



Analyse des Wnt-Signalweges in Keimzelltumoren des Kindesalters

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-
Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Vera Okpanyi

aus Wiesbaden

Düsseldorf, Mai 2011

Aus der Klinik für Kinder-Onkologie, -Hämatologie und Klinische Immunologie des
Universitätsklinikums Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Professor Dr. med. Dominik Schneider

Koreferent: Professor Dr. rer. nat. Rolf Wagner

Tag der mündlichen Prüfung: 22. Juni 2011

Meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungsverzeichnis I	10
Abkürzungsverzeichnis II	12
Medizinisches Glossar	14
Abbildungsverzeichnis	16
Tabellenverzeichnis	17
Zusammenfassung	18
Summary	20
1 Einleitung	22
1.1 Keimzelltumoren des Kindes- und Jugendalters	22
1.1.1 Ursprung und Entwicklung	23
1.1.2 Histologie	24
1.1.3 Epidemiologie	26
1.1.4 Vom Teratom zum Dottersacktumor – eine Progression	28
1.1.5 Molekularbiologie	29
1.2 Der Wnt-Signalweg – Funktion und Regulation	31
1.2.1 Der kanonische Wnt-Signalweg	34
1.2.2 Zielgene	37
1.2.3 Antagonisten und Agonisten	38
1.3 Der Wnt-Signalweg in der Tumorgenese	41
1.3.1 Epigenetische Regulation des Wnt-Signalweges	42
1.3.2 Der Tumorsuppressor APC	44
1.3.3 Therapeutische Implikation	46
1.4 Keimzelltumoren und der Wnt-Signalweg	48
1.5 Zielsetzung der Arbeit	50
2 Material	51
2.1 Patienten	51
2.1.1 Tumorfrischgewebe	52
2.1.2 Paraffingewebe	53
2.1.3 Blut	53
2.2 Referenzgewebe und -zelllinie	54
2.3 Humane Zelllinien	54

2.4	Chemikalien und Reagenzien	55
2.4.1	Allgemeine Chemikalien und Reagenzien	55
2.4.2	Spezielle Chemikalien und Reagenzien	55
2.5	Puffer, Lösungen und Medien	56
2.5.1	Puffer und Lösungen	56
2.5.2	Lösungen und Medien für die Zellkultur	56
2.5.3	Medien für die Bakterienkultur	56
2.6	Bakterien	56
2.7	Plasmide	56
2.8	Oligonukleotide	57
2.8.1	PCR und Sequenzierung	57
2.8.2	Reverse-Transkriptions-PCR	58
2.8.3	Methylierungsspezifische PCR	58
2.8.4	Bisulfitsequenzierung	58
2.8.5	Mikrosatellitenanalyse	59
2.9	Größen- und Massenstandard	59
2.10	TaqMan® Assays	60
2.11	Antikörper	61
2.12	Enzyme	61
2.12.1	Restriktionsenzyme	61
2.12.2	Sonstige Enzyme	61
2.13	Kit-Systeme	62
2.14	Verbrauchsmaterialien	62
2.15	Geräte	62
2.16	Software	63
3	Methoden	64
3.1	Molekularbiologische Methoden	64
3.1.1	Nukleinsäureextraktion aus Gewebe	64
3.1.1.1	Gewebe-Homogenisierung	64
3.1.1.2	RNA-Extraktion	64
3.1.1.3	DNA-Extraktion	65
3.1.2	Nukleinsäureextraktion aus Blut	65
3.1.3	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	66
3.1.4	Qualitätsbestimmung von RNA	66
3.1.5	DNA-Bisulfitmodifikation	66
3.1.6	Agarose-Gelelektrophorese von Nukleinsäuren	67

3.1.7	Aufreinigung von PCR-Produkten _____	67
3.1.7.1	Aufreinigung für die Klonierung _____	67
3.1.7.2	Aufreinigung für die Sequenzierung _____	67
3.1.7.3	Aufreinigung von DNA aus Agarose-Gelen _____	68
3.1.8	Plasmid-DNA-Präparation aus Bakterien _____	68
3.1.9	Restriktionsverdau von Plasmid-DNA _____	68
3.1.10	Polymerasekettenreaktion (PCR) _____	68
3.1.10.1	Standard-PCR _____	69
3.1.10.2	Methylierungsspezifische PCR _____	70
3.1.10.3	Reverse-Transkriptions-PCR _____	71
3.1.11	Quantitative Real-Time PCR _____	71
3.1.11.1	Ermittlung und Validierung der Housekeeping-Gene _____	71
3.1.11.2	Reverse Transkription _____	72
3.1.11.3	TaqMan® Real-Time PCR _____	72
3.1.12	DNA-Sequenzierung nach Sanger _____	73
3.1.12.1	Standardsequenzierung _____	73
3.1.12.2	Bisulfitsequenzierung _____	74
3.1.13	Mikrosatellitenanalyse _____	74
3.2	Mikrobiologische Methoden _____	76
3.2.1	Kultivierung von Bakterienstämmen _____	76
3.2.2	TOPO TA Klonierung® _____	76
3.2.2.1	Addition von 3'-A-Überhängen _____	76
3.2.2.2	Transformation von <i>E. coli</i> -Bakterien _____	76
3.2.2.3	Blau-Weiß-Selektion _____	77
3.3	Proteinanalytische Methoden _____	77
3.3.1	Protein-Truncation-Test (PTT) _____	77
3.4	Histologische Methoden _____	78
3.4.1	Anfertigung von Paraffinschnitten _____	78
3.4.2	Immunhistochemische Färbung _____	78
3.4.3	Mikroskopie _____	79
3.5	Zellkulturtechniken _____	79
3.5.1	Kultivierung humaner, adhärenter Zellen _____	80
3.5.2	Lebendzellzahlbestimmung _____	80
3.5.3	Kryokonservierung humaner Zellen _____	80
3.5.4	Nukleinsäureextraktion aus Zellen _____	81
3.5.5	Demethylierung und Acetylierung humaner Zellen _____	81
3.6	Datenanalyse _____	82
3.6.1	Statistik _____	82

3.6.2	Standardabweichung _____	82
3.6.3	Diagramme _____	82
4	Ergebnisse _____	83
4.1	Validierung der Housekeeping-Gene _____	83
4.2	Charakterisierung von β-Catenin, Zielgenen und Rezeptoren _____	84
4.2.1	Expressionsprofil des Schlüsselregulators β -Catenin _____	84
4.2.1.1	Expression auf mRNA-Ebene _____	84
4.2.1.2	Expression auf Protein-Ebene _____	85
4.2.2	Mutationsanalyse an Exon 3 im β -Catenin-Gen _____	88
4.2.3	Expressionsprofil der β -Catenin-regulierten Gene <i>CCND1</i> und <i>c-MYC</i> ____	89
4.2.4	Expressionsprofil des Membranrezeptors <i>FZD2</i> _____	91
4.3	Charakterisierung des Tumorsuppressors APC _____	92
4.3.1	Mutationsanalyse der <i>Mutation Cluster Region</i> im <i>APC</i> -Gen _____	92
4.3.2	<i>Protein Truncation Test</i> zur Identifizierung trunkierender Mutationen ____	93
4.3.3	Mikrosatellitenanalyse des <i>APC</i> -Locus auf Chromosom 5q _____	94
4.3.4	Methylierungsprofil der <i>APC</i> -Promotorregion _____	97
4.3.4.1	Methylierungsstatus _____	98
4.3.4.2	Methylierungsgrad _____	99
4.3.5	Expressionsprofil des <i>APC</i> -Gens _____	102
4.4	Komponenten des Degradationskomplexes _____	103
4.4.1	Expressionsprofil der <i>AXIN1</i> - und <i>AXIN2</i> -Gene _____	103
4.4.2	Expressionsprofil des <i>GSK3β</i> -Gens _____	105
4.4.3	Mutationsanalyse der kodierenden Region des <i>WTX</i> -Gens _____	106
4.4.4	Expressionsprofil des <i>WTX</i> -Gens _____	107
4.5	Charakterisierung weiterer intrazellulärer Wnt-Regulatoren _____	108
4.5.1	Expressionsprofil des <i>HRAS</i> -Gens _____	108
4.5.2	Expressionsprofil des <i>DACT3</i> -Gens _____	109
4.5.3	Expressionsprofil des <i>SNAI1</i> -Gens _____	110
4.5.4	Expressionsprofil des <i>DVL1</i> -Gens _____	111
4.5.5	Expressionsprofil des Zelladhäsionsmoleküls EpCAM _____	112
4.5.5.1	Expression auf mRNA-Ebene _____	112
4.5.5.2	Expression auf Protein-Ebene _____	113
4.6	Mitglieder der SFRP-Familie _____	116
4.6.1	Expressionsprofil des <i>SFRP1</i> -Gens _____	116
4.6.2	Expressionsprofil des <i>SFRP4</i> -Gens _____	117
4.6.3	Expressionsprofil des <i>SFRP5</i> -Gens _____	118
4.6.4	Expressionsprofil des extrazellulären Wnt-Antagonisten <i>SFRP2</i> _____	119
4.6.4.1	Expression auf mRNA-Ebene _____	119

4.6.4.2	Expression auf Protein-Ebene _____	120
4.7	Charakterisierung von <i>SFRP2</i> in KZT und Zelllinien _____	122
4.7.1	Methylierungs- und Expressionsprofil von <i>SFRP2</i> in KZT _____	122
4.7.2	Demethylierung und Reexpression von <i>SFRP2</i> in der MCF-7-Zelllinie _	125
4.7.3	<i>SFRP2</i> in KZT-Zelllinien _____	126
4.7.3.1	Methylierung und Expression _____	127
4.7.3.2	Demethylierung und Reexpression _____	128
4.8	Charakterisierung weiterer extrazellulärer Wnt-Regulatoren _____	131
4.8.1	Expressionsprofil des <i>DKK1</i> -Gens _____	131
4.8.2	Methylierungsprofil der <i>DKK1</i> -Promotorregion _____	132
4.8.2.1	Methylierungsstatus _____	133
4.8.2.2	Methylierungsgrad _____	134
4.8.3	Expressionsprofil des <i>WIF1</i> -Gens _____	135
5	Diskussion _____	137
5.1	Konstitutive Wnt-Aktivierung in Keimzelltumoren _____	137
5.1.1	Subtypen-spezifische Expression von β -Catenin _____	137
5.1.2	β -Catenin induziert Zielgenexpression _____	139
5.2	Deregulation von Wnt-Komponenten fördert Tumorprogression __	142
5.2.1	Assoziation der Wnt-Aktivierung mit chromosomaler Instabilität _____	142
5.2.2	Malignisierendes Potential von Wnt-Antagonisten _____	145
5.2.3	Negative <i>feed-back</i> -Regulation in Teratomen _____	149
5.3	Epigenetische Veränderungen korrelieren mit Tumorprogression _	151
5.3.1	Die Rolle des Tumorsuppressors APC in Keimzelltumoren _____	151
5.3.2	Epigenetische Inhibition von <i>SFRP2</i> in Dottersacktumoren _____	154
5.4	EpCAM – potentieller Tumormarker in Keimzelltumoren _____	157
5.5	Schlussfolgerung _____	159
6	Literatur _____	160
7	Publikationen und Kongressbeiträge _____	188
8	Anhang _____	190
8.1	Übersicht der Tumorfälle _____	190
8.2	Übersicht der pro Tumorfall durchgeführten Analysen _____	192
8.3	Epigenetische Analysen der Gene <i>APC</i> , <i>DKK1</i> und <i>SFRP2</i> _____	194
8.4	Plasmidkarte des pCR [®] 2.1-TOPO [®] -Vektor _____	195
	Eidesstattliche Erklärung _____	196

Lebenslauf	197
Danksagung	198

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS I

ALLGEMEIN

Abkürzung	Bezeichnung
°C	Grad Celsius
5-Aza	5-Aza-2'-deoxycytidine
ABC	Avidin-Biotin-Complex
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
AU	Anson units per vial (Enzymeinheit)
BGS	Bisulfite genomic sequencing (dt. Bisulfitsequenzierung)
bp	Basenpaar
BSA	Bovine serum albumin (dt. Rinderserumalbumin)
CD	Cytoplasmic domain (dt. cytoplasmatische Domäne)
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CGH	Comparative genomic hybridisation (dt. komparative genomische Hybridisierung)
CHC	Choriocarcinoma (dt. Choriokarzinom)
Chr.	Chromosom
CIN	Chromosomal instability (dt. chromosomale Instabilität)
CIS	Carcinoma <i>in situ</i>
CpG	CpG-Dinukleotid; Cytosin-phosphatidyl-Guanin (p, Phosphodiesterbindung)
CR	Complete remission (dt. anhaltende Remission)
CRD	Cysteine-rich domain (dt. Cystein-reiche Domäne)
d	Tag
dest.	Destilliert
DIX	Dishevelled- und Axin-Domäne
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid (dt. Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DOC	Dead of complications (dt. Tod durch Komplikationen)
DOD	Dead of disease (dt. Tod durch Krankheit)
DYS	Dysgerminoma (dt. Dysgerminom)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EC	Embryonal carcinoma (dt. Embryonales Karzinom)
EC-Zelle	Embryonale Karzinomzellen
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ES-Zellen	Embryonale Stammzellen
EtBr	Ethidiumbromid
Exo1	Exonuklease 1
FAM	6-Carboxyfluorescein
FAP	Familiäre Adenomatöse Polyposis
FCS	Fetal calf serum (dt. fetales Kälberserum)
FISH	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung
FW	Forward-Primer (dt. Vorwärtsprimer)
g	Gravitationskonstante (Zentrifugalkraft)
G	Germinom
GCT	Germ cell tumor (dt. Keimzelltumor)
GOI	Gene of interest
GPOH	Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie
GVO	Gentechnisch veränderter Organismus
h	Stunde
H ₂ O	Wasser

H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HE	Hämatoxylin-Eosin
HKG	Housekeeping-Gen (endogene Kontrolle)
i(12p)	Isochromosom 12p
IHC	Immunhistochemie
IT	Immature teratoma (dt. Teratom, unreif)
k.A.	Keine Angabe
kb	Kilobase
kD	Kilodalton
KZT	Keimzelltumor
LOH	Loss of heterocycosity (dt. Heterozygotieverlust)
MAKEI	Kooperative Therapieoptimierungsstudie der GPOH zu nicht-testikulären KZT im Kindes- und Jugendalter
MCR	Mutation cluster region (innerhalb des APC-Gens)
MGB	Minor groove binder
MGCT	Mixed malignant GCT (dt. gemischter maligner Keimzelltumor)
min	Minute
miRNA	Micro-RNA; (micros, griech. klein), nicht-codierende RNA
mm	Millimeter
MMTV	Maus-Mammatumor Virus
mRNA	Messenger RNA (dt. Boten-RNA)
MSI	Microsatellite instability (dt. Mikrosatelliten-Instabilität)
n.a.	Nicht analysiert/nicht auswertbar
NF	Normalisierungsfaktor
nm	Nanometer
NSAID	Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (dt. nicht-steroidale, anti-entzündliche Wirkstoffe)
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphate-buffered saline (dt. Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)
PCP	Planar cell polarity (dt. planare Zellpolarität)
PCR	Polymerase chain reaction (dt. Polymerase-Kettenreaktion)
PKZ	Primordiale Keimzelle (Urkeimzelle)
qPCR	Quantitative Real-Time PCR (dt. quantitative Echtzeit-PCR)
RNA	Ribonucleic acid (dt. Ribonukleinsäure)
rpm	Rounds per minute (dt. Umdrehungen pro Minute; Zentrifugalkraft)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptions-PCR
RV	Reverse-Primer (dt. Rückwärtsprimer)
s	Sekunde
s.o./s.u.	Siehe oben/siehe unten
SAP	Shrimp Alkalische Phosphatase
siRNA	Small interfering RNA
Syn.	Synonym
T _a	Annealing-Temperatur (eines Primers)
TAE	Tris-Acetic-EDTA
TE	Tris-EDTA
TER	Teratoma (dt. Teratom, reif)
T _m	Schmelz-Temperatur (eines Primers)
TSA	Trichostatin A
U	Units
UKCCLG	United Kingdom Cancer and Leukemia Group
V	Volt
V-ATPase	ATPase der Vakuolen
VE-H ₂ O	Vollentsalztes (deionisiertes) Wasser
WB	Western Blot
YST	Yolk sac tumor (dt. Dottersacktumor)
Z.n.C.	Zustand nach Chemotherapie

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS II

GENE/PROTEINE

Symbol	Bezeichnung
ADAMTS1	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 1
AES	amino-terminal enhancer of split
AFP	alpha-fetoprotein
APC	adenomatous polyposis coli
AXIN	axis inhibitor
CBY	chibby homolog 1
CCND1	cyclin D1
CD34	hematopoietic progenitor cell antigen CD34
CDK4	cyclin-dependent kinase 4
CDKN2A	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
CHFR	checkpoint with forkhead and ring finger domains
CK1 α	casein kinase 1, alpha 1
CREB	cAMP responsive element binding protein 1
CtBP	C-terminal binding protein 1
CTNNB1	catenin (cadherin-associated protein), beta 1, 88 kDa
CXCL12	chemokine (C-X-C motif) ligand 12
DAB2	disabled homolog 2, mitogen-responsive phosphoprotein (Drosophila)
DACT3	dapper, antagonist of beta-catenin
DAD-R	defender against cell death 1 pseudogene 1
DAPK	death-associated protein kinase
DKK1	dickkopf homolog 1
DVL	dishevelled, dsh homolog 1 (Drosophila)
EpCAM	epithelial cell adhesion molecule
FAS	Fas (TNF receptor superfamily, member 6)
FRAT	frequently rearranged in advanced T-cell lymphomas
FZD2	frizzled homolog 2 (Drosophila)
GATA3	GATA binding protein 3
GBP	guanylate binding protein
GSK3 β	glycogen synthase kinase 3 beta
GUSB	glucuronidase, beta
HDAC	histone deacetylase
HPLAP	human placental alkaline phosphatase
HRAS	v-Ha-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog
ICAT	catenin, beta interacting protein 1
ID2	inhibitor of DNA binding 2, dominant negative helix-loop-helix protein
KRAS	v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
Krm	Kremen, kringle containing transmembrane protein 1
LEF	lymphoid enhancer-binding factor 1
Lgs/Bcl9	B-cell CLL/lymphoma 9
LRP5	low density lipoprotein receptor-related protein 5
MAD2	mitotic arrest deficient 2
MESD	mesoderm development candidate
MGMT	O-6-methylguanine-DNA methyltransferase
MTCO2	mitochondrially encoded cytochrome c oxidase II
MYC	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)
OCT3/4	octamer-binding transcription factor 3/4 (Syn. POU5F1)
POLR2A	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide A, 220 kDa
PTGER2	prostaglandin E receptor 2 (subtype EP2), 53 kDa

