandeln oder zu Überwachen. Wäre beispielsweise ein Zusammenhang zwischen einer Signalweg-Aktivierung und Bilateralität in WT bekannt, wäre man bei Diagnosestellung sensibilisiert, die Gegenseite genauer zu untersuchen. Bei gehäufter Rezidivrate könnte eine Schlussfolgerung sein, die Patienten und Patientinnen nach abgeschlossener Therapie engmaschig zu überwachen. Gad et al. konnten beispielsweise für WT mit WNT/ $\beta$ -Catenin-Signalweg-Aktivierung nachweisen, dass das Risiko eines Rezidivs nicht erhöht ist [64].

Auch in unserer WT-Gruppe ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen WT mit oder ohne Rezidiv im Verlauf feststellen. Auch in Bezug auf Diagnosealter, Überleben, Geschlecht, chemotherapeutische Vorbehandlung oder bilateralem Auftreten konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (Abbildung 17, Abbildung 18, Abbildung 19).

Es gibt einige Hinweise, jedoch bisher noch keine eindeutigen Daten, dass der WNT/ $\beta$ -Catenin-Signalweg zur Etablierung von Metastasen in WT benötigt wird. Vermutlich löst eine übermäßige Aktivierung des Signalwegs die Metastasierung nicht aus. Wenn die übrigen Rahmenbedingungen stimmen, könnte die Aktivierung jedoch die Metastasierung vorantreiben [106]. Dies wurde beispielsweise in Brust-Karzinomen gezeigt [107] und im Prostata-Karzinom scheint der WNT/ $\beta$ -Catenin-Signalweg sogar ausschlaggebend für die Metastasierung zu sein. Hier zwar durch Mutation von *APC*, welche in metastasierten Tumoren häufiger als in anderen vorkommen, dies dürfte jedoch in Folge auch zu einer übermäßigen WNT/ $\beta$ -Catenin-Signalweg-Aktivierung führen [108]. In unserer Kohorte zeigten die metastasierten WT keine signifikant erhöhte Expression von *AXIN2* im Vergleich zu nicht metastasierten WT. Auslösender Faktor für die Metastasierung scheint somit in unseren WT ein anderer Mechanismus zu sein.

Ein bestimmter Phänotyp lässt sich für WT mit WNT/ $\beta$ -Catenin-Signalweg-Aktivierung also nicht definieren, was auch mit der Komplexität der Tumorentstehung im WT zusammenhängen dürfte.

Auch für WT in unserer Kohorte mit eingeschränkter *SFRP1*-Expression wurde überprüft, ob ein bestimmter Phänotyp zur Ausprägung kommt. In der Literatur sind hierzu keine Aussagen zu finden. Die WT wurden in dieselben Kategorien unterteilt und die Expressionsrate verglichen. Es zeigte sich jedoch keinerlei signifikanten Unterschiede in der *SFRP1*-Expression. Eine offene Frage bleibt also was eine Unterexpression von *SFRP1* in WT auslöst oder ob sie eher Folge anderer intrazellulärer Dysregulationen darstellt, die auf Tumorentstehung, Tumorwachstum und den Phänotyp keinerlei Auswirkung hat.

### 6.3 Weiterführende Forschungsansätze und Ausblick

Der WNT/ $\beta$ -Catenin-Signalweg ist weiterhin Bestandteil vieler neuer Ansätze in der Tumorforschung. Bekannt ist, dass bei verstärkter WNT- $\beta$ -Catenin-Signalwegs-Aktivierung die körpereigene T-Zellen in der Tumorabwehr und auch in Reifung und Differenzierung blockiert werden [109]. Daraus ergibt sich ein Wachstumsvorteil für Tumoren. Außerdem entgehen Tumorzellen hierdurch der Erkennung und Bekämpfung durch das körpereigene Immunsystem. Auch die Wirkung von möglichen Therapien mit Checkpoint-Inhibitoren könnte hierdurch gemindert werden [106]. Eine medikamentöse Blockade des WNT- $\beta$ -Catenin-Signalwegs könnte an diesem Punkt entscheidend eingreifen, um die körpereigene Tumorbekämpfung zu stärken und eine Therapie mit Checkpoint-Inhibitoren positiv zu verstärken, auch in WT. Als mögliche Angriffspunkte innerhalb des WNT/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs wurde durch Parsons et al. die Entwicklung von Antagonisten der Wnt-Proteine vorgeschlagen, welche die Signalwegs-Aktivierung einleiten. Auch Antagonisten, welche in direkte Interaktion mit  $\beta$ -Catenin treten oder dessen Abbau fördern und somit die Transkription von Zielgenen verhindern, sind in Entwicklung [106]. Weiterhin konnte in experimentellen Studien eine Hemmung des WNT/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs durch nicht-steroidale Antirheumatika (NSAID) gezeigt werden, mit einer resultierenden Blockade des Tumorwachstums in kolorektalen Tumoren [110]. Weitere klinische Studien, insbesondere in WT, gibt es hierzu bisher jedoch nicht.

Zhao et al. beschreiben ein Peptid, genannt Wilms-Tumor Suppressing Peptide (WTSP), welches die Expression von  $\beta$ -Catenin in WT-Zelllinien signifikant minderte und zu deren Zell-Apoptose und -Nekrose führte. Welche molekularen Mechanismen hierzu führten, konnte noch nicht gezeigt werden. Auch gibt es bisher keine weiteren klinischen Untersuchungen zum WTSP [111].

Ein weiterer Wirkstoff, für welchen in experimentellen Studien in WT eine Herunterregulierung des WNT/ $\beta$ -Catenin-Signalweges gezeigt werden konnte, ist Pyrvinium. Pyrvinium ist ein Cyanin-Farbstoff, welcher ursprünglich zur Therapie der Enterobiasis genutzt wurde. Die orale Bioverfügbarkeit scheint gering zu sein. Für die antiparasitäre Therapie ist sie ausreichend, jedoch für den Einsatz als antineoplastische Therapie noch nicht abschließend geklärt. In der Versuchsreihe von Polosukhina et al. wurde Pyrvinium deshalb intraperitoneal appliziert [112].