RanBP3	RAN binding protein 3
RASSF	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member
ROR2	receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 2
RSPO	R-spondin 2 homolog (Xenopus laevis)
RYK	RYK receptor-like tyrosine kinase
SFRP	secreted frizzled-related protein
SLC2A1	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 1
SNAI1	snail homolog 1 (Drosophila)
SOST	sclerostin
SRY	sex determining region Y
sSTAT	signal transducer and activator of transcription
TCF	transcription factor (T-cell specific)
TCF7L1	transcription factor 7-like 1 (T-cell specific, HMG-box)
TGF β	transforming growth factor, beta 1
TIMP3	TIMP metalloproteinase inhibitor 3
TP53	tumor protein p53
TRAILR1	TNFSF10, tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10
VASA	Syn. DDX4, probable ATP-dependent RNA helicase
WIF1	WNT inhibitory factor 1
WISE	SOSTDC1, sclerostin domain containing 1
WNT1	wingless-type MMTV integration site family, member 1
WTX	Wilms tumor gene on the X chromosome; Syn. FAM123B

MEDIZINISCHES GLOSSAR

Begriff	Bedeutung
Ascites, maligner	Bauchwassersucht infolge von Krebserkrankungen
benigne	gutartig
Carcinoma <i>in situ</i> (CIS)	auf das Gewebe ihres Ursprungs begrenzte Karzinome
Choriokarzinom	hochmaligner Keimzelltumor mit Trophoblasten und Synzytiotrophoblasten; somit Zellen des Mutterkuchens (Plazenta) entsprechend
Dignität	„Wertigkeit“ des Tumors im Hinblick auf Gut- bzw. Bösartigkeit
Dottersacktumor	Nicht-Seminom; maligner Keimzelltumor des Ovars bzw. des Hodens
Dysgerminom	maligner Keimzelltumor des Ovars; dem Seminom des Hodens entsprechend
Embryonales Karzinom	Nichtseminom; maligner Keimzelltumor des Ovars bzw. des Hodens
Embryonaler Tumor	Tumor, der während der Organentwicklung durch Gewebefehldifferenzierungen entsteht bzw. eine mikroskopische Differenzierung ähnlich embryonaler, unreifer Organe aufweist
extragonadal	außerhalb der Keimdrüsen (Gonaden) befindlich
Germinom	maligner Keimzelltumor des Zentralnervensystems; dem Seminom des Hodens entsprechend; auch als Oberbegriff für Seminome, Dysgerminome und Germinome verwendet
gonadal	die Keimdrüsen (Gonaden) betreffend
Hepatoblastom	maligner embryonaler Tumor der Leber im Kindesalter
Hepatozelluläres Karzinom	Leberzellkarzinom; maligne Erkrankung der Leberzellen (Hepatozyten)
Hodgkin-Lymphom	maligner Tumor des Lymphsystems
Gonaden	Keimdrüsen; Hoden (Testis) und Eierstock (Ovar)
Gonadoblastom	seltener Tumor des Hodens bzw. des Ovars
infiltrativ	durchwachsend
invasiv	Wachstum von Tumorgewebe in das umgebende Gewebe
Karzinom	maligne Neoplasie epithelialen Ursprungs
Keimzelltumor	von den Keimzellen ausgehender, embryonaler Tumor
Kolorektales Adenom	benigne Schleimhautgeschwulst des Dickdarms; Dickdarmpolypen
Kolorektales Karzinom	Kolonkarzinom; maligner Tumor des Dick- und Enddarms
konstitutionell	durch (genetische) Anlage bedingt; die Konstitution betreffend
maligne	bösartig
mediastinal	das Mediastinum betreffend; im Mediastinum lokalisiert
Mediastinum	der medial in der Brusthöhle liegende Raum; enthält alle Organe der Brusthöhle mit Ausnahme der beiden Lungen
Medulloblastom	maligner embryonaler Tumor des Kleinhirns im Kindesalter
Metastase	vom Primärtumor räumlich getrennte, gleichartige Tochtergeschwülste
Neoplasie	Neubildung von Körpergewebe; Gattungsbezeichnung für maligne Tumoren
Nephroblastom	Wilms-Tumor; maligner embryonaler Tumor der Niere im Kindesalter
Neuroblastom	maligner embryonaler Tumor des sympathischen Nervensystems bei Kindern
Nichtseminom	Sammelbegriff von Gewebearten bösartiger Hodentumoren von nicht-reinen Seminomen (u.a. Embryonales Karzinom, Choriokarzinom, Dottersacktumor, undifferenziertes Teratom)
Onkogenese	Entstehung (maligner) Tumoren
Osteosarkom	primärer, maligner Knochentumor
Pathogenese	Entstehung und/oder Verlauf (Progression) einer Erkrankung

pathognomisch	für eine Krankheit kennzeichnend
präsakral	ventral (bauchwärts) des Kreuzbeins
refraktär	unempfindlich; nicht beeinflussbar
rekurrent	wiederkehrend
Remission	vorübergehende oder dauernde Abschwächung der Krankheitssymptome
Resektion	komplette oder teilweise Entfernung eines Organs oder Gewebeabschnitts durch eine Operation
Retinoblastom	maligner embryonaler Tumor der Netzhaut des Auges bei Kindern
Retroperitoneum	hinterer Bauchraum; fettreicher Bindegewebsraum
Rezidiv	Wiederauftreten einer Erkrankung nach völliger Abheilung
Rhabdomyosarkom	maligne embryonale Neoplasie der Skelettmuskulatur bei Kindern
Seminom	maligner Keimzelltumor des Hodens
Seminomatöse KZT	Sammelbegriff für Seminome (Hoden), Dysgerminome (Ovar) bzw. Germinome (Zentralnervensystem)
solider Tumor	feste (solide), örtlich umschriebene Zunahme von körpereigenem Gewebe
Stroma	stützendes, lockeres Bindegewebe eines Organs
Teratokarzinom	entdifferenziertes, malignes Teratom
Teratom, immatur	Nichtseminom; potentiell maligner Keimzelltumor aus embryonalem Gewebe
Teratom, matur	Nichtseminom; benigner Keimzelltumor aus embryonalem Gewebe (aller drei Keimblätter)
testikulär	den Hoden betreffend; im Bereich des Hodens liegend
testikuläre Dysgenese	anlagebedingte Fehlentwicklung der Gonaden
thorakal	den Brustkorb bzw. den Brustraum betreffend
Trophoblast	äußere Zellschicht der Keimblase – bildet später den kindlichen Teil der Plazenta
Tumorgenese	Entstehung und/oder Verlauf (Progression) einer Krebserkrankung
Weichteilsarkom	maligne Tumoren (Sarkome) des Weichteilgewebes
Wilms-Tumor	Nephroblastom; maligner embryonaler Tumor der Niere im Kindesalter

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1.1: Histogenese von Keimzelltumoren.....	25
Abbildung 1.2: Verteilungsmuster von Keimzelltumoren im Kindes- und Jugendalter.	27
Abbildung 1.3: Progression vom Teratom zum Dottersacktumor.....	28
Abbildung 1.4: Der kanonische Wnt-Signalweg in Ab- und Anwesenheit eines Wnt-Signals.....	35
Abbildung 1.5: Proteininteragierende Domänen von β -Catenin.....	37
Abbildung 1.6: Wnt-Antagonist der sFRP-Familie mit verwandter Frizzled-CRD-Domäne.	39
Abbildung 1.7: Sezernierte Wnt-Antagonisten und -Agonisten.	40
Abbildung 1.8: Epigenetische Mechanismen.	43
Abbildung 1.9: Funktionelle Domänen des APC-Proteins.....	44
Abbildung 1.10: Mögliches Modell der EpCAM-Signaltransduktion.....	47
Abbildung 1.11: β -Catenin-Immunhistochemie an Keimzelltumoren.	49
Abbildung 3.1: Ablauf der Desaminierung.....	66
Abbildung 4.1: Ermittlung stabil exprimierter Referenzgene in KZT.	83
Abbildung 4.2: Relative <i>CTNNB1</i> -Expression in KZT.	85
Abbildung 4.3: β -Catenin-Expression in KZT.....	87
Abbildung 4.4: Mutationsanalyse des Exon 3 von <i>CTNNB1</i>	89
Abbildung 4.5: Relative <i>CCND1</i> -Expression in KZT.	90
Abbildung 4.6: Relative <i>c-MYC</i> -Expression in KZT.....	91
Abbildung 4.7: Relative <i>FZD2</i> -Expression in KZT.....	92
Abbildung 4.8: SNP rs41115 innerhalb der <i>Mutation Cluster Region</i> (MCR) des <i>APC</i> -Gens.	93
Abbildung 4.9: Mutationsanalyse des APC-Proteins in KZT.	94
Abbildung 4.10: Mikrosatellitenanalyse der Chromosomenregion 5q22.3 des <i>APC</i> -Gens.....	95
Abbildung 4.11: Mikrosatellitenanalyse der Chromosomenregion 5q21.1–5q23.1 in KZT.	96
Abbildung 4.12: CpG-Insel innerhalb des <i>APC</i> 1A-Promotors.....	97
Abbildung 4.13: Methylierungsstatus des <i>APC</i> 1A-Promotors in KZT.	98
Abbildung 4.14: Methylierungsstatus des <i>APC</i> 1A-Promotors im Fall #122.	99
Abbildung 4.15: Methylierungsstatus des <i>APC</i> 1A-Promotors der Fälle #43 und #119.	100
Abbildung 4.16: Methylierungsgrad des <i>APC</i> 1A-Promotors in KZT.	101
Abbildung 4.17: Relative <i>APC</i> -Expression in KZT.	103
Abbildung 4.18: Relative <i>AXIN1</i> -Expression in KZT.	104
Abbildung 4.19: Relative <i>Conductin</i> -Expression in KZT.	105
Abbildung 4.20: Relative <i>GSK3β</i> -Expression in KZT.....	106
Abbildung 4.21: Relative <i>WTX</i> -Expression in KZT.....	107
Abbildung 4.22: Relative <i>HRAS</i> -Expression in KZT.....	108
Abbildung 4.23: Relative <i>DACT3</i> -Expression in KZT.....	109
Abbildung 4.24: Relative <i>SNAI1</i> -Expression in KZT.	110
Abbildung 4.25: Relative <i>DVL1</i> -Expression in KZT.....	111
Abbildung 4.26: Relative <i>EpCAM</i> -Expression in KZT.	112
Abbildung 4.27: <i>EpCAM</i> -Expression in KZT.	115
Abbildung 4.28: Relative <i>SFRP1</i> -Expression in KZT.	116

Abbildung 4.29: Relative <i>SFRP4</i> -Expression in KZT.....	117
Abbildung 4.30: Relative <i>SFRP5</i> -Expression in KZT.....	118
Abbildung 4.31: Relative <i>SFRP2</i> -Expression in KZT.....	119
Abbildung 4.32: <i>SFRP2</i> -Expression in KZT.....	121
Abbildung 4.33: CpG-Inseln innerhalb des <i>SFRP2</i> -Promotorbereichs.....	122
Abbildung 4.34: Methylierung und Expression von <i>SFRP2</i> in KZT.	124
Abbildung 4.35: Methylierung, Expression und Reexpression von <i>SFRP2</i> in MCF-7-Zellen...	126
Abbildung 4.36: Methylierung und Expression von <i>SFRP2</i> in MCF-7- und KZT-Zellen.	127
Abbildung 4.37: Reexpression von <i>SFRP2</i> in MCF-7- und KZT-Zellen.....	130
Abbildung 4.38: Relative <i>DKK1</i> -Expression in KZT.....	131
Abbildung 4.39: CpG-Insel innerhalb des <i>DKK1</i> -Promotorbereichs.	132
Abbildung 4.40: Methylierungsstatus des <i>DKK1</i> -Promotors in KZT.	133
Abbildung 4.41: Methylierungsgrad des <i>DKK1</i> -Promotors der Fälle #4 und #63.	134
Abbildung 4.42: Relative <i>WIF1</i> -Expression in KZT.....	135
Abbildung 8.1: Methylierungsstatus der Gene <i>APC</i> , <i>DKK1</i> und <i>SFRP2</i> in KZT.....	194
Abbildung 8.2: Plasmidkarte des pCR [®] 2.1-TOPO [®] -Vektor.....	195

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1.1. Biologische Charakteristika von Keimzelltumoren.....	26
Tabelle 1.2. Genetische Charakteristika von Keimzelltumoren.	30
Tabelle 2.1. Analytierte Tumorentitäten und Fallzahlen (n).	51
Tabelle 2.2. Verwendete humane Zelllinien.....	54
Tabelle 2.3. Oligonukleotide für die PCR und Sequenzierung.	57
Tabelle 2.4. Oligonukleotide für die RT-PCR.....	58
Tabelle 2.5. Oligonukleotide für die methylierungsspezifische PCR.	58
Tabelle 2.6. Oligonukleotide für die Bisulfitsequenzierung.	59
Tabelle 2.7. Mikrosatellitenmarker.	59
Tabelle 2.8. TaqMan [®] Assays.....	60
Tabelle 2.9. Antikörper des PTT und der IHC.....	61
Tabelle 3.1. Gene der TaqMan [®] Human Endogenous Control Plate.....	71
Tabelle 3.2. Referenzsequenzen und GenBank-Nummern.....	74
Tabelle 4.1. Übersicht der β -Catenin-Immunhistochemie an KZT.....	88
Tabelle 4.2. Bisulfitsequenzierung des <i>APC</i> 1A-Promotors.	102
Tabelle 8.1. Detaillierte Auflistung analysierter Tumorfälle.....	190
Tabelle 8.2. Detaillierte Auflistung pro Tumorfall durchgeführter Analysen.....	192

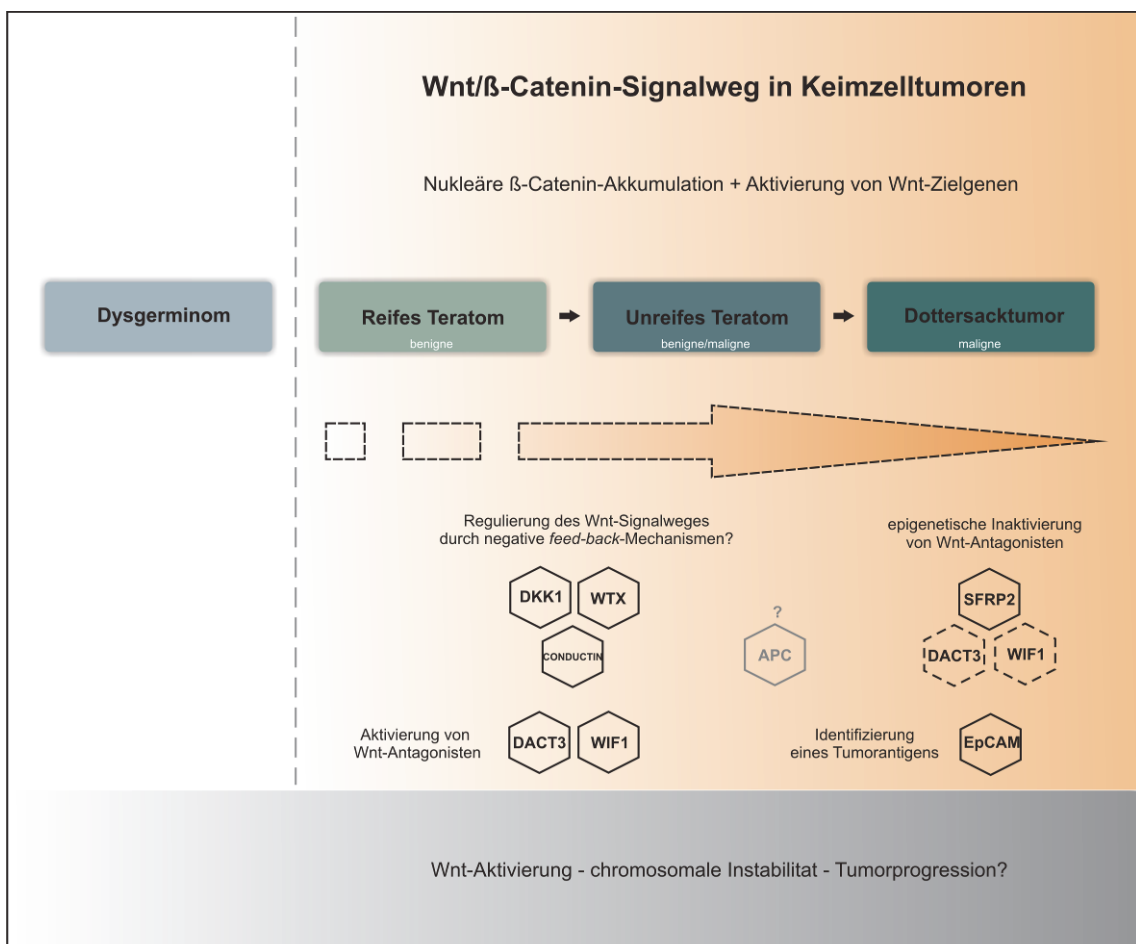
ZUSAMMENFASSUNG

Keimzelltumoren des Kindesalters umfassen eine heterogene Gruppe von embryonalen Tumoren. Klinische, histopathologische und molekularbiologische Analysen dieser Tumoren legen nahe, dass maligne (bösartige) Dottersacktumoren im Vergleich zu benignen (gutartigen) Teratomen eine spätere Stufe in der Tumorentwicklung darstellen. Die Progression vom reifen oder unreifen Teratom bis hin zum Dottersacktumor geht mit einem Zugewinn charakteristischer chromosomaler Imbalancen einher und verschlechtert die Prognose des Patienten entscheidend. Der Verlauf ist mit der Progression von benignen kolorektalen Adenomen zu malignen Karzinomen vergleichbar. Diese geht häufig mit Mutationen des Tumorsuppressorgens *APC* einher und resultiert in einer aberranten Aktivierung des kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalweges. Zu dessen zentralen biologischen Funktionen zählen unter anderem die Koordination der Embryonalentwicklung sowie die Kontrolle von Zellproliferation und Apoptose. Die aberrante, konstitutive Aktivierung des Wnt-Signalweges stellt einen der Hauptmechanismen in der onkogenen Transformation verschiedener Tumorentitäten, auch embryonaler Tumoren, dar und ist charakterisiert durch einen blockierten Abbau des Schlüsselproteins β -Catenin. Als Ursache dafür sind Veränderungen auf verschiedenen regulatorischen Ebenen identifiziert worden. Hinsichtlich der Bedeutung des Wnt-Signalweges lagen bei der Pathogenese von Keimzelltumoren des Kindesalters nur wenige, zudem kontroverse Daten vor.

Um die klinisch fassbaren Schritte der Tumorprogression bei Keimzelltumoren molekularbiologisch zu charakterisieren, wurde im Rahmen dieser Arbeit Material von insgesamt 50 Patienten mit Keimzelltumoren unterschiedlicher histologischer Subentitäten analysiert. Die Tumoren wurden auf genetische und epigenetische Aberrationen sowie Expressionsmuster zentraler intra- und extrazellulärer Regulatoren des Wnt-Signalweges untersucht. Die in dieser Arbeit erhobenen Daten demonstrieren eine konstitutive Aktivierung des Wnt-Signalweges in Keimzelltumoren. Der Nachweis einer β -Catenin-Akkumulation beschränkt sich jedoch auf einzelne Subentitäten und kann in nicht-seminomatösen Teratomen und Dottersacktumoren, nicht aber in Dysgerminomen erfolgen. Mutationen in den relevanten funktionellen Bereichen von β -Catenin und *APC* wurden nicht nachgewiesen. Methylierungsspezifische PCR und Bisulfitsequenzierung zeigten eine aberrante *APC*-Promotorhypermethylierung in Dottersacktumoren, zum Teil assoziiert mit einem Allelverlust. Weiterführende Analysen identifizierten *APC* jedoch als nicht ursächlich verantwortlich für eine aberrante Aktivierung des Wnt-Signalweges in Keimzelltumoren. Durch den anschließend mittels quantitativer Real-Time PCR durchgeführten molekularbiologischen Vergleich der Tumorsubentitäten wurde eine differentielle Genexpression insbesondere von Wnt-Antagonisten deutlich. Während in Teratomen eine Regulierung der Wnt-Signalwirkung durch negative *feed-back*-Mechanismen

denkbar ist, könnte die gleichzeitige Inhibition von Antagonisten wie *WIF1* und *DACT3* in Dottersacktumoren zur Malignisierung der Tumoren, und damit zu ihrer Progression beitragen. Die Repression des extrazellulären Wnt-Antagonisten *SFRP2* in Dottersacktumoren konnte in funktionellen Analysen auf eine aberrante Hypermethylierung des Promotors zurückgeführt werden. Die immunhistochemische Identifizierung von EpCAM als tumorassoziertes Antigen in Dottersacktumoren untermauert schließlich die Bedeutung des Wnt-Signalweges in Keimzelltumoren.

Aus den Daten dieser Arbeit ergibt sich eine weiterführende und genauere tumorbiologische Differenzierung der Subentitäten von Keimzelltumoren bei Kindern und Jugendlichen. Die Ergebnisse bieten damit zum einen ein besseres Verständnis der Progressionsschritte vom Teratom zum Dottersacktumor und liefern zum anderen die Grundlage für weiterführende Analysen, die in biologischen Therapieansätzen insbesondere bei therapieresistenten Tumoren resultieren könnten.

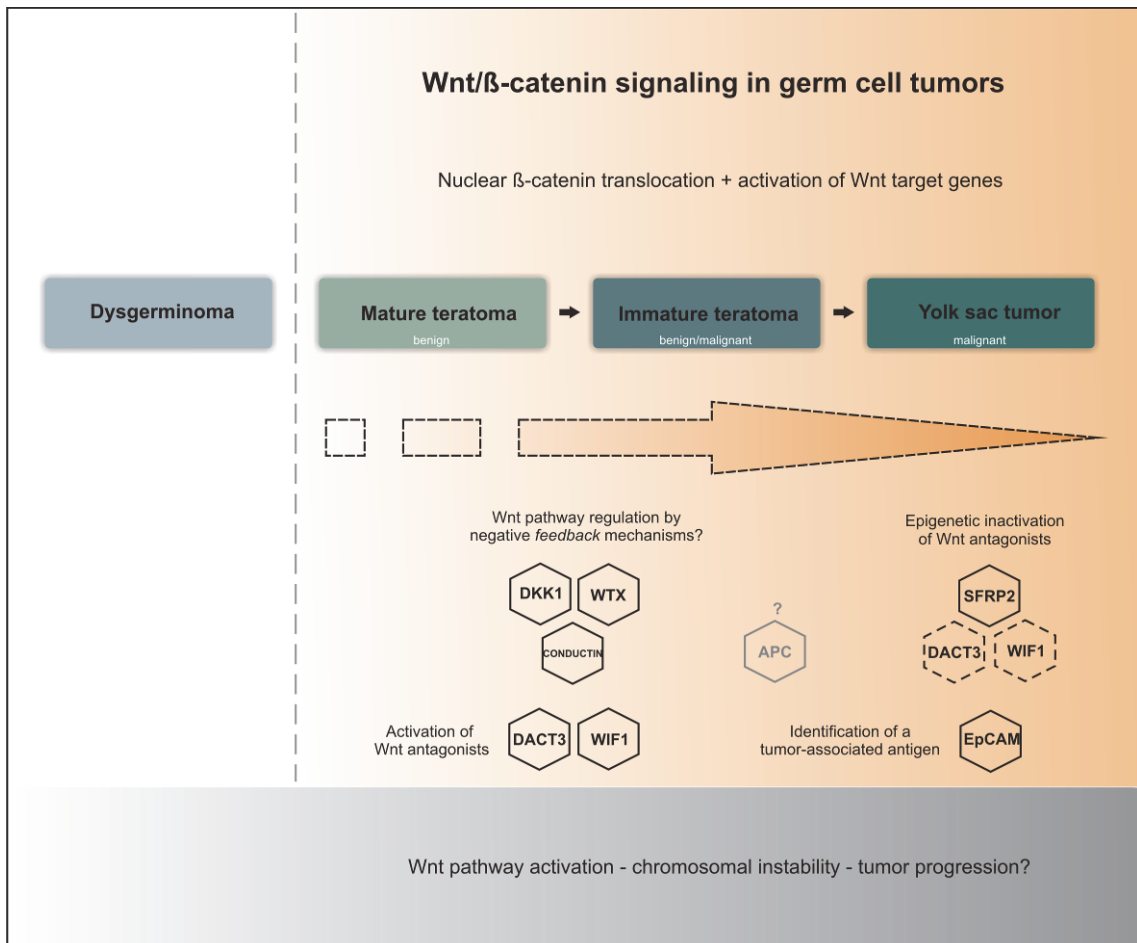


SUMMARY

Childhood germ cell tumors constitute a heterogeneous group of rare embryonal tumors. Clinical, histopathological as well as molecular biological analyses indicate that malignant yolk sac tumors represent a later stage in tumor development compared to benign teratomas. Clinical progression from teratoma to yolk sac tumor is genetically associated with a gain of characteristic chromosomal imbalances and determines patient's prognosis. This pattern is highly similar to the clinical evolution from benign adenomatous polyps to malignant invasive and metastatic adenocarcinomas in the colon. In the latter, underlying alterations of the tumor suppressor *APC* may result in an aberrant activation of the canonical Wnt/ β -catenin signaling pathway. Wnt signaling is required in embryonic development as well as in cell proliferation, differentiation and apoptosis. Aberrant, constitutive activation is a frequent event in the development and progression of multiple tumor entities, including embryonal tumors. Caused by changes at different regulatory levels, the Wnt signaling cascade is characterized by a blocked degradation of β -catenin. So far, merely preliminary and controversial data have been reported on the potential impact of Wnt signaling on the pathogenesis of childhood germ cell tumors.

To extend the hitherto existing data, we aimed to further characterize the clinical progression events in germ cell tumors. Therefore, we performed a comprehensive genetic, epigenetic and expression analysis of central intra- and extracellular Wnt regulators on different histological tumor entities of 50 patients. The results demonstrate a constitutive Wnt activation in specific germ cell tumor subentities. Nuclear β -catenin translocation could be detected in non-seminomatous teratomas and yolk sac tumors, but not in germinomas, respectively dysgerminomas. Mutations in the relevant functional areas of β -catenin and *APC* were not observed. Methylation sensitive PCR and bisulfite genomic sequencing revealed aberrant *APC* promoter hypermethylation in yolk sac tumors, to some extent associated with allelic loss. Nevertheless, additional analyses let us suggest that *APC* is unlikely to be solely responsible for activation of the Wnt pathway. Subsequent comparison of different tumor entities by quantitative real-time PCR revealed differential gene expression levels in particular of Wnt antagonists. Negative feedback control mechanisms in teratomas possibly regulate Wnt signaling, while simultaneous inhibitions of Wnt antagonists as *WIF1* and *DACT3* in yolk sac tumors potentially contribute to the malignant transformation of the tumors. In functional analyses we identified aberrant methylation of the *SFRP2* promoter to be responsible for the repression in yolk sac tumors. Immunohistochemical identification of EpCAM as tumor-associated antigen in yolk sac tumors finally highlights the significance of the Wnt pathway in germ cell tumors.

In summary, the results offer a more precise tumorbiological distinction of specific subentities of childhood germ cell tumors. This analysis may contribute to a better understanding of the progression steps from teratoma to yolk sac tumor. Moreover, the results also establish a basis for further molecular biological and functional analyses which could potentially result in therapy strategies in particular for therapy-resistant tumors.



1 EINLEITUNG

1.1 Keimzelltumoren des Kindes- und Jugendalters

Krebserkrankungen des Kindesalters sind nach Unfällen die zweithäufigste Todesursache bei Kindern von über einem Jahr. In Deutschland erkranken jährlich ca. 2000 Kinder an einer bösartigen Erkrankung. Dabei stellen Leukämien und andere Tumoren des blutbildenden Systems insgesamt die häufigsten Krebserkrankungen dar. Unter den soliden Tumoren überwiegen Hirntumoren – gefolgt werden diese von Neuroblastomen, Weichteilsarkomen, Wilms-Tumoren, Keimzelltumoren (KZT), Osteosarkomen und Retinoblastomen, die bei Kindern unter 15 Jahren jeweils einen Anteil von 3–8% zu der Gesamtanzahl der Krebserkrankungen beisteuern. Bei den 15–19 Jahre alten Patienten hingegen stellen KZT neben Hodgkin-Lymphomen die am häufigsten diagnostizierte Tumorerkrankung dar (Davidoff, 2010; Kinderkrebsregister, 2009).

Die Inzidenz der malignen KZT wird in Deutschland auf 0,6 Krankheitsfälle unter 100.000 Kindern geschätzt (Göbel *et al.*, 2000). Vorherrschende Lokalisationen sind bei Kindern bis zum Alter von 15 Jahren die Ovarien (26%), die Steißbeinregion (24%), das zentrale Nervensystem (18%) und die Hoden (18%). Seltener werden KZT im Mediastinum (4%), dem Retroperitonealraum (4%) oder der Vagina (2%) diagnostiziert (Göbel *et al.*, 2000; Schneider *et al.*, 2004).

Während der Kindheit sind Mädchen deutlich häufiger von KZT betroffen als Jungen. Dieses Geschlechterverhältnis kehrt sich nach der Pubertät um – mit einer Inzidenz von 7–8 Fällen pro 100.000 stellt der KZT den häufigsten soliden Tumor beim jungen Mann zwischen 20 und 35 Jahren dar. Das Lebenszeitrisiko eines Mannes, an einem Hodentumor zu erkranken, beträgt etwa 1% (Prentice und Meikle, 1995).

KZT werden zu den embryonalen Tumoren gezählt. Als solche werden jene im Kindesalter auftretenden Tumoren zusammengefasst, die unreife histologische Strukturen zeigen, wie sie während der Embryonalentwicklung zu finden sind. In der Regel enthalten die embryonalen Tumoren unreife Anteile von epitheliale oder mesenchymalem Gewebe. Entsprechend ihrer histologischen Unreife, oft in Kombination mit einer ausgeprägten Proliferationstendenz, werden sie auch als Blastome bezeichnet. Ihr histogenetischer Ursprung ist auf die Zeit der Gewebe- und Organentwicklung, die Organogenese, zurückzuführen. Häufig gehen sie mit Entwicklungsanomalien und Fehlbildungssyndromen einher. Diese Beobachtung lässt eine tiefgreifende zugrundeliegende Störung in der Organanlage und der Organdifferenzierung vermuten. So ist das Beckwith-Wiedemann-Syndrom, ein durch Veränderungen von Genen auf Chromosom 11p15.5 (u.a. *IGF2* und *H19*) hervorgerufenes Großwuchs-Syndrom mit einer Prädisposition für embryonale

Tumoren, v.a. Wilms-Tumoren und Hepatoblastome, aber auch Rhabdomyosarkome und Neuroblastome, assoziiert (DeBaun *et al.*, 1998; Sotelo-Avila *et al.*, 1980; Elliott *et al.*, 1994; Weksberg *et al.*, 2010). Für das Turner-Syndrom, welches die häufigste Aneuploidie des Menschen darstellt und durch eine Monosomie der Geschlechtschromosomen charakterisiert ist (45, X), ist ein erhöhtes Risiko für das Auftreten von benignen Gonadoblastomen bekannt (Scully, 1970). Diese durchlaufen in 60% aller Fälle eine Transformation zum invasiven Dysgerminom oder zu anderen malignen KZT (Looijenga *et al.*, 2003a). Auch für das Swyer-Syndrom, einer testikulären Feminisierung (46, XY), konnte eine signifikante Assoziation mit der Entstehung von KZT des Ovars nachgewiesen werden (Amarose *et al.*, 1977). Patienten mit dem Klinefelter-Syndrom (47, XXY) haben schließlich ein signifikant erhöhtes Risiko, mediastinale KZT zu entwickeln (Nichols *et al.*, 1987; Hasle *et al.*, 1995; Rajpert-de Meyts und Høie-Hansen, 2007).

1.1.1 Ursprung und Entwicklung

Der Zeitpunkt der Tumorentstehung wird im Fall der embryonalen Tumoren im Allgemeinen, der KZT im Speziellen, auf die frühe Embryonalphase der Schwangerschaft vermutet (Oosterhuis und Looijenga, 2005). Derzeit ist man jedoch noch weit davon entfernt, die Tumorentstehung sowie die weitere biologische Entwicklung (d.h. die Pathogenese) der KZT im Detail zu verstehen. Inwieweit Ereignisse wie beispielsweise Virusinfektionen die Entstehung maligner KZT begünstigen, wird ebenso diskutiert wie die Frage nach der Relevanz exogener Faktoren (u.a. kalorienreiche Ernährung im Kindesalter, Exposition gegenüber polychlorierten Kohlenwasserstoffen mit östrogenähnlicher Wirkung) (Strohsnitter *et al.*, 2001; Gilbert *et al.*, 2011). Insbesondere letztgenannter Faktor wird als mögliche Erklärung für die stetig steigende Inzidenz maligner testikulärer KZT in reichen Industrieländern diskutiert (Gray *et al.*, 1998; Skakkebaek *et al.*, 2001). Hier werden Parallelen zur ansteigenden Häufigkeit von genitalen Anomalien, wie beispielsweise der testikulären Dysgenese, deutlich.

Entsprechend dem holistischen Konzept der Histogenese nach Teilum (siehe Abbildung 1.1) entwickeln sich KZT aus Urkeimzellen (Teilum, 1965; Teilum *et al.*, 1975). Diese sogenannten primordialen Keimzellen (PKZ) sind totipotent und werden beim menschlichen Embryo in der fünften bis sechsten Entwicklungswoche gebildet, in der Maus bereits am sechsten bzw. siebten Tag (Surani, 2001). PKZ leiten die Embryogenese ein und besitzen die Fähigkeit, sich in embryonale und extraembryonale Strukturen (Dottersack- oder Choriongewebe) zu differenzieren. Sie sind die Vorläufer der Keimzellen (Gameten), die während der Keimbahnentwicklung entstehen und als haploide Zellen der geschlechtlichen Fortpflanzung dienen. Das Vorhandensein primordialer Keimzellen kann über den Nachweis von spezifischen Proteinmarkern, wie OCT3/4 (octamer-binding transcription factor 3/4), HPLAP

(humane plazentare alkalische Phosphatase) und VASA (Syn. DDX4, probable ATP-dependent RNA helicase) geführt werden (Honecker *et al.*, 2004b; Rajpert-De Meyts, 2006).