Hierzu sind weitere Studien, wenn auch nur in geringer Zahl, ausstehend. Dies hängt damit zusammen, dass für das bereits in der Medizin angewendete Pyrvinium eine Patentierbarkeit schwer zu erreichen ist. Es gibt deshalb wenig Interesse weitere klinische Studien, die mit hohen Kosten verbunden sind, durchzuführen [113].

Aktuell am vielversprechendsten scheint in Hinblick auf WT der Wirkstoff Tegavivint. Hierzu läuft eine Phase I/II Studie durch die COG, in die rezidivierende und therapierefraktäre WT mit erhöhter Aktivität von  $\beta$ -Catenin, eingeschlossen werden (NCT04851119) [114]. Tegavivint, auch BC2059 genannt, verhindert die Migration des  $\beta$ -Catenins in den Zellkern und fördert seinen Abbau, sodass die Expression der Zielgene des WNT/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs vermindert wird [115].

Die hohe Anzahl an Versuchen, den WNT/ $\beta$ -Catenin-Signalweg therapeutisch zu beeinflussen, zeigt, dass dieser Signalweg in vielen Tumoren ein guter Ansatzpunkt zur Entwicklung von neuen Therapien bietet. Aktuell steht er in klinischen Studien eher in anderen Tumorarten im Vordergrund. Falls es hier zu einem Durchbruch kommt, könnten von diesen Medikamenten jedoch auch die betroffenen Kinder mit WT und erhöhter WNT/ $\beta$ -Catenin-Signalweg-Aktivierung profitieren.

Im WT scheint die aktuelle Forschung eher WT mit schlechter Prognose ins Auge zu fassen. Dies betrifft Tumoren mit anaplastischer Histologie oder Rezidive. Hierunter fallen die von uns detektierten WT mit Aktivierung des WNT/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs eher nicht. Stromale WT gehören zur Gruppe mit intermediärer Malignität und haben eine bessere Prognose. Trotzdem lohnt es sich diesen Ansatzpunkt weiter zu verfolgen. Es muss hier nicht zwangsläufig um die Entwicklung neuartiger Medikamente gehen. Eine nachweisebare Korrelation von genetischen und epigenetischen Merkmalen von Tumoren mit beispielsweise geringem Rezidiv- oder Metastasierungsrisiko kann ebenfalls dazu führen, dass die Therapie deeskaliert werden kann. Auch solche kleinen Fortschritte können für Patienten und Patientinnen einen großen Unterschied in der Lebensqualität bedeuten.

## 6.4 Schlussfolgerung

Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen, dass der WNT/ $\beta$ -Catenin-Signalweg in einem großen Anteil der WT übermäßig aktiviert ist. Die Überexpression von *AXIN2* ist häufiger nachzuweisen als bisher von anderen Autoren angegeben. Die Mutationsrate von *CTNNB1* ist jedoch geringer in der von uns untersuchten Kohorte. Die WT-Proben mit einer *CTNNB1*-Mutation zeigten eine signifikante *AXIN2*-Überexpression. Diese Ergebnisse sind nicht neu, bekräftigen jedoch mit der großen Anzahl die Wichtigkeit des WNT/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs in WT. Ein starker Zusammenhang konnte zwischen WNT-Signalwegs-Aktivierung und stromaler Histologie in WT herausgestellt werden.

Auch *CTNNB1*-Mutationen zeigten sich fast ausschließlich in stromalen WT. WT mit diesen Veränderungen scheinen also eher zur Gruppe der WT mit intermediärer Malignität zu fallen. Diese könnte in der Zukunft eventuell in die Therapieentscheidung miteinbezogen werden und somit gegebenenfalls zur Deeskalation adjuvanter Therapie führen. Hierzu bedarf es aber noch weiterer Forschung.

Unser Fokus bei der weiteren Suche nach der Tumorgenese lag auf *APC*, dem auffälligsten Protein des DKs. In unseren Untersuchungen konnte nicht bestätigt werden, dass *APC* in WT eine ähnlich große Schlüsselrolle einnimmt wie in vielen anderen Tumoren, da sich keine signifikanten Änderungen in Expression oder Methylierung der Promotorregion zeigten.

So wurden weitere Zielgene gesucht, welche an der Regulation des WNT/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs beteiligt sind. Bisher kaum im WT untersucht ist die Gruppe der *SFRP*. Es konnte für *SFRP1* eine signifikante Überexpression in WT ermittelt werden. Ein Zusammenhang mit einer vermehrten WNT/ $\beta$ -Catenin-Signalweg-Aktivierung konnte aber nicht herausgestellt werden. Auch blieb eine Zuordnung zu spezieller Histologie oder Phänotypen aus. Die Frage bleibt also bestehen, ob *SFRP1*, wenn es inaktiv ist, zur WT-Entstehung beiträgt oder ob die Unterexpression als Folge anderer Veränderungen auf zellulärer Ebene zu verstehen ist. Trotz geringer Fallzahl lässt sich durch unsere Untersuchung die Beteiligung der anderen untersuchten *SFRP* weitgehend ausschließen.

Die ursprüngliche These, dass als Ursache der WNT/ $\beta$ -Catenin-Signalweg-Aktivierung epigenetische Veränderungen in Form einer Hypermethylierung in WT eine große Rolle spielen könnten, konnte weder für *APC* noch für *SFRP1* bestätigt werden. Dieser Mechanismus spielt zwar auch in WT eine große Rolle, für die Aktivierung der von uns festgestellten verändert exprimierten Gene jedoch nicht.

Letztendlich konnten wir durch unsere Untersuchungen die Wichtigkeit des WNT/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs in der Entstehung von WT zeigen. Es besteht ein großer Bedarf an weiteren Untersuchungen bezüglich der genaueren Zusammenhänge und Ursachen der hohen Aktivität des WNT/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs in vielen WT-Proben, um daraus Schlüsse für neue Therapiemöglichkeiten ziehen zu können.

## 7 Zusammenfassung

WT stellen die Gruppe der häufigsten Nierentumoren bei Kindern dar und sollte deshalb auch innerhalb der Forschung einen großen Stellenwert einnehmen. Zwar ist die Prognose insgesamt gesehen sehr gut, jedoch ist dies auch mit einer aufwändigen und strapazierenden Therapie verbunden, die neben einer Operation meist auch eine neoadjuvante Chemotherapie und teilweise auch eine Radiatio beinhaltet. Jede Therapiemodalität bringt Nebenwirkungen und auch potenzielle Langzeitfolgen mit sich, die gerade bei Kindern sorgfältig überdacht werden müssen.