Als distinkte Zellpopulationen sind PKZ zunächst an der Basis der Allantois bzw. des Dottersacks darstellbar. Anschließend wandern sie aus dem Epiblast (dem Vorläufer der drei Keimblätter) entlang der Mittellinie des Körpers zu den Keimsträngen, wo sie sekundär die Gonadenanlagen besiedeln. Während der Gametogenese bilden sie sich dort in Abhängigkeit des Geschlechts des Embryos sowie der Mikroumgebung zu reifen, pluripotenten Keimzellen aus (Anderson *et al.*, 2000). Diese Entwicklung kann beim Mann nur stattfinden, wenn ein chromosomaler XY-Status und somit auch das *SRY*-Gen vorliegt, welches für den Transkriptionsfaktor TDF (testis-determining factor) kodiert (Shalet, 2009). Fehlen diese, wird die Oogenese eingeleitet und ein weiblicher Phänotyp entsteht. Eine Voraussetzung für die Wanderung der PKZ ist u.a. die Anwesenheit des Stammzellefektor-Rezeptors c-Kit und die Sekretion des Liganden SCF (stem cell factor) durch das gonadale Stroma (Besmer *et al.*, 1993; Blume-Jensen *et al.*, 2000). Darüber hinaus werden die Migration und das Überleben der PKZ durch SDF1 (soluble derived factor 1) und seinen Chemotaxin-Rezeptor CXCR4 (chemokine (C-X-C motif) receptor 4) gesteuert (Molyneaux *et al.*, 2003).

Vor ihrer Einwanderung in die Gonadenanlagen ordnen sich die PKZ paravertebral an. Es wird vermutet, dass zu diesem Zeitpunkt eine maligne Entartung der Zellen, ausgelöst durch Wachstumsreize oder epigenetische Mechanismen, gonadal oder – nach unvollständiger Migration – auch an extragonadalen Lokalisationen stattfinden kann (Gottlicher *et al.*, 2001; Smiraglia *et al.*, 2002; Schneider *et al.*, 2001b). Durch diese liegengebliebenen oder „versprengten“ Zellen, die die Keimanlagen nicht bevölkert und extragonadal überdauert haben, kann auch das Vorkommen der KZT „vom Scheitel bis zum Steiß“ (siehe Abschnitt 1.1) erklärt werden (Dehner, 1983; Oosterhuis *et al.*, 2007). Untersuchungen des genomischen Imprintings extragonadaler KZT zeigten einen Methylierungsstatus, der demjenigen unreifer PKZ während der Migration entspricht (Bussey *et al.*, 2001a; Schneider *et al.*, 2001b; Sievers *et al.*, 2005). Auch hinsichtlich der Genexpression lassen sich (testikuläre) KZT mit PKZ vergleichen (Gilbert *et al.*, 2011).

1.1.2 Histologie

Bei Keimzelltumoren handelt es sich um eine histologisch sehr heterogene Gruppe an Tumoren. Ihre Situation stellt sich im Vergleich zu anderen embryonalen Tumoren oder Tumoren des Erwachsenenalters besonders komplex dar, da sie sich an verschiedenen Stellen im menschlichen Organismus entwickeln und, im Fall der Teratome (s.u.), grundsätzlich jede Gewebedifferenzierung ausbilden können. Entsprechend dem holistischen Konzept von Teilum weisen die Tumorzellen abhängig vom Differenzierungspotential zum Zeitpunkt ihrer malignen Transformation eine

Differenzierung entweder in Richtung des Keimepithels, der embryonalen Stammzelle, des Embryos, der Plazenta (Trophoblast) oder des Dottersacks auf (Teilum *et al.*, 1975; Göbel *et al.*, 2000) (siehe Abbildung 1.1).

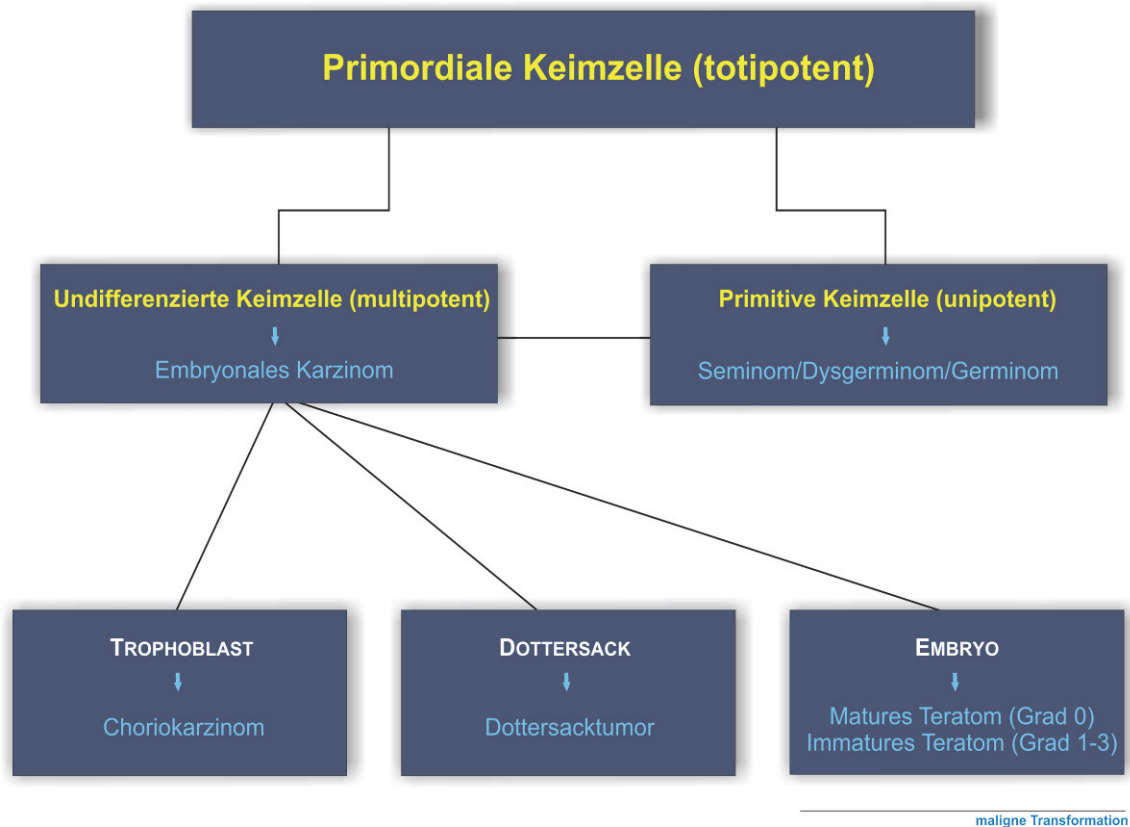


Abbildung 1.1: Histogenese von Keimzelltumoren.

Holistisches Konzept nach Teilum und Gonzales-Crussi (Teilum *et al.*, 1975; Gonzalez-Crussi, 1982). Bei maligner Transformation der Ursprungszelle (primordiale Keimzelle) und Differenzierung in Richtung der Keimbahn entstehen die malignen Germinome. Im Falle einer embryonalen Differenzierung multipotenter Keimzellen entwickeln sich die hochmalignen embryonalen Karzinome bzw. die benignen Teratome unterschiedlichen Reifegrades. Die klinisch als sezernierenden Tumoren bezeichneten Entitäten (Choriokarzinom, Dottersacktumor) sind Ausdruck einer extraembryonalen Differenzierung in Richtung der Plazenta (Trophoblast) bzw. des Dottersacks. Abbildung in Anlehnung an Teilum *et al.*, 1975; Gonzalez-Crussi, 1982; Göbel *et al.*, 2000.

Als hochmaligne Seminome des Hodens bzw. Dysgerminome des Ovars bzw. Germinome des zentralen Nervensystems („seminomatöse KZT“) werden diejenigen KZT klassifiziert, die eine dem unreifen Keimepithel vergleichbare histologische Differenzierung aufweisen. Entsprechend ihrer Histologie zeigen sie immunhistochemisch einen Phänotyp, wie er unreifen Stammzellen bzw. PKZ entspricht (u.a. Positivität für OCT3/4, c-kit oder HPLAP).

Findet eine embryonale, somatische Differenzierung statt, entwickeln sich das hochmaligne Embryonale Karzinom sowie die histologisch gutartigen Teratome unterschiedlicher Reifegrade. Embryonale Karzinome entsprechen Tumoren undifferenzierter, multipotenter Zellen und zeigen ebenfalls ein immunhistochemisches

Profil unreifer Stammzellen (Positivität für OCT3/4). Embryonale Karzinome sind bei Kindern vor Beginn der Pubertät selten (Schneider *et al.*, 2004). Sie werden ausschließlich bei Jugendlichen und meist als Komponente gemischter KZT (s.u.) beschrieben.

Teratome stellen insbesondere bei Neugeborenen den häufigsten histologischen Typ dar. Der histologische Reifegrad der Teratome bestimmt sich nach dem Anteil immaturer, meist neuroepithelialer Strukturen (Gonzalez-Crussi *et al.*, 1978). Reife (mature) Teratome (Unreifegrad 0) machen insgesamt mehr als 50% dieser Tumorgruppe aus. Sie enthalten Gewebe aller drei Keimblätter (Entoderm, Mesoderm, Ektoderm) und werden bei Neugeborenen vorzugsweise in der Steißbeinregion, bei älteren Mädchen überwiegend im Ovar diagnostiziert. Unreife (immature) Teratome (Unreifegrade 1, 2 und 3) zeigen in der Regel eine neuroepitheliale Differenzierung.

Bei einer extraembryonalen Differenzierung in Richtung des Trophoblasten bzw. des Dottersacks entwickeln sich schließlich die hochmalignen Choriokarzinome oder Dottersacktumoren. Sie werden aufgrund ihrer Tumormarkerproduktion (β -HCG (Humanes Choriongonadotropin) bzw. AFP (Alpha-1-Fetoprotein), siehe Tabelle 1.1) auch als sezernierende KZT zusammengefasst. Ihre Hauptlokalisationen sind die Steißbeinregion (bei Neonaten und Kleinkindern), die Hoden und Eierstöcke sowie das Gehirn.

Tabelle 1.1. Biologische Charakteristika von Keimzelltumoren.

AFP, Alpha-1-Fetoprotein; β -HCG, Humanes Choriongonadotropin; Gy, Gray (Dosiseneinheit in der Strahlentherapie). Tabelle verändert nach Göbel, 2007. (+), eingeschränkte Expression; +++, starke Expression bzw. gutes Therapieansprechen; -, Expression nicht nachweisbar bzw. therapieresistent.

Entität	Dignität	Tumormarker		Therapieansprechen	
		β -HCG	AFP	Chemotherapie	Bestrahlung (Gy)
Germinom	maligne	(+)	-	+++	24
Embryonales Karzinom	maligne	-	-	+++	45
Dottersacktumor	maligne	-	+++	+++	45
Choriokarzinom	maligne	+++	-	+++	45
Matures Teratom	benigne	-	(+)	-	≥ 54
Immatures Teratom	potentiell maligne	-	(+)	-	≥ 54

1.1.3 Epidemiologie

Die klinisch und histologisch sehr heterogenen KZT können in allen Altersgruppen, von der Fetalperiode bis in das hohe Alter auftreten (Göbel *et al.*, 2000). Es zeigt sich jedoch ein charakteristisches Altersmuster mit einer zweigipfeligen Altersverteilung, sodass sich die Tumoren bereits aus epidemiologischer Sicht in zwei Gruppen unterteilen lassen (siehe Abbildung 1.2).

Bei Neugeborenen und Kleinkindern wird der erste Häufigkeitsgipfel beobachtet. Hier

treten Teratome und Dottersacktumoren im Hoden, häufiger jedoch an extragonadalen Lokalisationen, wie dem Steißbein oder dem Mediastinum, auf. Bei Neugeborenen handelt es sich histologisch in der Regel um benigne reife oder unreife Teratome, die zumeist in den ersten Lebensstagen oder -wochen klinisch apparent werden. Gegen Ende des ersten Lebensjahres sowie im Kleinkindalter, mit einem Häufigkeitsgipfel im zweiten Lebensjahr, überwiegen hingegen maligne Tumoren wie die Dottersacktumoren. Bei Kleinkindern bis zum Alter von fünf Jahren machen Dottersacktumoren letztlich 89% aller malignen KZT aus. Diese Zahl nimmt mit dem sechsten Lebensjahr schließlich wieder ab. Von den gemischten malignen KZT des Jugendalters zeigen 7% eine Dottersacktumorkomponente. Choriokarzinome sowie Embryonale Karzinome treten in dieser Altersgruppe nur in seltenen Fällen auf (Schneider *et al.*, 2004).

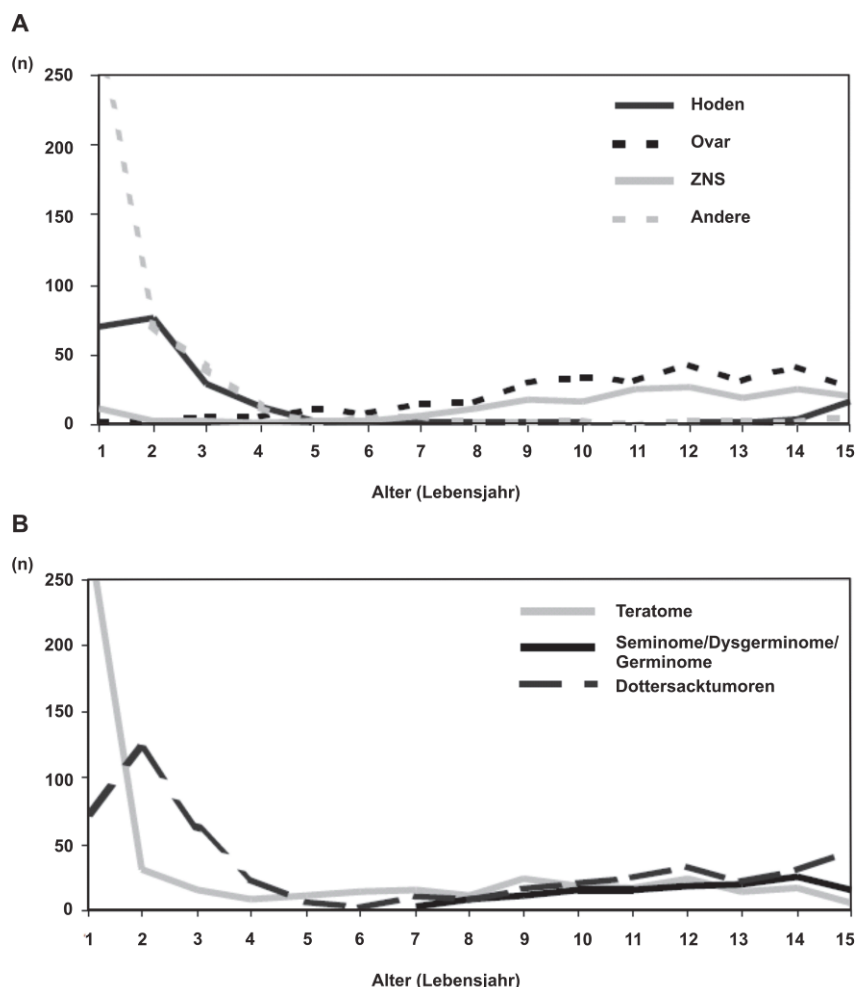


Abbildung 1.2: Verteilungsmuster von Keimzelltumoren im Kindes- und Jugendalter.

Epidemiologische Analyse an 1142 pädiatrischen Keimzelltumor-Patienten in Schneider *et al.*, 2004. **(A)** Zahl der erfassten Patienten im Alter bis 15 Jahre ($n = 1157$) in Abhängigkeit von der Tumorklassifikation. **(B)** Zahl der erfassten Patienten im Alter bis 15 Jahre ($n = 1157$) in Abhängigkeit von der Tumorklassifikation. Abbildung verändert nach Schneider, 2002.

Nach Beginn der Pubertät zeigt sich der zweite Häufigkeitsgipfel. Hier überwiegen die gonadalen KZT des Hodens und des Eierstocks. Die häufigsten extragonadalen Tumoren stellen die mediastinalen KZT sowie die Tumoren des Gehirns dar. In Abhängigkeit vom Erkrankungsalter zeigen sie zudem einen Wechsel der Geschlechtsprädisposition – extragonadale KZT bei Säuglingen und Kleinkindern treten häufiger bei Mädchen auf (2:1), während sie bei Jugendlichen überwiegend in Jungen anzutreffen sind (2,6:1). Schließlich werden bei Adoleszenten und Erwachsenen klinisch Seminome bzw. Dysgerminome von nicht-seminomatösen KZT und Teratomen unterschieden (Schneider *et al.*, 2004).

1.1.4 Vom Teratom zum Dottersacktumor – eine Progression

Nach histopathologischen und klinischen Kriterien werden Teratome bei Neugeborenen als benigne eingestuft. Sie metastasieren nicht, können aber nach inkompletter Resektion lokal rezidivieren. Mit zunehmendem Alter nimmt der Anteil von Teratomen mit signifikanten malignen Komponenten, in der Regel Dottersacktumorgewebe, stetig zu. Bereits bei Geburt werden aber bei bis zu der Hälfte aller Teratome nach gründlicher immunhistochemischer Aufarbeitung kleine Herde („Mikrofoci“) von Dottersacktumorgewebe erkennbar (Harms und Jänig, 1986) (siehe Abbildung 1.3). Entsprechend manifestiert sich die Hälfte aller Teratomrezidive als maligne Dottersacktumoren (Göbel *et al.*, 1998). Somit sind die Teratome mit Dottersacktumor-Mikrofoci bei strenger Auslegung bereits den malignen Tumoren zuzuordnen. Primär ist das Lokalrezidivrisiko dieser Tumoren allerdings von der kompletten Resektion abhängig, d.h. das Risiko steigt nicht in Abhängigkeit von malignen Mikrofoci.

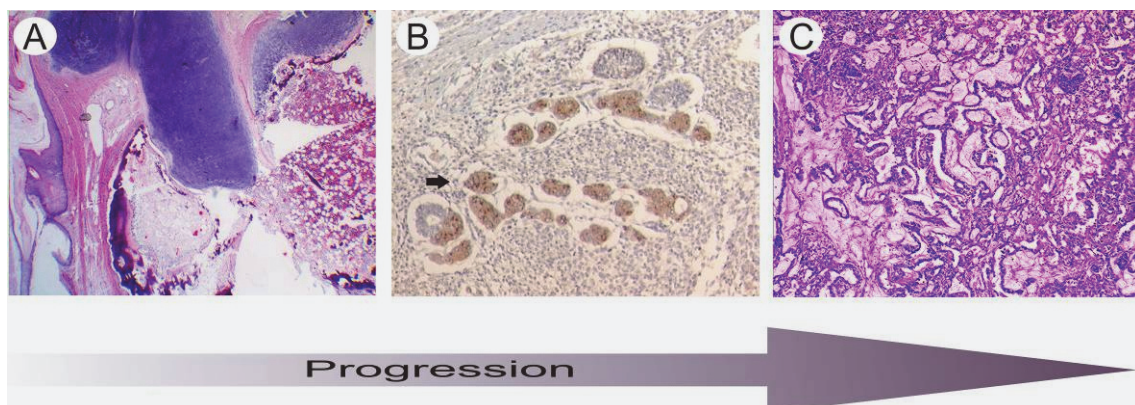


Abbildung 1.3: Progression vom Teratom zum Dottersacktumor.

Histologische Gewebeschnitte (A) eines benignen matten Teratoms (HE-Färbung), (B) eines immatures Teratoms mit mikroskopisch kleinen Herden malignen Dottersacktumorgewebes, sogenannten „Mikrofoci“ (siehe Pfeil; AFP-Immunfärbung) sowie (C) eines reinen, malignen Dottersacktumors (HE-Färbung). Abbildung (verändert) mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. med. D. Schneider.

Die Malignisierung in der Rezidivsituation korreliert mit einer signifikanten Beschleunigung des Tumorwachstums sowie dem Auftreten von Metastasen und bestimmt dadurch die weitere Prognose des Patienten entscheidend. Dottersacktumoren scheinen demnach im Vergleich zu Teratomen eine weiter fortgeschrittene Stufe in der Tumorentwicklung darzustellen. Die Annahme einer Progression vom Teratom zum Dottersacktumor wird durch den Befund gestützt, dass sich in fast der Hälfte der malignen Tumoren histologische Anteile von Dottersacktumor und Teratom wiederfinden lassen.

1.1.5 Molekularbiologie

KZT tragen charakteristische und diagnostisch differenzierende genetische bzw. zytogenetische Veränderungen, die die biologische Grundlage für die klinisch zu beobachtenden Unterschiede zwischen malignen KZT verschiedener Altersgruppen bilden. Die Hypothese der Progression vom Teratom zum Dottersacktumor wird daher auch durch molekularbiologische Untersuchungen gestützt. Alle bislang untersuchten Teratome bei Säuglingen und Kleinkindern zeigen in der zytogenetischen bzw. molekulargenetischen Analyse mittels komparativer genomischer Hybridisierung (CGH), Array-CGH, Mikrosatellitenanalyse oder Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) einen balanzierten diploiden Karyotyp ohne rekurrente Aberrationen (Bussey *et al.*, 1999; Bussey *et al.*, 2001b; Schneider *et al.*, 2001a; Veltman *et al.*, 2005). Dottersacktumoren hingegen sind in der Regel aneuploid. Zudem finden sich bei ihnen charakteristische Muster von chromosomalen Aberrationen, die unabhängig von der Tumorlokalisierung sind. Hierzu gehört der Verlust der Heterozygotie (LOH) am Chromosom 1p in fast allen Tumoren, der telomernahe LOH an 6q, der den Bereich des IGF2-Rezeptors einschließt, sowie der Zugewinn an 20q in der Mehrheit der Tumoren (Stock *et al.*, 1994; Perlman *et al.*, 1996; Perlman *et al.*, 2000; Hu *et al.*, 2001; Schneider *et al.*, 2001a; Schneider *et al.*, 2002; Veltman *et al.*, 2005; Zahn *et al.*, 2006). Die FISH-Analyse eines gemischten Keimzelltumors ergab weiterhin, dass die 1p Aberrationen ausschließlich auf die malignen Anteile beschränkt waren (Stock *et al.*, 1994). Teratome und Dottersacktumoren des Säuglings- und Kleinkindalters werden aufgrund dieses charakteristischen molekularbiologischen Musters in den aktuellen Klassifikationssystemen der World Health Organization (WHO) als klinisch und biologisch eigenständige Entität geführt (Oosterhuis und Looijenga, 2005).

Die zytogenetisch bislang am besten charakterisierte Untergruppe der KZT stellen maligne, postpubertal auftretende testikuläre KZT dar. Bei ihnen handelt es sich um polyploide (Seminome) bzw. aneuploide (Nichtseminome) Tumoren. Hier finden sich charakteristische chromosomale Aberrationen, die wiederum bei den Tumoren der Säuglinge und Kleinkinder nur selten oder gar nicht anzutreffen sind. Hinsichtlich der Pathogenese invasiver testikulärer KZT scheinen Aberrationen des Chromosoms 12 ein konsistent vorkommendes Ereignis zu sein. In nahezu all diesen Tumoren sind

multiple Kopien des Chromosoms 12p nachweisbar (Henegariu *et al.*, 1998; Summersgill *et al.*, 1998). In etwa 40% können Aberrationen des langen Arms von Chromosom 12 – überwiegend in Form einer Deletion in den Regionen 12q13 und 12q22 – ermittelt werden.

Der pathognomonische Befund der testikulären, ovarialen und extragonadalen KZT bei Jugendlichen und Erwachsenen ist aber das Isochromosom 12p, i(12p) (Atkin und Baker, 1982; Atkin und Baker, 1983). Hierbei handelt es sich um ein metazentrisches Chromosom mit zwei identischen kurzen Armen, das in gut 80% der Tumoren vorhanden ist und in allen Carcinoma *in situ* (CIS) bzw. testikulären intratubulären Neoplasien, der obligatorischen Frühform des KZT im Hoden, nachgewiesen werden kann (Delozier-Blanchet *et al.*, 1985; Samaniego *et al.*, 1990). Bei KZT im Säuglings- und Kleinkindalter tritt diese zyto- und molekulargenetische Auffälligkeit hingegen nicht auf. Die Mehrzahl der i(12p)-negativen Tumoren zeigt dafür eine Amplifikation bestimmter Regionen des kurzen Arms von Chromosom 12, die in der Regel einen interstitiellen Abschnitt bei 12p11–12 umfasst (Samaniego *et al.*, 1990; Rodriguez *et al.*, 2003; Zafarana *et al.*, 2003).

Tabelle 1.2 fasst die Zytogenetik der KZT in Abhängigkeit des Alters und der Lokalisation zusammen.

Tabelle 1.2. Genetische Charakteristika von Keimzelltumoren.

Amp, Amplifikation; CHC, Choriokarzinom; EC, Embryonales Karzinom; G, Germinom; i(p12), Isochromosom 12p; TER, Teratom; YST, Dottersacktumor. Tabelle verändert nach Schneider, 2002.

Alter	Lokalisation	Histologie	Genetik
Säuglinge	Hoden, Ovar	TER, YST	TER: normal, diploid
Kleinkinder	Extragondal		YST: -1p, +1q, -6q, +20q, diploid, tetraploid
Jugendliche	Hoden	TER, G, EC, YST, CHC	TER: selten i(p12), diploid
			Andere: in >90% i(p12) bzw. amp12p11-12, aneuploid
Jugendliche	Ovar	TER, G, EC, YST, CHC	TER: (23, X)x2
			Andere: i(p12) bzw. amp12p11-12, aneuploid
Jugendliche	Extragondal	TER, G, EC, YST, CHC	TER: +X, -Y
			Andere: i(p12) bzw. amp12p11-12, +X (z.T. konstitutionell), -Y, aneuploid

Man geht daher zum einen davon aus, dass dem Isochromosom 12p eine zentrale pathogenetische Bedeutung für die Tumorprogression nach der Tumorentstehung zukommt (Looijenga *et al.*, 2003b). Da zum anderen auch bei Tumoren ohne Isochromosom 12p Tandemduplikationen von Chromosom-12p-Material nachgewiesen worden sind, könnte die Amplifikation bzw. Modifikation eines oder

mehrerer Gene auf dem kurzen Arm von Chromosom 12 sogar eine Schlüsselrolle in der Entwicklung der KZT spielen.

Auf molekularer Ebene haben Chaganti und Houldsworth für adulte KZT des Hodens ein Konzept der Tumorinitiation zur Diskussion gestellt, welches von einem Ungleichgewicht zwischen Zellvermehrung und Apoptose, u.a. infolge einer *TP53*-Mutation, ausgeht (Chaganti und Houldsworth, 2000). Bei dem zentralen Ereignis der Apoptosedefizienz könnte es sich um eine *TP53*-Inaktivierung handeln, welches als funktionsloses Wildtypprotein in neoplastischen Keimzellen vorkommt. Dieser Funktionsverlust ist jedoch von Aberrationen auf Chromosom 12 unabhängig (Burger *et al.*, 1997). Tatsächlich befinden sich zahlreiche andere am Zellzyklus beteiligte Gene auf Chromosom 12, wie *CCND2*, *CDK4*, *KRAS* und *DAD-R*. Daher werden beispielsweise auch eine Überexpression von *CCND2* oder *DAD-R* als frühe Ereignisse der Tumorgenese von KZT diskutiert (Houldsworth *et al.*, 1997; Schmidt *et al.*, 2001; Zafarana *et al.*, 2002). Über welche Mechanismen diese und weitere von Chromosom 12 codierte Gene jedoch zur Pathogenese der KZT beitragen, ist bisher noch nicht geklärt.

1.2 Der Wnt-Signalweg – Funktion und Regulation

Zellteilung, Differenzierung und Apoptose sind Prozesse, die während der Embryogenese für das Wachstum und die Ausbildung der Organe verantwortlich sind. Im Verlauf der Embryogenese wird die zeitliche und lokale Koordination eines solchen Prozesses über komplexe intrazelluläre Signalwege vermittelt. Hierbei spielt der Wnt-Signalweg als Netzwerk aus mehreren interagierenden Signalkaskaden eine zentrale Rolle. Gemeinsam mit einem halben Dutzend anderer Signalwege, wie u.a. dem Notch-, dem Hedgehog- oder dem TGF β -Signalweg, kontrolliert er als hochkonserviertes System die embryonale Entwicklung und homöostatische Gewebeerneuerung. Damit ist er in nahezu jeden Aspekt der Embryogenese involviert (Brivanlou und Darnell, 2002; Clevers, 2006; Klaus und Birchmeier, 2008). Neben der Regulation von Zellproliferation, -morphologie und -migration ist der Wnt-Signalweg auch an der Aufrechterhaltung des Stammzellpools in verschiedenen Organen, wie zum Beispiel den Basalzellen der Darmkrypten, den Haarfollikelzellen und auch den Keimzellen beteiligt. Eine Aktivierung des Wnt-Signalweges resultiert dabei in einer anhaltenden Proliferation der Stammzellen bei gleichzeitig reduziertem Differenzierungspotential (Polakis, 2000; Yamaguchi, 2001; Miller, 2002).

Störungen im Ablauf der Signaltransduktion sind daher auch in eine Vielzahl pathologischer Prozesse involviert. Diese schließen degenerative Erkrankungen und Krebs ein (Logan und Nusse, 2004). Eine Deregulation des Wnt-Signalweges resultiert in einer Überaktivierung der Signalkaskade. Dies führt sowohl im Menschen als auch im Modellsystem zur Entstehung und zur Progression von Tumoren (siehe

Abschnitt 1.3). *Gain-of-function*-Mutationen können in einer onkogenen Aktivität von Wnt-Aktivatoren resultieren, während *loss-of-function*-Mutationen zum Verlust der Tumorsuppressoraktivität von Wnt-Inhibitoren führen können (Clevers, 2006; Klaus und Birchmeier, 2008). Indem sie zudem für die Mobilisierung von Tumorzellen in Metastasierungsprozessen verantwortlich sind, können die selben Signalwege, die Zellwanderungen während der Embryogenese steuern, ebenfalls entscheidend zur Tumorentwicklung beitragen (Bogenrieder und Herlyn, 2003).

Die Bezeichnung Wnt stellt ein Anagramm der Gene „*Wingless*“ und „*Int1*“ dar (Nusse *et al.*, 1991). Nusse und Varmus identifizierten 1982 den archetypischen Liganden des Wnt-Signalweges, das Proto-Onkogen *Int1*, als bevorzugte genomische Integrationsstelle des Maus-Mammatumor Virus (MMTV). Das Gen, das heute als *Wnt1* bezeichnet wird, war das erste Gen, das in spontan auftretenden Brusttumoren bei Mäusen identifiziert werden konnte. Es wird durch die Insertionen des MMTV transkriptionell aktiviert (Nusse und Varmus, 1982). Das in *Drosophila* entdeckte *Wingless*-Gen (*Wg*) wiederum kontrolliert während der Larvenentwicklung die Segmentpolarität (Nüsslein-Volhard und Wieschaus, 1980) und stellt das Homolog zu *Wnt1* dar (Rijsewijk *et al.*, 1987). Zwei weitere Wnt-Gene, *Wnt3* und *Wnt10b*, konnten ebenfalls in einen Zusammenhang mit der MMTV-induzierten Karzinogenese gebracht werden. Hierbei wiesen transgene MMTV-*Wnt10b*-Mäuse im Vergleich zu *Wnt1*-Mäusen neben einem ähnlichen Phänotyp auch eine Prädisposition für Brustkrebs auf (Michaelson und Leder, 2001). Die Beteiligung von β -Catenin in diesen Tumoren ließ schließlich auf eine Rolle des Wnt-Signalweges bei der murinen Brustkrebs-Karzinogenese schließen. Mäuse mit trunkierenden Mutationen des Wnt-Inhibitors *Apc* zeigten entsprechend eine erhöhte Anfälligkeit für diese Tumoren (Moser *et al.*, 1993). Die Identifikation weiterer Gene etablierte eine Wnt-Familie. Im Laufe der Jahre nach der Entdeckung von *Int1* wurden die meisten Komponenten und Mechanismen der Wnt-Signaltransduktion durch genetische und biochemische Experimente in Modellorganismen und in der Zellkultur identifiziert. So wurden Experimente zur Epistase an *Drosophila* und Mäusen durchgeführt und ergänzten Tests zur Axenformation in *Xenopus*-Embryonen. Analysen bezüglich Proteininteraktionen fanden indes im Hefe Di-Hybrid System und an Zelllinien statt (Klaus und Birchmeier, 2008).

Das Säugetiergenom codiert für mindestens 19 Wnt-Proteine (MacDonald *et al.*, 2009). Bei den Signalmolekülen (Morphogene) handelt es sich um evolutionär hochkonservierte, sezernierte und hydrophobe Glykoproteine mit diversen Zell-Oberflächenrezeptoren und einer N-terminalen, cysteinreichen Domäne mit Palmiotylrest (Willert *et al.*, 2003; Logan und Nusse, 2004). Sie dienen als Liganden für rezeptorvermittelte Signalwege. Wie 1996 in *Drosophila* erstmals gezeigt werden konnte, wird die Wnt-Signalkaskade durch die Bindung der Moleküle an transmembrane Frizzled (Fz)-Rezeptoren ausgelöst (Bhanot *et al.*, 1996). Im selben Jahr wurden auch Fz-Proteine von Vertebraten als Rezeptoren für Wnt-Liganden

identifiziert (Yang-Snyder *et al.*, 1996). Derzeit sind zehn Fz-Rezeptoren bekannt (MacDonald *et al.*, 2009). In Abhängigkeit des spezifischen Liganden-/Rezeptorkomplexes aktiviert die Bindung verschiedene intrazelluläre Signalwege (van Amerongen *et al.*, 2008). Bei den Fz-Proteinen handelt es sich um Zelloberflächen-Rezeptoren mit sieben Transmembrandomänen. Phylogenetisch lassen sie sich der großen Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) zuordnen (Bjarnadottir *et al.*, 2006), und vergleichbar mit den GPCRs liegen die Fz-Rezeptoren sowohl in homo- als auch in heteromeren Komplexen mit anderen Mitgliedern der Fz-Familie vor (Kaykas *et al.*, 2004). Fz-Proteine kooperieren in der Regel mit einem weiteren transmembranen Molekül, LRP5/6 (Low Density Lipoprotein (LDL) Receptor Related Protein), über welches das Signal schließlich in das Innere der Zelle übertragen wird (Pinson *et al.*, 2000; Tamai *et al.*, 2000) (siehe Abschnitt 1.2.1).

Es scheint sich zunehmend zu bestätigen, dass auch endozytotische Prozesse in die Aktivierung der Fz-Rezeptoren involviert sind. In *Drosophila* war die dominant-negative Form von Rab5 (GTPase, die in der Nähe früher Endosomen lokalisiert ist) in der Lage, frühe endosomale Fusionen zu verhindern und die Wnt-Signalweg-Aktivität zu verringern (Seto und Bellen, 2006). Nachfolgende Experimente in kultivierten Säugerzellen wiesen ebenfalls auf eine direkte Beteiligung der Endozytose hin (Blitzer und Nusse, 2006; Yamamoto *et al.*, 2006). Der genaue Mechanismus bleibt unklar – aktuelle Arbeiten weisen jedoch sowohl im Wnt- als auch im Notch-Signalweg auf eine V-ATPase-Funktion hin, die mit einer Ansäuerung der umgebenden Kompartimente einhergeht (Niehrs und Boutros, 2010). Im Gegensatz zum Notch-Signalweg sind in den Wnt-Signalweg verschiedene Rezeptoren und mehrere Signalwege involviert (Angers und Moon, 2009). Wnt-Liganden binden auch an Rezeptoren, die nicht der Fz-Familie angehören. So aktivieren einige Wnt-Moleküle die Rezeptor-Kinasen ROR2 und RYK (Hikasa *et al.*, 2002; Yoshikawa *et al.*, 2003). Diese Beobachtung unterstützt die Hypothese, dass Wnt-Proteine nur im Ausnahmefall einzigartig für den Wnt-Signalweg sind. Vielmehr können sie verschiedene intrazelluläre Signalwege aktivieren, woraus eine komplexe Kreuzvernetzung entsteht.