In dieser Arbeit wurde der WNT/ $\beta$ -Catenin-Signalweg ins Auge gefasst, welcher bekanntlich in Teilen des WT und in vielen anderen Tumoren dysreguliert ist. Bisher weniger bekannt war, ob epigenetische Veränderungen für diese Dysregulation verantwortlich sind. Als Ausgangsuntersuchung sollte in der großen Kohorte von 101 WT ermittelt werden, ob der WNT/ $\beta$ -Signalweg überhaupt aktiviert ist und wenn ja wie häufig. Mittels Genexpressionsanalyse von *AXIN2* konnte eine Überexpression in 31 % der WT bestätigt werden, was einen größeren Anteil darstellt als bisher beschrieben. Somit konnte die Relevanz der Fragestellung bestätigt werden.

Als Ursache kommt eine bereits bekannte und einer der häufigsten Mutation in WT in Frage, die Mutation von *CTNNB1*. In unserer Kohorte konnte jedoch nur in ca. 16 % der WT mit aktiviertem WNT/ $\beta$ -Catenin-Signalweg eine *CTNNB1*-Mutation festgestellt werden. Es wurden deshalb als nächstes untersucht, ob *APC*, ein in vielen anderen Tumoren auf verschiedene Arten verändertes Gen, für die Signalweg-Aktivierung verantwortlich sein könnte. Dies konnten wir mittels Expressionsanalyse und Methylierungsanalyse nicht bestätigen, sodass im Weiteren die Gruppe der *SFRP* in die Arbeit eingeschlossen wurden.

Für *SFRP2,4,5* konnte keine Unterexpression festgestellt werden, welche zu einer Aktivierung des WNT/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs führen könnte. Zwar ließ sich für *SFRP1* eine signifikante Unterexpression ermitteln, jedoch war die Interpretation der Ergebnisse schwierig, da kein Zusammenhang mit einer WNT/ $\beta$ -Catenin-Signalweg-Aktivierung hergestellt werden konnte. Für WT mit unterexprimiertem *SFRP1* wurde bei den wenigsten eine Aktivierung des Signalwegs festgestellt. Was die Ursache für die Unterexpression sein könnte, konnten wir in dieser Arbeit nicht klären, da die Methylierungsanalyse in der Promotorregion von *SFRP1* keine Veränderung im Vergleich zum gesunden Nierengewebe aufwies. Auch hier bedarf es noch weiteren Analysen.

Einstimmig mit den bisherigen Erkenntnissen wurde gezeigt, dass auch in unserer Kohorte vor allem stromale WT von einer WNT/ $\beta$ -Catenin-Signalweg-Aktivierung betroffen sind. Weitere

Zusammenhänge bezüglich eines bestimmten Phänotyps mit Aktivierung des Signalwegs konnten wir mit den vorliegenden Daten nicht ermitteln. So wurden keine Zusammenhänge der Überexpression von *AXIN2* und der Unterexpression von *SFRP1* und Metastasierung, Tumorrezidiven, Diagnosealter, Geschlecht, Überleben und bilateralem Auftreten nachgewiesen.

Zusammenfassend konnten wir in unserer Arbeit bestätigen, dass das Interesse am WNT/ $\beta$ -Catenin-Signalweg in WT durchaus berechtigt ist. Er ist in einem großen Teil der WT verändert aktiv. Es scheint neben der *CTNGB1*-Mutation noch weitere Mechanismen der Aktivierung zu geben, epigenetische Veränderungen waren in den von uns untersuchten Genen jedoch nicht dafür verantwortlich. Ein kausaler Zusammenhang mit der detektierten *SFRP1*-Unterexpression muss noch weiter untersucht werden.

Obwohl WT mit WNT/ $\beta$ -Catenin-Signalweg-Aktivierung meist nicht zur Gruppe mit hoher Malignität gehören, lohnt es sich diese Ansätze weiter zu verfolgen. Detailliertes und weiteres Wissen über den Ursprung der WT-Entstehung kann klinisch genutzt werden, um beispielsweise die bisherige Standard-Therapie zu deeskalieren oder als Ansatzpunkt in einer zukünftigen medikamentösen Therapie zu dienen.

## 8 Abstract

WT represent the most common type of kidney tumors in children. Therefore, it should be given high priority in research. Overall, the prognosis of this disease is favourable, nevertheless most of the affected children suffer from the exhausting therapy, which almost always consists of surgery, neoadjuvant chemotherapy and sometimes even additional radiotherapy. Each of this therapeutic modalities causes different side effects and long-term effects, which, especially in children, should be considered carefully.

This study focused on the WNT/ $\beta$ -Catenin-pathway, which is known to be dysregulated in some of WT and even in higher frequency in other tumors. Up to now, there is a lack of knowledge, regarding whether epigenetic changes are responsible for these dysregulations. As a starting point for this study, an investigation of an irregular activation of the WNT/ $\beta$ -Catenin-pathway was conducted for a cohort of 101 WT. An overexpression of *AXIN2* was observed in 31 % of WT through a gene expression analysis, which accounts for a larger portion than previously reported. Thus, the relevance of the research question could be confirmed.

One possible reason for this dysregulation could be the mutation of *CTNNB1*, which is already known as one of the most common mutations in WT. In the examined cohort, this mutation accounts only for 16 % of WT with activated WNT/ $\beta$ -Catenin-pathway. Therefore, as the next step, the involvement of *APC*, known to be altered in a lot of different tumors, was investigated as a potential cause of pathway-activation. This could not be confirmed through expression analysis or methylation analysis. Another focus was directed towards the group of *SFRP*.

It could not be stated that there is a lower expression level for *SFRP2,4,5*, which could lead to an dysregulated activation of the WNT/ $\beta$ -Catenin-pathway. For *SFRP1* the expression was significantly lower than in the control group, but the interpretation of these results is difficult as no connection could be established with the activation of the WNT/ $\beta$ -Catenin-pathway. Very few of WT with an underexpression of *SFRP1* also showed an irregular activation of the WNT/ $\beta$ -Catenin-pathway. The cause of this significant underexpression of *SFRP1* could not be identified. The methylation analysis in the promoter of *SFRP1* did not show any changes compared to the healthy kidney tissue. Further investigations are required therefore.

According to previous research especially stromal WT are affected by an irregular activation of the WNT/ $\beta$ -Catenin-pathway in the investigated cohort. Other associations between an activation of the pathway and specific phenotypes, such as metastasis, tumor recurrence, age at diagnosis, gender, survival or bilateral occurrence could not be established.

In summary this study could verify and underline the importance of interest in the WNT/ $\beta$ -Catenin-pathway in the origin of WT. The pathway is aberrant in a large portion of WT. In

addition to *CTNNB1* mutation, there have to be more mechanisms causing the proven activation of the pathway. Epigenetic changes in the genes investigated could not be attributed as the cause of the aberrant activation. A direct relationship between the underexpression of *SFRP1* and the activation needs to be further investigated.

Although WT with activation of the WNT/ $\beta$ -Catenin-pathway belong to the group of WT with favourable histology, it is worth further investigating these approaches. A detailed understanding of the origin of WT could be applied in clinical practice, for example to deescalate therapy or to provide a basis for future pharmacological treatments.

## 9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der DNA-Methylierung .....	11
Abbildung 2: Schematische Darstellung des WNT/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs .....	15
Abbildung 3: Phasentrennung durch Phenol-Chloroform-Extraktion.....	23
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Polymerase-Kettenreaktion .....	25
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Bisulfit-Konversion. ....	30
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Pyrosequenzierung .....	33
Abbildung 7: Relative Genexpression von <i>AXIN2</i> in Relation zum Haushaltsgen <i>TBP</i> .....	35
Abbildung 8: A) Mutation <i>CTNNB1</i> B) Relative Genexpression <i>AXIN2</i> und <i>CTNNB1</i> -Mutation .....	36
Abbildung 9: A) <i>APC</i> -Methylierung B) Genexpression C) Korrelation Methylierung mit Expression D) Korrelation <i>APC</i> -mit <i>AXIN2</i> -Expression.....	38
Abbildung 10: Genexpression A) <i>SFRP2</i> B) <i>SFRP4</i> C) <i>SFRP5</i> .....	40
Abbildung 11: A) <i>SFRP1</i> -Genexpression B) Methylierung C) Korrelation .....	41
Abbildung 12: Korrelation der relative Genexpression von <i>AXIN2</i> mit <i>SFRP1</i> .....	42
Abbildung 13: Relative Genexpression von <i>AXIN2</i> gruppiert nach Histologie .....	43
Abbildung 14: Genexpression <i>AXIN2</i> für histologische Gruppen .....	45
Abbildung 15: Relative Genexpression von <i>SFRP1</i> gruppiert nach Histologie.....	47
Abbildung 16: WT mit und ohne Mutation im <i>CTNNB1</i> -Gen. A) alle Histologien.B) stromale .....	48
Abbildung 17: Genexpression <i>AXIN2</i> für A) Metastasierung B) Rezidiv C) Chemotherapie D) weiblich und männlich E) unilateral und bilateral .....	49
Abbildung 18: Korrelation der <i>AXIN2</i> -Expression zum Diagnosealter in Monaten .....	50
Abbildung 19: A) Kaplan-Meier-Kurve <i>AXIN2</i> B) Genexpression <i>AXIN2</i> hinsichtlich Überleben.....	51
Abbildung 20: Genexpression <i>SFRP1</i> A) Metastasierung B) Rezidiv C) weiblich und männlich D) unilateral und bilateral .....	53
Abbildung 21: Korrelation der <i>SFRP1</i> -Expression zum Diagnosealter in Monaten.....	54

## 10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klassifikation und Risikostratifizierung des Nephroblastoms	3
Tabelle 2: assoziierte Fehlbildungen bei WT-Erkrankten	4
Tabelle 3: Differentialdiagnosen des WT	5
Tabelle 4: Staging-Schemata	6
Tabelle 5: 5-Jahresüberleben und 2-Jahre-Eventfreies Überleben	8
Tabelle 6: histologische Einteilung der Proben	18
Tabelle 7: Quantitative-PCR	19
Tabelle 8: Methylierungsanalyse	19
Tabelle 9: Mutationsanalyse CTNNB1	19
Tabelle 10: Mastermix der Genexpressionsanalyse, Angaben pro Probe	26
Tabelle 11: PCR-Programm der qPCR	26
Tabelle 12: Mastermix PCR, Angabe pro Probe	28
Tabelle 13: PCR-Programm für die Amplifikation des Exon 3, <i>CTNNB1</i>	28
Tabelle 14: PCR-Programm zur Amplifikation der DNA für die Bisulfit-Konversion	31
Tabelle 15: Mastermix PCR zur Amplifikation bisulfitkonvertierter DNA, Angabe pro Probe	31
Tabelle 16: PCR-Programm für die Amplifikation zum Pyrosequenzieren	32
Tabelle 17: Allgemeine Übersicht zur Anzahl der Expressions- und Methylierungsanalyse	42
Tabelle 18: Übersicht <i>AXIN2</i> -Expression und Histologie	46
Tabelle 19: <i>AXIN2</i> -Expression nach klinischen Parametern	52
Tabelle 20: <i>SFRP1</i> -Expression nach klinischen Parametern	54