Nach heutigem Kenntnisstand kann die Wnt-Signaltransduktion in mindestens drei Signalwege unterteilt werden. Dem klassischen, kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalweg, der Gegenstand der zugrundeliegenden Arbeit ist und im Folgenden detailliert beschrieben wird (siehe Abschnitt 1.2.1), stehen nicht-kanonische, β -Catenin-unabhängige Signalwege gegenüber. Fz-Rezeptoren können in Abwesenheit der Ko-Rezeptoren LRP5/6 auf Wnt-Signale reagieren und die nicht-kanonischen Signalwege aktivieren. Diese kontrollieren differenzierte Prozesse, wie unter anderem die planare Zellpolarität von Haarsinneszellen, die Formation von Gewebegrenzen oder die dorsoventrale Musterbildung während der Gastrulation (Winklbauer *et al.*, 2001; Dabdoub *et al.*, 2003; Westfall *et al.*, 2003). Im Gegensatz zum kanonischen Wnt-Signalweg ist hier der Großteil der zugrundeliegenden molekularen Mechanismen noch nicht verstanden. Es besteht jedoch Einigkeit darüber, dass β -Catenin-

unabhängige Wnt-Signalwege der β -Catenin-abhängigen Signalkaskade entgegenwirken können (Torres *et al.*, 1996). Dieser antagonistische Effekt spielt sowohl in der Geweberegeneration als auch für das Überleben von Vorläuferthymozyten eine physiologisch relevante Rolle (Liang *et al.*, 2007; Stoick-Cooper *et al.*, 2007). Die am besten charakterisierten nicht-kanonischen Signalwege stellen der Wnt/PCP-Signalweg (PCP, *planar cell polarity*) sowie der kalziumabhängige Wnt/ Ca^{2+} -Signalweg dar (Mosimann *et al.*, 2009). Während der Wnt/PCP-Signalweg vor allem für die Ausbildung der planaren Zellpolarität in den Augen und Flügeln von *Drosophila* bedeutsam ist, wirkt der Wnt/ Ca^{2+} -Signalweg über eine Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration und ist neben entwicklungsregulatorischen Prozessen auch in die Entstehung von Tumoren involviert. Nach Bindung von Wnt-Molekülen an Fz-Rezeptoren aktivieren G-Proteine die Phospholipase C, was schließlich über den erhöhten Kalziumspiegel zu einer Aktivierung von *Downstream*-Effektoren, wie der Proteinkinase C (PKC), führt. Über die PKC/ Ca^{2+} -Kaskade sowie die Induktion einer epithelialen-mesenchymalen Transition ist Wnt5a zum Beispiel in der Lage, die Metastasierung von Melanomen zu regulieren (Dissanayake *et al.*, 2007). Insgesamt lässt sich die nicht-kanonische Signaltransduktion als äußerst divers beschreiben (Semenov *et al.*, 2007).

Wnt-Signale spielen sowohl in der Entwicklung von einfachen Vielzellern, wie dem Süßwasserpolyphen (griech. Hydra), als auch in komplexen Säugetieren eine entscheidende Rolle bei grundlegenden musterbildenden Prozessen (Cadigan und Nusse, 1997; Hobmayer *et al.*, 2000). Hierzu zählen die Festlegung der primären Körperachsen oder die korrekte Anlage von Gehirnstrukturen. In der Art *Trichoplax adhaerens* (Placozoa), der strukturell einfachsten aller vielzelligen Tiere, können Komponenten des Wnt-Signalweges zum ersten Mal ausgemacht werden (Srivastava *et al.*, 2008).

1.2.1 Der kanonische Wnt-Signalweg

Hinsichtlich der Komponenten und Mechanismen der Wnt-Signaltransduktion stellt der kanonische Wnt-Signalweg den am besten charakterisierten Signalweg dar. Er steuert die Regulation von Zielgenen über die Regulierung der cytosolischen β -Catenin-Konzentration und nimmt eine entscheidende Rolle im Rahmen von Tumorentstehung und -progression ein (Lustig und Behrens, 2003).

Für die Steuerung von Signalkaskaden spielen zwei Regulationsmechanismen eine entscheidende Rolle – zum einen die posttranslationale Regulation, bei der die Aktivität eines Zielproteins in der Regel durch Phosphorylierung verändert wird. Zum anderen kann, wie im kanonischen Wnt-Signalweg, die Regulation über Transkriptionsfaktoren erfolgen, die in Wechselwirkungen mit der DNA ihrer Zielgene treten und dadurch deren Transkription steuern. Eine Vielzahl verschiedener Mechanismen reguliert den kanonischen Wnt-Signalweg in der Ab- bzw. Anwesenheit

eines Wnt-Signals (siehe Abbildung 1.4).

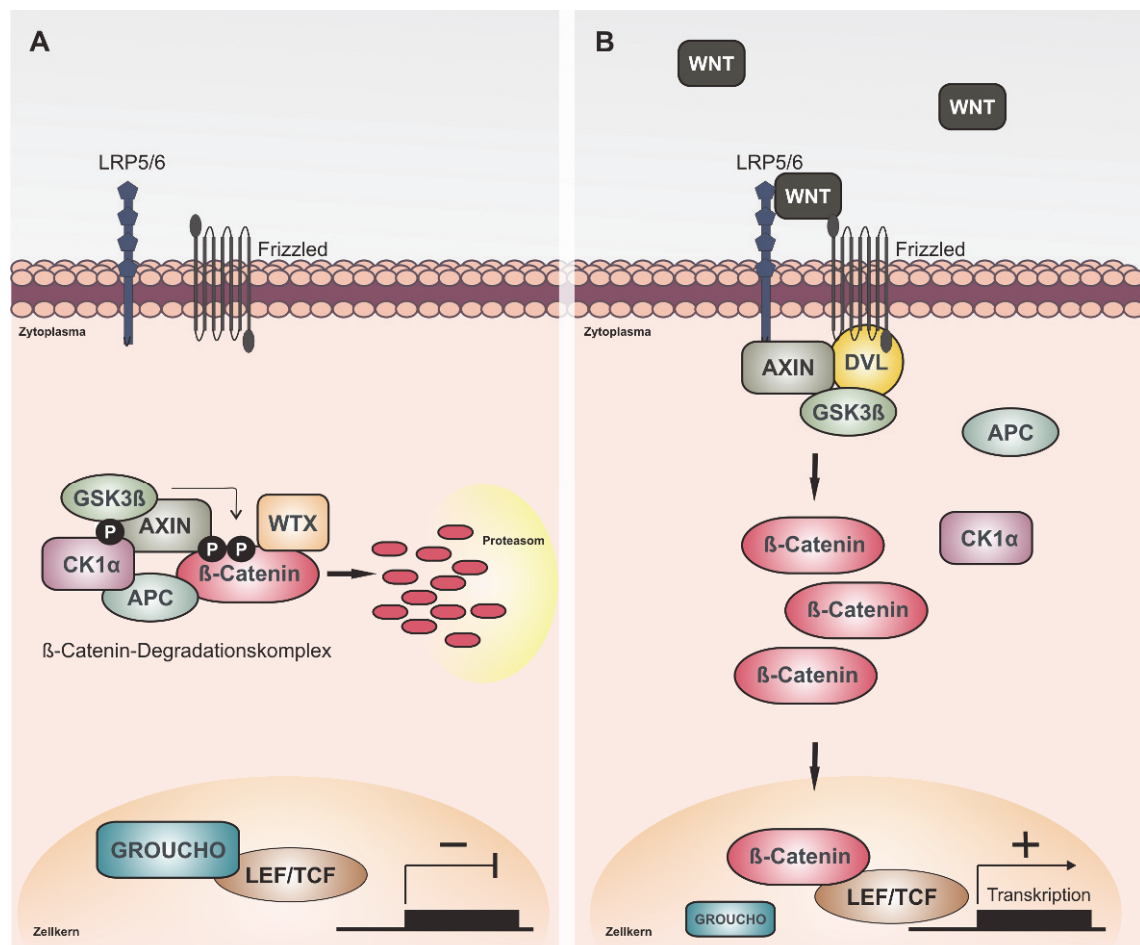


Abbildung 1.4: Der kanonische Wnt-Signalweg in Ab- und Anwesenheit eines Wnt-Signals.

(A) In Abwesenheit eines extrazellulären Wnt-Signals wird β -Catenin in einem multimerischen Degradationskomplex phosphoryliert und zum Abbau durch Proteasomen freigegeben. (B) Durch die Bindung spezifischer Wnt-Moleküle an membranständige Rezeptorkomplexe wird der β -Catenin-Degradationskomplex destabilisiert und es kommt zur Stabilisierung und Akkumulation von β -Catenin im Zytoplasma. Dies resultiert in einer Translokation von β -Catenin in den Zellkern, der Interaktion mit Transkriptionsfaktoren der LEF/TCF-Familie sowie der Transkription Wnt/ β -Catenin-spezifischer Zielgene. Weitere Erläuterungen siehe Text. Abbildung angelehnt an Sethi und Vidal-Puig, 2010.

In Abwesenheit eines Wnt-Signals liegt der Wnt-Signalweg inaktiv vor (siehe Abbildung 1.4, A). Hierbei wird die intrazelluläre β -Catenin-Konzentration durch einen konstanten, kontrollierten Abbau des Proteins in einem multimerischen Degradationskomplex reguliert (Kimelman und Xu, 2006). In dem Komplex nimmt das Adenomatöse Polyposis Coli (APC) eine zentrale regulatorische Funktion ein. Gemeinsam mit AXIN1 (Syn. AXIN) und AXIN2 (Syn. Conductin) dient es als Gerüstprotein und vermittelt die Bindung und Phosphorylierung des cytosolischen β -Catenin durch die Casein-Kinase 1 α (CK1 α) sowie die Glykogen Synthase Kinase 3 β (GSK3 β) (Amit *et al.*, 2002). AXIN verwendet unterschiedliche Domänen, um mit CK1 α , GSK3 β und β -Catenin zu interagieren. Es koordiniert die fortlaufende

Phosphorylierung von β -Catenin durch CK1 α zunächst an Serin 45 und anschließend durch GSK3 β an Threonin 41, Serin 37 und schließlich Serin 33 (Kimelman und Xu, 2006) (siehe Abbildung 1.5). Beide, CK1 α und GSK3 β , phosphorylieren die aminoternale Region von β -Catenin (Serin 33 und 37), welches daraufhin eine Bindestelle für die E3 Ubiquitin-Ligase β -TrCP erhält. Nach Ubiquitinierung durch β -TrCP wird β -Catenin schließlich zum Abbau in 26S-Proteasomen freigegeben (He *et al.*, 2004). Im Zellkern setzt TCF (T-cell factor) durch die Rekrutierung von GROUCHO, CtBP und Histondeacetylasen (HDACs) einen Rezeptorkomplex zusammen, um die Transkription von Wnt-Zielgenen zu unterbinden. Residuelles β -Catenin wird durch RanBP3 und APC aus dem Nukleus exportiert – oder durch CBY und ICAT gebunden, sodass eine Assoziation mit dem LEF(lymphoid enhancing factor)/TCF-Komplex unterbleibt (Macdonald *et al.*, 2007). Der Signalweg wird bzw. bleibt dadurch inaktiviert.

In Anwesenheit eines Wnt-Signals wird durch die Bindung spezifischer Wnt-Moleküle (u.a. WNT1, WNT10B oder WNT3A) an Transmembranrezeptoren der Fz-Familie eine Signalkaskade in Gang gesetzt (siehe Abbildung 1.4, B). Die Kooperation der Fz-Proteine mit den Ko-Rezeptoren LRP5/6 resultiert in der Aktivierung von intrazellulären, heterotrimeren G-Proteinen im Inneren der Zelle und der Übertragung des Signals auf Dishevelled (DVL). DVL ist sowohl in den Wnt-Signalweg als auch in andere Wnt/Fz-abhängige Signalwege involviert und verfügt über zahlreiche potentielle Bindungspartner (Wallingford und Habas, 2005). DVL und AXIN sind mittels ihrer homologen DIX-Domänen in der Lage, schwache aber dynamische Proteininteraktionen einzugehen (Schwarz-Romond *et al.*, 2007a). Die Aktivierung von DVL führt wiederum zu einer phosphorylierungsabhängigen Rekrutierung von AXIN an LRP5 (oder LRP6) (Tamai *et al.*, 2004; Nusse, 2005; Schwarz-Romond *et al.*, 2007b). Die Abspaltung des Gerüstproteins AXIN resultiert in einer Destabilisierung des Degradationskomplexes, wodurch letztlich der Ubiquitin-vermittelte Abbau von β -Catenin verhindert wird. Es kommt zur Stabilisierung und Akkumulation von β -Catenin im Zytoplasma. Von dort wird es in den Zellkern transloziert, wo es die Transkriptions-Repressoren GROUCHO und/oder CREB, die eine Histondeacetylierung sowie eine kompakte Chromatinstruktur fördern, von Transkriptionsfaktoren der LEF/TCF-Familie verdrängt. Im Komplex mit TCF induziert es dann, nach Rekrutierung weiterer Co-Aktivatoren, die Transkription und Expression spezifischer Wnt/ β -Catenin-Zielgene (Logan und Nusse, 2004; Angers und Moon, 2009; Chien *et al.*, 2009). β -Catenin nimmt demnach eine Rolle als Transkriptions-Ko-Aktivator ein.

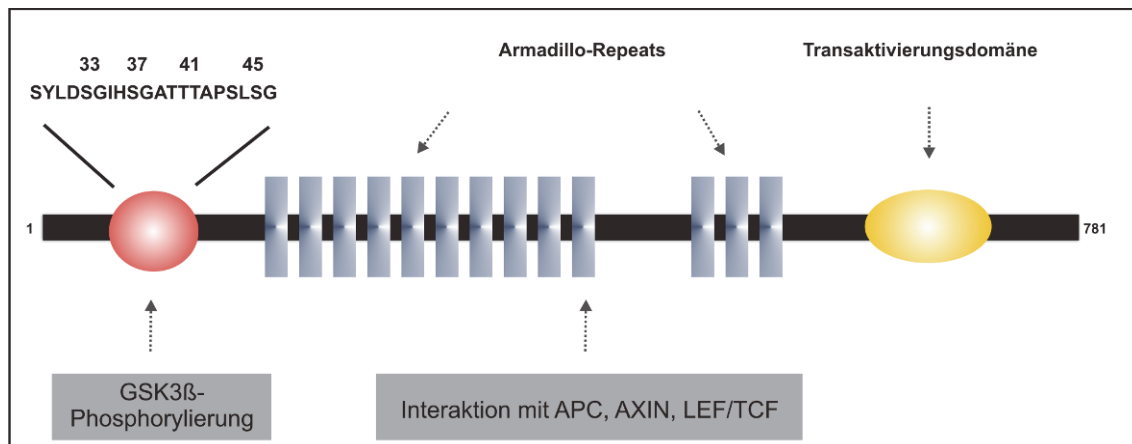


Abbildung 1.5: Proteininteragierende Domänen von β -Catenin.

Die Phosphorylierungsdomäne im N-terminalen Bereich von β -Catenin (781 Aminosäuren; 92 kDa) wird seriell durch CK1 α (Casein-Kinase 1 α) und GSK3 β (Glykogen Synthase Kinase 3 β) an den Aminosäure-Positionen 33 (Serin), 37 (Serin), 41 (Threonin) und 45 (Serin) phosphoryliert. Sie wird durch Exon 3 des β -Catenin-Gens *CTNNB1* codiert, welches häufig von Mutationen betroffen ist. Diese Mutationen verhindern eine Phosphorylierung durch GSK3 β und damit schließlich die Degradation von β -Catenin (siehe Abschnitt 1.3). Abbildung verändert nach Debuire *et al.*, 2002 und Xu und Kimelman, 2007.

1.2.2 Zielgene

Der Effekt einer Aktivierung über den klassischen Signalweg ist eine gesteigerte intrazelluläre Konzentration des Schlüsselproteins β -Catenin, das nach Translokation in den Zellkern die Transkription spezifischer Zielgene, darunter zahlreiche Onkogene, aktiviert. An der Regulation von Zielgenen, die Prozesse wie Zellproliferation, Differenzierung oder Apoptose steuern, sind neben direkten Mechanismen auch indirekte Mechanismen beteiligt (Ziegler *et al.*, 2005; Turashvili *et al.*, 2006).

Es sind heute mehr als 80 Gene beschrieben, deren Expression über den Wnt-Signalweg reguliert wird (Jones und Jomary, 2002; Willert *et al.*, 2002; Schwartz *et al.*, 2003; Macdonald *et al.*, 2007; siehe auch die Wnt-Homepage <http://www.stanford.edu/~rnusse/pathways/targets.html>). Zahlreiche Zielgene weisen entweder einen LEF/TCF-responsiven Promotor auf oder verfügen über funktionell verwandte Sequenzmotive. Neben diversen zelltypspezifischen Genen handelt es sich vor allem um Gene, die global in zahlreichen Zelltypen exprimiert werden und teilweise sogar Komponenten des Wnt-Signalweges selbst sind (Logan und Nusse, 2004; Vlad *et al.*, 2008). *FZ*, *LRP6*, *Conductin*, *LEF/TCF*, *NAKED* (*DVL*-Antagonist), *DKK1* und *Rspo* werden beispielsweise über ein direktes *feed-back* von TCF/ β -Catenin reguliert (Kazanskaya *et al.*, 2004; Logan und Nusse, 2004; Chamorro *et al.*, 2005; Khan *et al.*, 2007). Die Wnt-Komponente *Conductin* übernimmt hierbei die Funktion eines negativen *feed-back*-Regulators, indem sie nach β -Catenin-induzierter Expression die Wnt-Signalwirkung eindämmt (Lustig *et al.*, 2002). Auch bei dem extrazellulären Wnt-Inhibitor *DKK1* handelt es sich um einen Negativregulator des

Signalweges (Bafico *et al.*, 2001; Niida *et al.*, 2004; Gonzalez-Sancho *et al.*, 2005). Im Gegensatz dazu stellt die Wnt-Induktion von RSPO und TCF/LEF einen positiven *feed-forward*-Mechanismus dar, der die Signalwirkung verstärkt. Die zahlreichen selbstregulatorischen Mechanismen kommen vor allem in zelltypspezifischer Weise zum Einsatz. Dieses erhöht die Komplexität, erlaubt aber eine besondere Feinregulation der Kontrolle der Amplitude sowie der Dauer der Wnt-Antwort. *Conductin* und *Drosophila Naked*-Gene stellen dabei „universelle“ Wnt/wg-induzierte Zielgene dar (Logan und Nusse, 2004).