## 11 Literaturverzeichnis

1. Wilms, M., *Die Mischgeschwülste der Niere*. 1899: Verlag von Arthur Georgi, Leipzig.
2. Dome, J.S., E.J. Perlman, and N. Graf, *Risk stratification for wilms tumor: current approach and future directions*. Am Soc Clin Oncol Educ Book, 2014: p. 215-23.
3. Stiller, C.A. and D.M. Parkin, *International variations in the incidence of childhood renal tumours*. Br J Cancer, 1990. **62**(6): p. 1026-30.
4. Graf, N. *S1-Leitlinie 025/004: Nephroblastom (Wilms-Tumor)*. 2016 06/16 [cited 2017 19.06.]; Available from: [http://www.awmf.org/uploads/tx\\_szleitlinien/025-0041\\_S1\\_Nephroblastom\\_Wilms-Tumor\\_2016-06.pdf](http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/025-0041_S1_Nephroblastom_Wilms-Tumor_2016-06.pdf).
5. Breslow, N., et al., *Age distribution of Wilms' tumor: report from the National Wilms' Tumor Study*. Cancer Res, 1988. **48**(6): p. 1653-7.
6. Breslow, N.E. and J.B. Beckwith, *Epidemiological features of Wilms' tumor: results of the National Wilms' Tumor Study*. J Natl Cancer Inst, 1982. **68**(3): p. 429-36.
7. Stone, M.M., et al., *The nephroblastomatosis complex and its relationship to Wilms' tumor*. J Pediatr Surg, 1990. **25**(9): p. 933-7; discussion 937-8.
8. Arrigo, S., et al., *Better survival after combined modality care for adults with Wilms' tumor. A report from the National Wilms' Tumor Study*. Cancer, 1990. **66**(5): p. 827-30.
9. Sebire, N.J. and G.M. Vujanic, *Paediatric renal tumours: recent developments, new entities and pathological features*. Histopathology, 2009. **54**(5): p. 516-28.
10. Beckwith, J.B., *Wilms' tumor and other renal tumors of childhood: a selective review from the National Wilms' Tumor Study Pathology Center*. Hum Pathol, 1983. **14**(6): p. 481-92.
11. Zuppan, C.W., J.B. Beckwith, and D.W. Luckey, *Anaplasia in unilateral Wilms' tumor: a report from the National Wilms' Tumor Study Pathology Center*. Hum Pathol, 1988. **19**(10): p. 1199-209.
12. Graf, N. and H. Reinhard, *[Wilms tumors. Diagnosis and therapy]*. Urologe A, 2003. **42**(3): p. W391-407; quiz W408-9.
13. Gutjahr, P., et al., *[The importance of preoperative chemotherapy and radiotherapy in 373 children with Wilms' tumor]*. Dtsch Med Wochenschr, 1990. **115**(7): p. 248-53.
14. Kalapurakal, J.A., et al., *Management of Wilms' tumour: current practice and future goals*. Lancet Oncol, 2004. **5**(1): p. 37-46.
15. Miller, R.W., J.F. Fraumeni, Jr., and M.D. Manning, *Association of Wilms's Tumor with Aniridia, Hemihypertrophy and Other Congenital Malformations*. N Engl J Med, 1964. **270**: p. 922-7.
16. Dumoucel, S., et al., *Malformations, genetic abnormalities, and Wilms tumor*. Pediatr Blood Cancer, 2014. **61**(1): p. 140-4.
17. Schumacher, V., *Wilms-Tumor*. Medgen, 2000. **12**: p. 232-238.
18. Gleason, J.M., et al., *Innovations in the management of Wilms' tumor*. Ther Adv Urol, 2014. **6**(4): p. 165-76.
19. Tournade, M.F., et al., *Optimal duration of preoperative therapy in unilateral and nonmetastatic Wilms' tumor in children older than 6 months: results of the Ninth International Society of Pediatric Oncology Wilms' Tumor Trial and Study*. J Clin Oncol, 2001. **19**(2): p. 488-500.
20. Popov, S.D., et al., *[Primitive neuroectodermal tumor of the kidney in children; its differential diagnosis with Wilms tumor]*. Arkh Patol, 2009. **71**(6): p. 41-3.
21. Vujanic, G.M. and A.K. Charles, *Renal tumours of childhood: an update*. Pathology, 2008. **40**(2): p. 217-27.
22. Mitchell, C., et al., *Immediate nephrectomy versus preoperative chemotherapy in the management of non-metastatic Wilms' tumour: results of a randomised trial (UKW3) by the UK Children's Cancer Study Group*. Eur J Cancer, 2006. **42**(15): p. 2554-62.
23. Metzger, M.L. and J.S. Dome, *Current therapy for Wilms' tumor*. Oncologist, 2005. **10**(10): p. 815-26.

24. Lopes, R.I. and A. Lorenzo, *Recent advances in the management of Wilms' tumor*. F1000Res, 2017. **6**: p. 670.
25. Millar, A.J., S. Cox, and A. Davidson, *Management of bilateral Wilms tumours*. *Pediatr Surg Int*, 2017. **33**(4): p. 461-469.
26. Dome, J.S., et al., *Advances in Wilms Tumor Treatment and Biology: Progress Through International Collaboration*. *J Clin Oncol*, 2015. **33**(27): p. 2999-3007.
27. Denes, F.T., et al., *Pediatric genitourinary oncology*. *Front Pediatr*, 2013. **1**: p. 48.
28. Brok, J., et al., *Biology and treatment of renal tumours in childhood*. *Eur J Cancer*, 2016. **68**: p. 179-195.
29. Knudson, A.G., Jr. and L.C. Strong, *Mutation and cancer: a model for Wilms' tumor of the kidney*. *J Natl Cancer Inst*, 1972. **48**(2): p. 313-24.
30. Feinberg, A.P., *A developmental context for multiple genetic alterations in Wilms' tumor*. *J Cell Sci Suppl*, 1994. **18**: p. 7-12.
31. Haber, D.A., et al., *An internal deletion within an 11p13 zinc finger gene contributes to the development of Wilms' tumor*. *Cell*, 1990. **61**(7): p. 1257-69.
32. Huff, V., *Wilms tumor genetics*. *Am J Med Genet*, 1998. **79**(4): p. 260-7.
33. Call, K.M., et al., *Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus*. *Cell*, 1990. **60**(3): p. 509-20.
34. Schumacher, V., et al., *Correlation of germ-line mutations and two-hit inactivation of the WT1 gene with Wilms tumors of stromal-predominant histology*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(8): p. 3972-7.
35. Scott, R.H., et al., *Stratification of Wilms tumor by genetic and epigenetic analysis*. *Oncotarget*, 2012. **3**(3): p. 327-35.
36. Rivera, M.N., et al., *An X chromosome gene, WTX, is commonly inactivated in Wilms tumor*. *Science*, 2007. **315**(5812): p. 642-5.
37. Ruteshouser, E.C., S.M. Robinson, and V. Huff, *Wilms tumor genetics: mutations in WT1, WTX, and CTNNB1 account for only about one-third of tumors*. *Genes Chromosomes Cancer*, 2008. **47**(6): p. 461-70.
38. Perotti, D., et al., *Hallmark discoveries in the biology of Wilms tumour*. *Nat Rev Urol*, 2024. **21**(3): p. 158-180.
39. Rivera, M.N., et al., *The tumor suppressor WTX shuttles to the nucleus and modulates WT1 activity*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(20): p. 8338-43.
40. Hohenstein, P., K. Pritchard-Jones, and J. Charlton, *The yin and yang of kidney development and Wilms' tumors*. *Genes Dev*, 2015. **29**(5): p. 467-82.
41. Lawrence, M.S., et al., *Discovery and saturation analysis of cancer genes across 21 tumour types*. *Nature*, 2014. **505**(7484): p. 495-501.
42. Maschietto, M., et al., *TP53 mutational status is a potential marker for risk stratification in Wilms tumour with diffuse anaplasia*. *PLoS One*, 2014. **9**(10): p. e109924.
43. Rakheja, D., et al., *Somatic mutations in DROSHA and DICER1 impair microRNA biogenesis through distinct mechanisms in Wilms tumours*. *Nat Commun*, 2014. **2**: p. 4802.
44. Wegert, J., et al., *Mutations in the SIX1/2 pathway and the DROSHA/DGCR8 miRNA microprocessor complex underlie high-risk blastemal type Wilms tumors*. *Cancer Cell*, 2015. **27**(2): p. 298-311.
45. Walz, A.L., et al., *Recurrent DGCR8, DROSHA, and SIX homeodomain mutations in favorable histology Wilms tumors*. *Cancer Cell*, 2015. **27**(2): p. 286-97.
46. Koesters, R., et al., *Mutational activation of the beta-catenin proto-oncogene is a common event in the development of Wilms' tumors*. *Cancer Res*, 1999. **59**(16): p. 3880-2.
47. Morin, P.J., *beta-catenin signaling and cancer*. *Bioessays*, 1999. **21**(12): p. 1021-30.
48. Wittmann, S., et al., *New prognostic markers revealed by evaluation of genes correlated with clinical parameters in Wilms tumors*. *Genes Chromosomes Cancer*, 2008. **47**(5): p. 386-95.
49. Maiti, S., et al., *Frequent association of beta-catenin and WT1 mutations in Wilms tumors*. *Cancer Res*, 2000. **60**(22): p. 6288-92.