Zu den prominentesten Zielgenen des Wnt-Signalweges gehören die Proto-Onkogene *c-MYC* und *CYCLIN D1 (CCND1)*. Bei dem Zielgen *CCND1* handelt es sich um ein multifunktionales G1-Phase Cyclin, dessen Überexpression zu einer Phosphorylierung des RB-Proteins führt und in unkontrolliertem Zellwachstum sowie schließlich in der Entwicklung von Krebs resultieren kann (Shtutman *et al.*, 1999; Tetsu und McCormick, 1999; Radu *et al.*, 2003). Die humane *MYC*-Familie der Proto-Onkogene (*c-MYC*, *MYC* und *I-MYC*) gehört zu den am umfassendsten studierten Genen bei Krebserkrankungen (Meyer und Penn, 2008). Das *c-MYC*-Onkogen reguliert als Transkriptionsfaktor die Transkription weiterer spezifischer Zielgene (Takahashi und Yamanaka, 2006). Über die Tcf-4-Bindestelle im Promotor wird die *c-MYC*-Expression durch Wildtyp-APC reprimiert und durch β -Catenin aktiviert. Weitere Studien konnten zeigen, dass CyclinD/CDK4/6-Komplexe mögliche *downstream*-Mediatoren einer *c-MYC*-abhängigen Proliferation sind (Bouchard *et al.*, 1999; Eilers, 1999). In diesem Zusammenhang konnte u.a. auch *CCND1* als transkriptionelles Zielgen von *c-MYC* identifiziert werden (Haas *et al.*, 1997).

1.2.3 Antagonisten und Agonisten

Die Aktivität des Wnt/ β -Catenin-Signalweges, und somit die Expression Wnt-spezifischer Zielgene, wird durch unterschiedliche Familien löslicher Proteine reguliert. Zahlreiche Antagonisten wurden bereits identifiziert und gehören grundsätzlich zwei funktionellen Klassen an. Antagonisten der ersten Klasse binden direkt an die Wnt-Proteine und verändern so deren Fähigkeit, an den Wnt-Fz-Rezeptorkomplex zu binden. Antagonisten der zweiten Klasse hingegen inhibieren die Wnt-Signalkaskade durch ihre Bindung an die LRP5/6-Komponente (Kawano und Kypta, 2003) (siehe Abbildung 1.7, A).

Proteine der sFRP-Familie (secreted Frizzled-related proteins), die extrazelluläre Matrix-Komponente WIF1 sowie das Protein Cerberus können der ersten Klasse zugeordnet werden. Durch die direkte Bindung an die Wnt-Proteine verhindern sie deren Bindung an die Fz-Rezeptoren und inhibieren so die Signalübertragung (Bovolenta *et al.*, 2008). Die sFRP-Familie umfasst in Vertebraten fünf Mitglieder, SFRP1–SFRP5, von denen SFRP1, SFRP2 und SFRP5 nah verwandt zu sein scheinen. Es handelt sich um modulare Proteine, die zwei unabhängige Domänen

aufweisen. Der C-Terminus ist durch Segmente positiv geladener Reste sowie durch sechs Cysteinreste charakterisiert – diese Elemente definieren das NTR-Modul (Uren *et al.*, 2000). Der N-Terminus hingegen enthält ein lösliches Signalpeptid, das von einer Wnt-bindenden CRD-Domäne der Fz-Rezeptoren gefolgt wird, die den Proteinen die Konkurrenz mit diesen Rezeptoren ermöglicht (siehe Abbildung 1.6). Fz-CRDs bestehen aus zehn Cysteinen an konservierten Positionen, die über Disulfidbrücken eine hochkonservierte 3D-Struktur formen (Chong *et al.*, 2002). Sie binden Wnt-Moleküle und können Homo- oder Heterodimere bilden (Dann *et al.*, 2001). *Loss-of-function*-Untersuchungen weisen auf eine Redundanz der sFRP-Gene hin (Satoh *et al.*, 2008). Die Wnt-bindenden Eigenschaften lassen vermuten, dass sFRPs und WIF die Wnt-Stabilisierung und -Diffusion auch jenseits ihrer extrazellulären Funktion als Wnt-Inhibitoren ausüben können. So konnte für einige sFRPs eine Wnt-unabhängige Aktivität als Regulatoren extrazellulärer Proteinasen nachgewiesen werden (Bovolenta *et al.*, 2008).



Abbildung 1.6: Wnt-Antagonist der sFRP-Familie mit verwandter Frizzled-CRD-Domäne.

Erläuterungen siehe Text. CD, Cytoplasmic domain; CRD, Cysteine-rich domain; Fz, Frizzled; NTR, Netrin-like domain. Abbildung angelehnt an Kawano und Kypta, 2003.

In Ergänzung zu den sFRPs sind weitere endogene Inhibitoren mit Frizzled-Motiven bekannt. So handelt es sich bei V3Nter um ein aminoterminales Glykoprotein, welches sich an der Zelloberfläche in Krebszellen befindet und dessen CRD-Domäne mit den 3D-Strukturen der Fz-8 und SFRP3-CRDs übereinstimmt (Quelard *et al.*, 2008). Durch seine Bindung an Wnt3a wird die Expression der Zielgene *c-MYC* und *CCND1* und damit die Aktivität des Signalweges inhibiert. Zudem kann V3Nter das Tumorwachstum von β -Catenin-aktivierten Tumorzellen *in vivo* unterdrücken (Lavergne *et al.*, 2011).

Als Inhibitoren der Liganden-Rezeptor-Bindung hingegen sind Proteine der Dickkopf (DKK)-Familie (Glinka *et al.*, 1998), WISE (Itasaki *et al.*, 2003) sowie SOST (Semenov *et al.*, 2005) bekannt. Inhibitoren dieser Klasse binden an LRP5/6 und verhindern damit die Bildung des Wnt-Fz-LRP5/6-Rezeptor-Komplexes. Die DKK-Familie codiert für lösliche Proteine von 255–350 Aminosäuren und besteht bei Vertebraten aus vier Mitgliedern, DKK1–DKK4 (Niehrs, 2006). Während es sich bei DKK1 um das am besten untersuchte Mitglied der Familie handelt, das, ebenso wie DKK4, den Signalweg ausschließlich inhibieren kann, können DKK2 und DKK3 den Signalweg abhängig vom zellulären Kontext entweder aktivieren oder inhibieren (Niehrs, 2006; Yue *et al.*, 2008). Bei DKK1 scheint es sich zudem um einen spezifischen Inhibitor der

Wnt-Signalkaskade zu handeln. Obwohl zwei verschiedene Modelle bezüglich der Aktivität von DKK1 angenommen werden, weisen biochemische und genetische Studien daraufhin, dass DKK1 den Wnt-Signalweg nicht über eine LRP6-Internalisierung bzw. -Degradierung mittels transmembraner Kremen(KRM)-Proteine inhibiert (Mao *et al.*, 2002), sondern über eine Spaltung des Fz-LRP6-Komplexes (Semenov *et al.*, 2001). Wie DKK1 ist auch SOST *in vitro* in der Lage, den Wnt-induzierten Fz-LRP6-Komplex zu spalten (Semenov *et al.*, 2005).

Die Shisa-Proteine stellen eine eigene Familie von Wnt-Antagonisten dar. Zellautonom fangen sie Fz-Rezeptoren im Endoplasmatischen Reticulum (ER) ab und verhindern so deren Erreichen der Zelloberfläche (Yamamoto *et al.*, 2005).

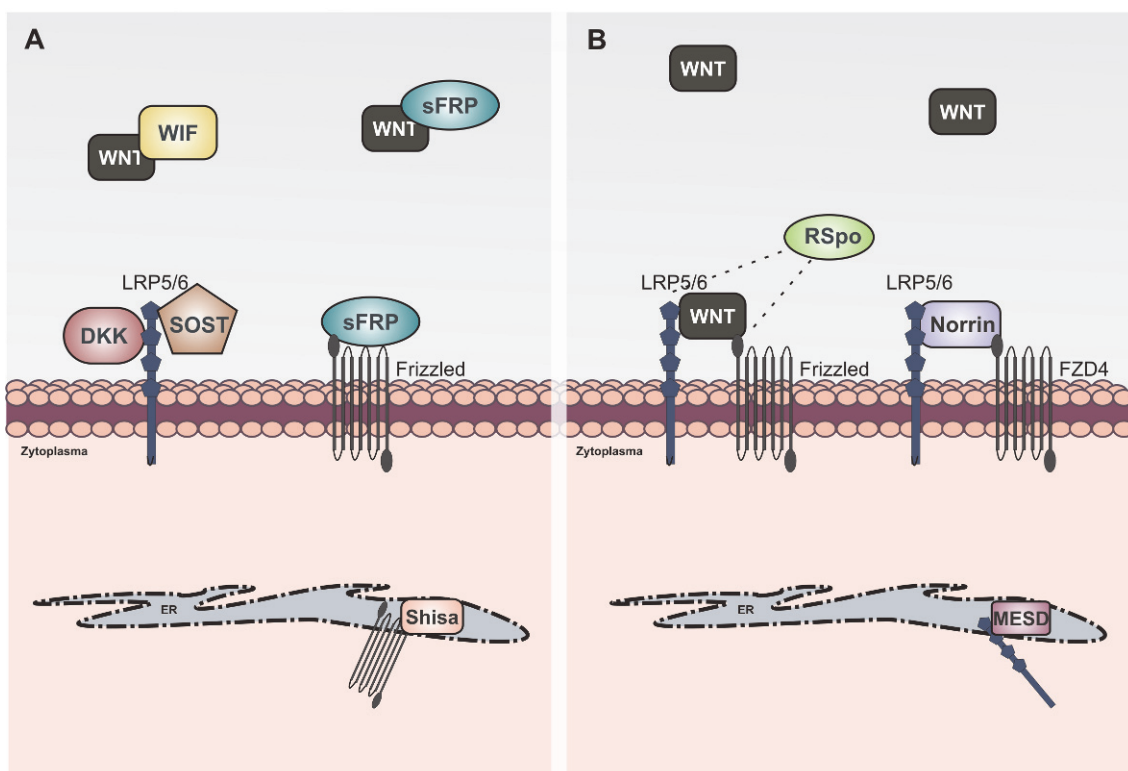


Abbildung 1.7: Sezernierte Wnt-Antagonisten und -Agonisten.

(A) Wnt-Antagonisten: DKK1 und SOST/WISE binden an den LRP5/6-Rezeptorkomplex und verhindern so eine Fz-LRP6-Komplexbildung. WIF1 und sFRPs binden direkt an sezernierte Wnt-Moleküle und/oder Fz-Rezeptoren. Im Endoplasmatischen Reticulum (ER) fängt das Protein Shisa Fz-Rezeptoren ab. (B) Wnt-Agonisten: Wnt-Moleküle sind die primären Agonisten und bilden einen Komplex mit LRP5/6, um die Signalkaskade zu aktivieren. Norrin bindet spezifisch an FZD4. RSpO bindet an LRP5/6 und/oder Fz-Rezeptoren. Im ER wird das Chaperon MESD für die LRP5/6-Reifung benötigt. Abbildung angelehnt an MacDonald *et al.*, 2009.

Wnt-Agonisten (siehe Abbildung 1.7, B) umfassen mit Norrin und R-Spondin (RSpO) zwei Hauptfamilien. Norrin ist als spezifischer Ligand für FZD4 und LRP5/6 während der retinalen Vaskularisierung bekannt (Xu *et al.*, 2004). RSpO-Proteine wirken mit Wnt-Molekülen, Fz-Rezeptoren und LRP6 zusammen – der Hauptbindepartner wird jedoch noch kontrovers diskutiert (Kazanskaya *et al.*, 2004; Nam *et al.*, 2006; Wei *et*

al., 2006). Ein weiteres Modell besagt, dass RSpO ein Ligand für KRM ist und der DKK/KRM-vermittelten Internalisierung von LRP6 (s.o.) entgegenwirkt (Binnerts *et al.*, 2007). RSpO-Gene sind in ihrer Expression häufig abhängig von der Wnt-Expression und werden, einem positiven *feed-back*-Mechanismus entsprechend, mit den Wnt-Genen ko-exprimiert (Kazanskaya *et al.*, 2004).

1.3 Der Wnt-Signalweg in der Tumorgenese

Der Wnt-Signalweg nimmt eine essentielle Rolle in Prozessen der Entwicklung und der Homöostase ein und besteht aus zahlreichen Onkogenen (u.a. WNT1, β -Catenin, FRAT/GBP, Lgs/Bcl9) und Tumorsuppressoren (u.a. APC, AXIN, TCF1, WNT5a, sFRPs), die induziert bzw. negativ reguliert werden können. Mutationen in Komponenten des Wnt/ β -Catenin-Signalweges können aufgrund der Vielzahl der unterschiedlichen Regulatoren demnach sowohl Liganden als auch Antagonisten und Agonisten betreffen und in einer Fehlregulation des Signalweges resultieren. Eine solche konnte neben unterschiedlichen Erkrankungen auch für zahlreiche Tumoren beobachtet werden und wird in der Literatur umfassend beschrieben (Polakis, 2007; Robinson *et al.*, 2008; Takigawa und Brown, 2008). Studien belegen, dass eine anhaltende Wnt-Stimulation sowohl für die Initiation, als auch für die Aufrechterhaltung und die Progression der Tumoren notwendig ist (Gunther *et al.*, 2003). Dies ist insbesondere für kolorektale Karzinome der Fall. Bis zu 90% der sporadischen Kolonkarzinome besitzen den Wnt-Signalweg betreffende, aktivierende Mutationen; der überwiegende Teil von ihnen zerstört die Funktion des Tumorsuppressors *APC* (Miyaki *et al.*, 1994) (siehe Kapitel 1.3.2). Auch die Pathogenese von Brustkrebs ist mit einer gesteigerten Wnt-Aktivität assoziiert. Mittels Immunhistochemie konnten in mehr als 50% der Tumoren erhöhte nukleäre und/oder zytoplasmatische β -Catenin-Level nachgewiesen werden. Diese korrelierten mit der Expression des Wnt-Zielgenes *CCND1* und einer schlechten Prognose des Patienten (Ryo *et al.*, 2001). Da eine nukleäre Expression von β -Catenin in normalem Brustgewebe nicht nachgewiesen werden konnte, stellt die Detektion dieses Proteins im Zellkern ein Kennzeichen eines aktivierten Wnt/ β -Catenin-Signalweges dar.

Als ursächlich für eine aberrante Wnt-Aktivierung in Tumoren sind Veränderungen identifiziert worden, die überwiegend über eine Hemmung der β -Catenin-Degradation in den Wnt-Signalweg eingreifen. Besondere Bedeutung kommt dabei heterozygoten, dominant wirkenden Mutationen im β -Catenin-Gen selbst zu, die eine häufige Ursache für eine Aktivierung des Signalweges in Tumoren wie dem sporadisch auftretenden, embryonalen Hepatoblastom oder dem hepatozellulären Karzinom darstellen (Koch *et al.*, 1999; Buendia, 2000). Sie konnten ebenfalls für Kolonkarzinome gezeigt werden, sind hier jedoch deutlich seltener als Mutationen im *APC*-Gen (Morin *et al.*, 1997; Polakis *et al.*, 1999). Betroffen ist in der Regel die Phosphorylierungsdomäne im N-terminalen Bereich von β -Catenin, die durch Exon 3 codiert wird (siehe Abbildung

1.5). Durch diese dominant wirkenden, trunkierenden Mutationen wird eine effektive Phosphorylierung durch Komponenten des Degradationskomplexes und damit der gezielte Abbau von β -Catenin verhindert (Rubinfeld *et al.*, 1996; Polakis *et al.*, 1999). Dies resultiert schließlich in einer LEF/TCF-vermittelten Zielgen-Transkription.

In Tumoren ohne β -Catenin-Mutationen finden sich hingegen häufig Veränderungen in Komponenten des Degradationskomplexes selbst. Beispiele hierfür sind Mutationen in den für Gerüstproteine codierenden Genen *AXIN1* und *AXIN2*. Ihre Mutationen sind ebenfalls als Ursache für eine konstitutive Wnt-Aktivierung in sporadischen Hepatoblastomen sowie dem hepatozellulären Karzinom beobachtet worden (Satoh *et al.*, 2000; Koch *et al.*, 2004). Im Gegensatz zu Darm- und Schilddrüsentumoren, in denen Mutationen von *SFRP1* bzw. aktivierende *LRP5*-Mutationen detektiert werden konnten (Caldwell *et al.*, 2004; Bjorklund *et al.*, 2007), werden in sporadischen Hepatoblastomen und dem hepatozellulären Karzinom Mutationen extrazellulärer Wnt-Antagonisten oder zytoplasmatischer Regulatoren seltener als ursächlich beschrieben (Mizutani *et al.*, 2005; Shih *et al.*, 2006).

Ein weiteres Beispiel stellt *WTX* (Wilms' tumor gene on the X chromosome) dar, ebenfalls Komponente des β -Catenin-Degradationskomplexes. Als Tumorsuppressor und Negativregulator (und damit Zielgen) des Wnt-Signalweges fördert es die Ubiquitinierung und Degradation von β -Catenin. Mutationen in *WTX* wurden im Jahr 2007 erstmals beschrieben und treten insbesondere in einer weiteren malignen Tumorentität des Kindesalters, dem Wilms-Tumor, auf (Rivera *et al.*, 2007; Major, 2007; Wegert *et al.*, 2009).