50. Fukuzawa, R., et al., *Sequential WTI and CTNNB1 mutations and alterations of beta-catenin localisation in intralobar nephrogenic rests and associated Wilms tumours: two case studies*. J Clin Pathol, 2007. **60**(9): p. 1013-6.
51. Kusafuka, T., et al., *Codon 45 of the beta-catenin gene, a specific mutational target site of Wilms' tumor*. Int J Mol Med, 2002. **10**(4): p. 395-9.
52. Wilkins, R.J., *Genomic imprinting and carcinogenesis*. Lancet, 1988. **1**(8581): p. 329-31.
53. Lewis, A. and W. Reik, *How imprinting centres work*. Cytogenet Genome Res, 2006. **113**(1-4): p. 81-9.
54. Meng, H., et al., *DNA methylation, its mediators and genome integrity*. Int J Biol Sci, 2015. **11**(5): p. 604-17.
55. Scott, J., et al., *Insulin-like growth factor-II gene expression in Wilms' tumour and embryonic tissues*. Nature, 1985. **317**(6034): p. 260-2.
56. Ogawa, O., et al., *Relaxation of insulin-like growth factor II gene imprinting implicated in Wilms' tumour*. Nature, 1993. **362**(6422): p. 749-51.
57. Hubertus, J., et al., *Altered expression of imprinted genes in Wilms tumors*. Oncol Rep, 2011. **25**(3): p. 817-23.
58. Hubertus, J., et al., *Selective methylation of CpGs at regulatory binding sites controls NNAT expression in Wilms tumors*. PLoS One, 2013. **8**(6): p. e67605.
59. Song, D., et al., *Assessment of promoter methylation and expression of SIX2 as a diagnostic and prognostic biomarker in Wilms' tumor*. Tumour Biol, 2015. **36**(10): p. 7591-8.
60. Song, D., et al., *Evaluation of promoter hypomethylation and expression of p73 as a diagnostic and prognostic biomarker in Wilms' tumour*. J Clin Pathol, 2016. **69**(1): p. 12-8.
61. Carraro, D.M., R.F. Ramalho, and M. Maschietto, *Gene Expression in Wilms Tumor: Disturbance of the Wnt Signaling Pathway and MicroRNA Biogenesis*, in *Wilms Tumor*, M.M. van den Heuvel-Eibrink, Editor. 2016: Brisbane (AU).
62. Perotti, D., et al., *Is Wilms tumor a candidate neoplasia for treatment with WNT/beta-catenin pathway modulators?--A report from the renal tumors biology-driven drug development workshop*. Mol Cancer Ther, 2013. **12**(12): p. 2619-27.
63. Corbin, M., et al., *WNT/beta-catenin pathway activation in Wilms tumors: a unifying mechanism with multiple entries?* Genes Chromosomes Cancer, 2009. **48**(9): p. 816-27.
64. Gadd, S., et al., *Clinically relevant subsets identified by gene expression patterns support a revised ontogenic model of Wilms tumor: a Children's Oncology Group Study*. Neoplasia, 2012. **14**(8): p. 742-56.
65. Yao, H., E. Ashihara, and T. Maekawa, *Targeting the Wnt/beta-catenin signaling pathway in human cancers*. Expert Opin Ther Targets, 2011. **15**(7): p. 873-87.
66. Clevers, H. and R. Nusse, *Wnt/beta-catenin signaling and disease*. Cell, 2012. **149**(6): p. 1192-205.
67. Nusse, R. and H.E. Varmus, *Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome*. Cell, 1982. **31**(1): p. 99-109.
68. Polakis, P., *Wnt signaling and cancer*. Genes Dev, 2000. **14**(15): p. 1837-51.
69. Behrens, J., et al., *Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1*. Nature, 1996. **382**(6592): p. 638-42.
70. He, T.C., et al., *Identification of c-MYC as a target of the APC pathway*. Science, 1998. **281**(5382): p. 1509-12.
71. Tetsu, O. and F. McCormick, *Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells*. Nature, 1999. **398**(6726): p. 422-6.
72. Mao, B., et al., *LDL-receptor-related protein 6 is a receptor for Dickkopf proteins*. Nature, 2001. **411**(6835): p. 321-5.
73. Stamos, J.L. and W.I. Weis, *The beta-catenin destruction complex*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2013. **5**(1): p. a007898.
74. Finch, P.W., et al., *Purification and molecular cloning of a secreted, Frizzled-related antagonist of Wnt action*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(13): p. 6770-5.

75. Surana, R., et al., *Secreted frizzled related proteins: Implications in cancers*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1845**(1): p. 53-65.
76. Ugolini, F., et al., *WNT pathway and mammary carcinogenesis: loss of expression of candidate tumor suppressor gene SFRP1 in most invasive carcinomas except of the medullary type*. Oncogene, 2001. **20**(41): p. 5810-7.
77. Perry, A.S., et al., *Gene expression and epigenetic discovery screen reveal methylation of SFRP2 in prostate cancer*. Int J Cancer, 2013. **132**(8): p. 1771-80.
78. Takada, T., et al., *Methylation-associated silencing of the Wnt antagonist SFRP1 gene in human ovarian cancers*. Cancer Sci, 2004. **95**(9): p. 741-4.
79. Jones, S.E. and C. Jomary, *Secreted Frizzled-related proteins: searching for relationships and patterns*. Bioessays, 2002. **24**(9): p. 811-20.
80. Chomczynski, P. and N. Sacchi, *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. Anal Biochem, 1987. **162**(1): p. 156-9.
81. Biosystems, A., *TRI Reagent® Solution User Manual*. 2010: Document Connect (thermofisher.com). p. 2.
82. Saiki, R.K., et al., *Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia*. Science, 1985. **230**(4732): p. 1350-4.
83. Lorenz, T.C., *Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies*. J Vis Exp, 2012(63): p. e3998.
84. Pfaffl, M.W., *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR*. Nucleic Acids Res, 2001. **29**(9): p. e45.
85. Frommer, M., et al., *A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(5): p. 1827-31.
86. Siegel, E.M., et al., *Quantitative DNA methylation analysis of candidate genes in cervical cancer*. PLoS One, 2015. **10**(3): p. e0122495.
87. Migheli, F., et al., *Comparison study of MS-HRM and pyrosequencing techniques for quantification of APC and CDKN2A gene methylation*. PLoS One, 2013. **8**(1): p. e52501.
88. Qiagen, *PyroMark Gold Q24 Reagents Handbuch*. 2015: HB-0212-002\_1057419\_151019192\_R2\_PyroMark\_Gold\_Q24\_Reagents\_CE\_0315\_ROW\_DE.pdf.
89. Park, W.S., et al., *Frequent somatic mutations of the beta-catenin gene in intestinal-type gastric cancer*. Cancer Res, 1999. **59**(17): p. 4257-60.
90. Aiden, A.P., et al., *Wilms tumor chromatin profiles highlight stem cell properties and a renal developmental network*. Cell Stem Cell, 2010. **6**(6): p. 591-602.
91. Kispert, A., S. Vainio, and A.P. McMahon, *Wnt-4 is a mesenchymal signal for epithelial transformation of metanephric mesenchyme in the developing kidney*. Development, 1998. **125**(21): p. 4225-34.
92. Valenta, T., J. Lukas, and V. Korinek, *HMG box transcription factor TCF-4's interaction with CtBP1 controls the expression of the Wnt target Axin2/Conductin in human embryonic kidney cells*. Nucleic Acids Res, 2003. **31**(9): p. 2369-80.
93. Gadd, S., et al., *A Children's Oncology Group and TARGET initiative exploring the genetic landscape of Wilms tumor*. Nat Genet, 2017. **49**(10): p. 1487-1494.
94. Duhme, C., et al., *WT1-Mutant Wilms Tumor Progression Is Associated With Diverting Clonal Mutations of CTNNB1*. J Pediatr Hematol Oncol, 2019.
95. Major, M.B., et al., *Wilms tumor suppressor WTX negatively regulates WNT/beta-catenin signaling*. Science, 2007. **316**(5827): p. 1043-6.
96. Polakis, P., *Wnt signaling in cancer*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2012. **4**(5).
97. Esteller, M., et al., *Analysis of adenomatous polyposis coli promoter hypermethylation in human cancer*. Cancer Res, 2000. **60**(16): p. 4366-71.
98. Lai, Y.C., et al., *Correlations between histological characterizations and methylation statuses of tumour suppressor genes in Wilms' tumours*. Int J Exp Pathol, 2022. **103**(3): p. 121-128.

99. Barros, B.D., et al., *Mutational spectrum of WTX, WT1, CTNNB1, APC and PLCG2 genes in Wilms tumor defined by massive parallel resequencing*. BMC Proceedings, 2012. **6 (Suppl 6)**.
100. Maschietto, M., et al., *Molecular profiling of isolated histological components of wilms tumor implicates a common role for the Wnt signaling pathway in kidney and tumor development*. Oncology, 2008. **75(1-2)**: p. 81-91.
101. Scott, R.H., et al., *Stratification of Wilms tumor by genetic and epigenetic analysis*. Oncotarget, 2012. **3(3)**.
102. Pereira, H.S., et al., /. Front Biosci (Elite Ed), 2018. **10**: p. 143-154.
103. Hoang, B., et al., *Primary structure and tissue distribution of FRZB, a novel protein related to Drosophila frizzled, suggest a role in skeletal morphogenesis*. J Biol Chem, 1996. **271(42)**: p. 26131-7.
104. Wang, S., et al., *Frzb, a secreted protein expressed in the Spemann organizer, binds and inhibits Wnt-8*. Cell, 1997. **88(6)**: p. 757-66.
105. van Loon, K., E.J.M. Huijbers, and A.W. Griffioen, *Secreted frizzled-related protein 2: a key player in noncanonical Wnt signaling and tumor angiogenesis*. Cancer Metastasis Rev, 2021. **40(1)**: p. 191-203.
106. Parsons, M.J., T. Tammela, and L.E. Dow, *WNT as a Driver and Dependency in Cancer*. Cancer Discov, 2021. **11(10)**: p. 2413-2429.
107. Kim, S.J., et al., *Alterations in Wnt- and/or STAT3 signaling pathways and the immune microenvironment during metastatic progression*. Oncogene, 2019. **38(31)**: p. 5942-5958.
108. Leibold, J., et al., *Somatic Tissue Engineering in Mouse Models Reveals an Actionable Role for WNT Pathway Alterations in Prostate Cancer Metastasis*. Cancer Discov, 2020. **10(7)**: p. 1038-1057.
109. Staal, F.J., T.C. Luis, and M.M. Tiemessen, *WNT signalling in the immune system: WNT is spreading its wings*. Nat Rev Immunol, 2008. **8(8)**: p. 581-93.
110. Boon, E.M., et al., *Sulindac targets nuclear beta-catenin accumulation and Wnt signalling in adenomas of patients with familial adenomatous polyposis and in human colorectal cancer cell lines*. Br J Cancer, 2004. **90(1)**: p. 224-9.
111. Zhao, W., et al., *Wilms tumor-suppressing peptide inhibits proliferation and induces apoptosis of Wilms tumor cells in vitro and in vivo*. J Cancer Res Clin Oncol, 2019. **145(10)**: p. 2457-2468.
112. Polosukhina, D., et al., *Pharmacologic Inhibition of  $\beta$ -Catenin With Pyrvinium Inhibits Murine and Human Models of Wilms Tumor*. Oncol Res, 2017. **25(9)**: p. 1653-1664.
113. Schultz, C.W. and A. Nevler, *Pyrvinium Pamoate: Past, Present, and Future as an Anti-Cancer Drug*. Biomedicines, 2022. **10(12)**.
114. Clinicaltrials, U.N.L.o.M. <h2 ngcontent-ng-c2037759435="" class="brief-title" style="box-sizing: inherit; font-size: 22px; line-height: 1.15; color: rgb(51, 51, 51); margin: 1.5rem 0px; font-family: Roboto, sans-serif; background-color: rgb(255, 255, 255);"> Tegavivint for the Treatment of Recurrent or Refractory Solid Tumors, Including Lymphomas and Desmoid Tumors. 2021 [cited 2024 16. Juni 2024].
115. Nomura, M., et al., *Tegavivint and the  $\beta$ -Catenin/ALDH Axis in Chemotherapy-Resistant and Metastatic Osteosarcoma*. J Natl Cancer Inst, 2019. **111(11)**: p. 1216-1227.

## 12 Wissenschaftliche Beiträge

- Vortrag im Rahmen des 29th International Symposium on Pediatric Surgical Research, Frankfurt, 2016

**Activation of the WNT/ $\beta$ -Catenin pathway is common in Wilms Tumor, but rarely through  $\beta$ -Catenin mutation and *APC* promoter methylation**

- Publikation:

**Activation of the Wnt/b-catenin pathway is common in wilms tumor, but rarely through b-catenin mutation and APC promoter methylation**

Amei Schweigert, Carmen Fischer, Doris Mayr, Dietrich von Schweinitz, Roland Kappler, Jochen Hubertus

Pediatric Surgery International, 2016, 32(12), p. 1141-1146

## 13 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all den Personen danken, die Anteil am Gelingen dieser Arbeit haben:

Zuallererst möchte ich mich bei Prof. Dr. Roland Kappler bedanken für die Möglichkeit in seiner Forschungsgruppe zu arbeiten. Sowohl während der Zeit im Labor als auch anschließend war er jederzeit ansprechbar. Er hat eine außergewöhnlich gute Arbeitsatmosphäre geschaffen und war immer bereit, mit seiner fachlichen und menschlichen Qualität den Prozess zu unterstützen. Hervorzuheben ist seine Motivation auch nach vielen Jahren seine Doktoranden nicht aus den Augen zu verlieren und die Bereitschaft sich auch dann noch voll in die Fertigstellung der Arbeit einzubringen.

Weiterhin danke ich herzlich Prof. Dr. Jochen Hubertus als Mitbetreuer für die Begleitung während der Laborzeit und vor allem in Hinblick auf die Veröffentlichung des Papers.

Besonders danken möchte ich Shiva Promoli für die schöne und prägende Zeit. Ohne ihre Hilfe im Labor wäre die Arbeit nur halb so erfolgreich verlaufen. Ebenso gilt mein Dank Sebastian Sigl und allen anderen Mitgliedern der damaligen Forschungsgruppe für die Unterstützung. Das Arbeiten war stets durch Kollegialität und eine positiven Stimmung geprägt.

Ich danke von Herzen meinen Eltern, die mir eine sorgenlose Studienzeit ermöglicht haben und immer an die Vollendung dieser Arbeit geglaubt haben.

Zuletzt möchte ich vor allem meinem Mann, meiner Familie, sowie allen Freunden danken, die mich über die Jahre begleitet haben, immer Geduld und Nachsicht mit mir hatten und mir immer wieder neue Motivation geschenkt haben.

## **14 Anhang**

- Eidesstattliche Versicherung
- Erklärung der Übereinstimmung der gebundenen und der elektronischen Fassung



LUDWIG-  
MAXIMILIANS-  
UNIVERSITÄT  
MÜNCHEN

Dekanat Medizinische Fakultät  
Promotionsbüro



## Eidesstattliche Versicherung

Karst, Amei Katharina

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

**Epigenetische Veränderungen an Genen  
des WNT/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs in  
Wilms-Tumoren**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Stuttgart, 02.06.2025

Ort, Datum

Amei Katharina Karst

Unterschrift Amei Katharina Karst



LUDWIG-  
MAXIMILIANS-  
UNIVERSITÄT  
MÜNCHEN

Dekanat Medizinische Fakultät  
Promotionsbüro



## Erklärung zur Übereinstimmung der gebundenen Ausgabe der Dissertation mit der elektronischen Fassung

Karst, Amei Katharina

Name, Vorname

Hiermit erkläre ich, dass die elektronische Version der eingereichten Dissertation mit dem Titel:

### **Epigenetische Veränderungen an Genen des WNT/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs in Wilms-Tumoren**

in Inhalt und Formatierung mit den gedruckten und gebundenen Exemplaren übereinstimmt.

Stuttgart, 02.06.2025

Ort, Datum

Amei Katharina Karst

Unterschrift Amei Katharina Karst