1.3.1 Epigenetische Regulation des Wnt-Signalweges

Der Entstehung bzw. Progression zahlreicher Tumoren liegt neben unterschiedlichen genetischen Veränderungen (u.a. Deletionen oder Punktmutationen) häufig auch eine aberrante epigenetische Regulation zugrunde. Bei epigenetischen Mechanismen wie der Histonmodifikation, der Veränderung der Chromatin-Struktur („Chromatin-Remodeling“) sowie der DNA-(De)methylierung handelt es sich um unabhängige Mechanismen, die die Transkription von Genen jeweils ohne eine Veränderung der DNA-Sequenz beeinflussen können (Portela und Esteller, 2010). DNA-Methylierung und Histonmodifikation nehmen dabei in der Pathogenese der Tumoren einen besonderen Stellenwert ein (Jones und Baylin, 2002). Hypermethylierte Promotorregionen von Tumorsuppressoren führen in der Regel zu einer Inhibition des betroffenen Gens (Esteller, 2008; Muntean und Hess, 2009) (siehe Abbildung 1.8).

Der Mechanismus der epigenetischen Inaktivierung kann auch für Wnt-Inhibitoren beobachtet werden (Ying und Tao, 2009). So korreliert in zahlreichen Tumoren, basierend auf einer abnormalen Promotormethylierung, vor allem die verringerte Expression extrazellulärer Wnt-Antagonisten wie *SFRP1*, *SFRP2*, *SFRP4* und *SFRP5*

sowie *WIF1*, *DKK1*, *DKK2* und *DKK3* mit einer konstitutiven Aktivität des Wnt/ β -Catenin-Signalweges (Mazieres *et al.*, 2004; Suzuki *et al.*, 2004; Taniguchi *et al.*, 2005; Chan *et al.*, 2007; Sato *et al.*, 2007). Dies kann ebenfalls für embryonale Tumoren wie das Medulloblastom gezeigt werden (Vibhakar *et al.*, 2007).

Auch intrazelluläre Wnt-Regulatoren können einer epigenetischen Kontrolle unterliegen. So stellt die epigenetische Stilllegung von *APC* und *AXIN2* in der Entwicklung von Kolonkarzinomen einen alternativen Mechanismus zum Funktionsverlust dieser Gene durch genetische Veränderungen dar (Esteller *et al.*, 2000; Koinuma *et al.*, 2006). Eine *APC*-Promotormethylierung kann u.a. auch in 35 – 50% der Brustkrebstumoren sowie in verschiedenen Zelllinien nachgewiesen werden, wobei die Expression von *APC* mit dem Methylierungsstatus korreliert (Jin *et al.*, 2001; Sarrío *et al.*, 2003; Dulaimi *et al.*, 2004).

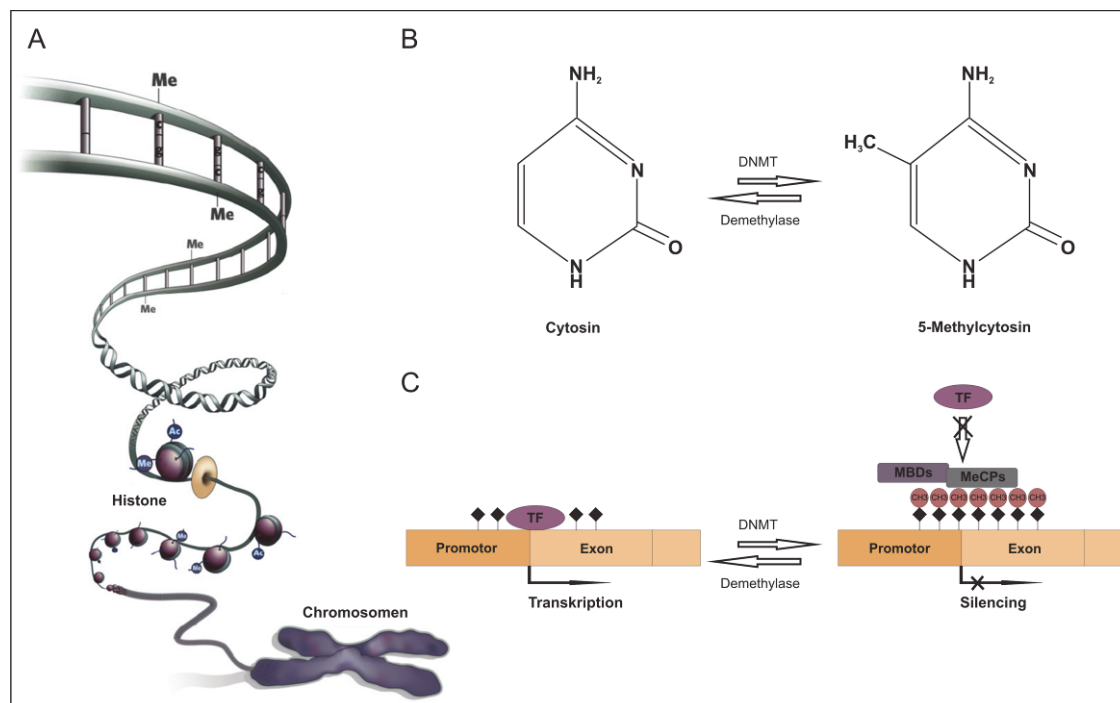


Abbildung 1.8: Epigenetische Mechanismen.

(A) Epigenetische Veränderungen umfassen DNA-Methylierung (Me), Chromatin-Remodeling und Histonmodifikationen (u.a. kovalente Histon-Acetylierung (Ac)). Abbildung verändert nach Yoo und Jones, 2006. (B) Im Rahmen von Methylierungsereignissen katalysieren DNA-Methyltransferasen (DNMTs) die Übertragung einer Methylgruppe an Cytosin – hierbei entsteht 5-Methylcytosin. Die Reaktion lässt sich durch Demethylasen umkehren bzw. durch DNMT-Inhibitoren unterbinden. (C) Hypo- bzw. unmethylierte Promotorregionen oder Exons ermöglichen eine Bindung von Transkriptionsfaktoren (TF) an spezifische Bindestellen und resultieren in der Transkription des Gens. Hypermethylierte Promotor- bzw. Exonbereiche hingegen ermöglichen die Bindung Methylcytosin-bindender Proteine (MBDs) wie MeCP, die als Repressorkomplexe die Bindung von TF verhindern, eine Transkription unterbinden und so zu einer Stilllegung des Gens („Silencing“) führen. Abbildung angelehnt an Chen *et al.*, 2011.

Im Gegensatz zu *APC* und *AXIN* ist die epigenetische Repression von *DACT3*, einem weiteren Negativregulator des Wnt-Signalweges, in Kolonkarzinomen mit einer „bivalenten“ Histonmodifikation assoziiert und umfasst anstelle von

Promotormethylierungen sowohl reprimierende (H3K27me3) als auch aktivierende (H3K4me3) Histon-Markierungen (Jiang *et al.*, 2008a; Ku *et al.*, 2008). Dies lässt die Komplexität der Beteiligung epigenetischer Ereignisse an einer deregulierten Wnt-Signalkaskade vermuten.

1.3.2 Der Tumorsuppressor APC

APC wird sowohl genetisch als auch epigenetisch komplex reguliert und nimmt vor allem in der Pathogenese kolorektaler Karzinome einen besonderen Stellenwert ein. Als weiteres Mitglied des β -Catenin-Degradationskomplexes handelt es sich bei APC um ein 2843 Aminosäuren (AS) langes, zytoplasmatisches Multidomänenprotein, das von 16 Exons des APC-Gens auf Chromosom 5 (q21-q22) codiert wird. Die voneinander unabhängigen Domänen des APC-Proteins machen seine Funktion als Gerüstprotein des Degradationskomplexes aus und bestehen neben drei 15-AS-Wiederholungen (Repeats) und sieben 20-AS-Wiederholungen, die eine Bindung an β -Catenin ermöglichen, aus drei SAMP-Motiven (SAMP, Serin-Alanin-Methionin-Prolin), die für die Bindung an Axin verantwortlich sind (Spink *et al.*, 2000) (siehe Abbildung 1.9).

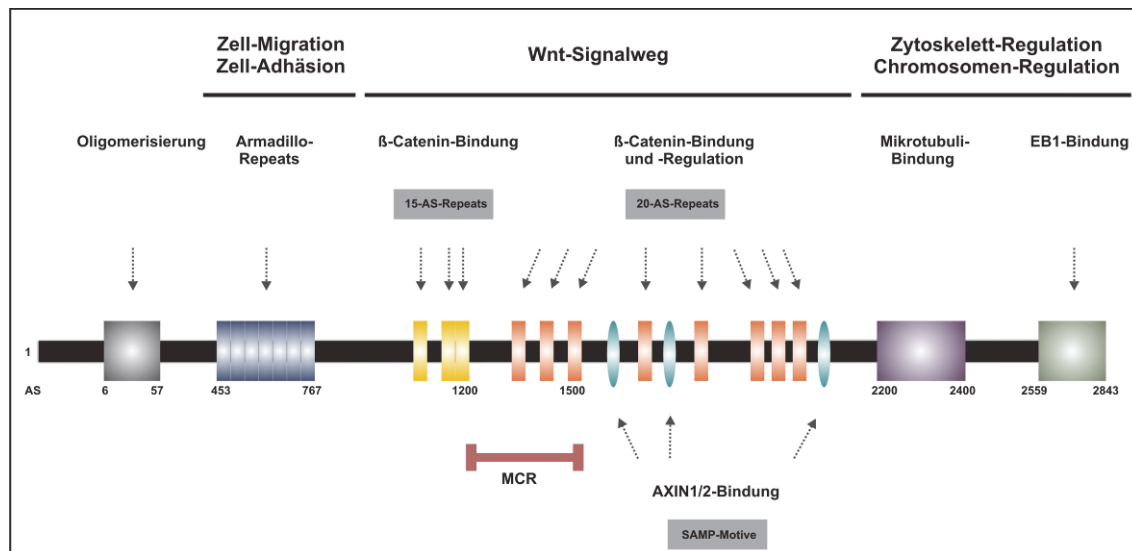


Abbildung 1.9: Funktionelle Domänen des APC-Proteins.

Die sieben Armadillo-Repeats dienen der β -Catenin-Bindung und bestehen aus jeweils 42 Aminosäuren (AS). Die drei 15-AS-Repeats sowie die sieben 20-AS-Repeats binden und regulieren β -Catenin unabhängig voneinander. Die Basis-Domäne dient ebenso wie das carboxyterminal lokalisierte EB1-Protein der Mikrotubuli-Bindung. Die AXIN1/2-Bindung findet an drei unabhängigen SAMP (Serin-Alanin-Methionin-Prolin)-Motiven statt. MCR, Mutation Cluster Region (Erläuterungen siehe Text). Abbildung angelehnt an Polakis, 1999 und Segditsas und Tomlinson, 2006.

Neben seiner Funktion als Tumorsuppressor des Wnt-Signalweges ist APC in weitere zelluläre Prozesse wie die Organisation des Zytoskeletts, die Zelladhäsion sowie die Chromosomensegregation involviert (Fodde, 2002). Die zentrale Bedeutung des APC-

Proteins wird heute jedoch häufig am Modell des familiären bzw. des sporadischen Kolonkarzinoms verdeutlicht. Beim familiären Kolonkarzinom (FAP, familiäre adenomatöse Polyposis) handelt es sich um eine autosomal dominante Erkrankung, die sich zu Beginn durch die Entwicklung zahlreicher gutartiger Dickdarmpolypen (Adenome) auszeichnet. Im Rahmen verschiedener Progressionsereignisse kann es jedoch zu einer malignen Transformation dieser Polypen kommen, sodass die betroffenen Patienten letztlich an einem Kolonkarzinom erkranken (Pino und Chung, 2010). Im Jahr 1991 wurde APC durch Positions-Klonierung des FAP-Locus auf Chromosom 5q identifiziert (Groden *et al.*, 1991; Kinzler *et al.*, 1991). Wenig später konnte eine direkte Verbindung des Tumorsuppressors mit der Karzinogenese von Kolonkarzinomen hergestellt werden: APC-Mutationen wurden als ursächlich verantwortlich für die Entstehung von autosomal dominant vererbten Kolonkarzinomen oder FAP identifiziert (Spirio *et al.*, 1992; Kinzler und Vogelstein, 1996). Darüber hinaus wurden sie ebenfalls in einem Großteil der sporadischen Kolonkarzinome nachgewiesen (Powell *et al.*, 1992; Nagase und Nakamura, 1993). Der durch die Mutationen verursachte Funktionsverlust von APC wird als initiiertes Schlüsselereignis für die Entstehung und die Progression dieser Tumoren betrachtet (Fearon und Vogelstein, 1990).

Die der Aktivierung des Signalweges zugrundeliegenden APC-Veränderungen bestehen in der überwiegenden Anzahl der kolorektalen Tumoren (60–85%) aus trunkierenden Mutationen, die zu Leserasterverschiebungen und/oder vorzeitigen Stop-Signalen im Gentranskript führen. Derart verursachte Störungen in der Bindung und somit der Regulation von β -Catenin sind für die Tumorgenese der Kolonkarzinome von besonderer Bedeutung (Morin *et al.*, 1997) und umfassen ebenfalls die seltener beschriebenen *Missense*-Mutationen (Huang *et al.*, 2000). In sporadischen Kolonkarzinomen konzentrieren sich 2/3 aller APC-Mutationen auf eine für diese Funktionen verantwortliche *Mutation Cluster Region* (MCR), die zwischen den Aminosäuren 1250 und 1500 des Proteins lokalisiert ist (Miyoshi *et al.*, 1992; Polakis, 2000) (siehe Abbildung 1.9).

Mutationen von APC sowie dem Tumorsuppressor *p53* sind in Kolonkarzinomen mit genomischer Instabilität assoziiert. Während chromosomale Instabilität (CIN, chromosomal instability) in diesen Tumoren zur Aneuploidie führt, lösen Fehler in DNA-Mismatch-Reparatursystemen Mikrostalliten-Instabilität (MSI, microsatellite-instability) aus. Diese wiederum resultiert in genomweiten SSR-Mutationen (SSR, simple sequence repeats), die zu Punktmutationen oder trunkierten Proteinen führen, wenn sie sich in codierenden Regionen oder *Splice-Junction*-Bereichen relevanter regulatorischer Gene befinden. Somit können sie die Progression von Krebserkrankungen fördern (Lengauer *et al.*, 1997; Duval und Hamelin, 2002). Für 13–17% der sporadischen Kolonkarzinome sowie in Patienten mit einem erblichen, nicht-polypösen Kolonkarzinom (Syn. Lynch-Syndrom) stellt dies ein Charakteristikum dar (Toft und Arends, 1998). Während in CIN-Kolonkarzinomen APC-Mutationen

vorherrschend sind (Segditsas und Tomlinson, 2006), sind diese in MSI-Karzinomen deutlich weniger häufig vertreten (Huang *et al.*, 1996; Thorstensen *et al.*, 2005). Neben Mutationen im Axin-Homolog AXIN2 (0,25%) konnten hier ebenfalls Frameshift-Mutationen im TCF-4-Gen (0,35%) nachgewiesen werden (Duval *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2000). Auch wenn das Spektrum der Gen-Mutationen in MSI-Karzinomen noch nicht umfassend charakterisiert worden ist, kann von zusätzlichen Mechanismen ausgegangen werden, die in diesen Tumoren zu einer Aktivierung des Wnt/ β -Catein-Signalweges führen.

1.3.3 Therapeutische Implikation

Mutationen der Wnt/ β -Catenin-Signalkaskade rufen die Entstehung von Tumoren und anderen Erkrankungen hervor (Klaus und Birchmeier, 2008). Dabei regulieren zahlreiche Komponenten die Signaltransduktion auf unterschiedlichen Ebenen – von der Zellmembran über das Zytoplasma in den Zellkern. Der Wnt-Signalweg stellt somit ein attraktives Ziel für eine therapeutische Intervention dar. Neben natürlichen Komponenten dienen vor allem Derivate nicht-steroidaler, anti-entzündlicher Wirkstoffe (NSAID, nonsteroidal anti-inflammatory drugs) als Kandidaten für eine Chemoprävention. NSAID sind beispielsweise in der Lage, Wnt-Zielgene wie *MTCO2* direkt zu inhibieren (Aspirin®, Sulindac®) oder die Degradation von TCF zu fördern (Celecoxib®) (Takahashi-Yanaga und Kahn, 2010). Epidemiologische Studien weisen zudem auf krebsvorbeugende Eigenschaften der NSAID hin. Während die Entstehung von kolorektalen Tumoren in Ratten verhindert werden konnte, ist Celecoxib® bereits seit 1999 beim Menschen für die Behandlung von Patienten mit FAP zugelassen (Smigel, 2000).

Am Beispiel des Zelladhäsionsmoleküls EpCAM (epithelial cell adhesion molecule) kann die Rolle von Wnt-Zielgenen als Zielstrukturen für therapeutische Wirkstoffe weiter verdeutlicht werden (Yamashita *et al.*, 2007). Dieses Molekül wird in einer Vielzahl humaner epithelialer Gewebe, Progenitor- und Stammzellen sowie in zahlreichen Karzinomen exprimiert (Baeuerle und Gires, 2007; Trzpis *et al.*, 2007). Erstmals 30 Jahre zuvor als dominantes Antigen in humanen Kolonkarzinomen beschrieben, handelt es sich bei EpCAM um ein glykosyliertes, 30–40 kDA Typ1-Membran-Protein (Herlyn *et al.*, 1979). Es besteht aus einer extrazellulären Domäne, EpEX, sowie einer 26 Aminosäuren langen intrazellulären Domäne, EpICD (siehe Abbildung 1.10). Diese kurze, intrazelluläre Domäne kann in das Zytoplasma der Zelle freigesetzt werden und mit β -Catenin sowie LEF einen großen, nukleären Komplex bilden, der die Transkription der Zielgene *c-MYC* und *CCND1* aktiviert (Yamashita *et al.*, 2007; Maetzel *et al.*, 2009). Während EpCAM in normalen Zellen in sehr schmalen Interzellularräumen lokalisiert ist, ist es in Tumorgeweben homogen auf der Oberfläche der Zellen verteilt. Diese gute Zugänglichkeit sowie seine Eigenschaft als Tumormarker machen EpCAM zu einer interessanten Zielstruktur für therapeutische

Ansätze (Munz *et al.*, 2009). Ein trifunktionaler EpCAM-Antikörper wird bereits in der Therapie eingesetzt (Sebastian *et al.*, 2009).

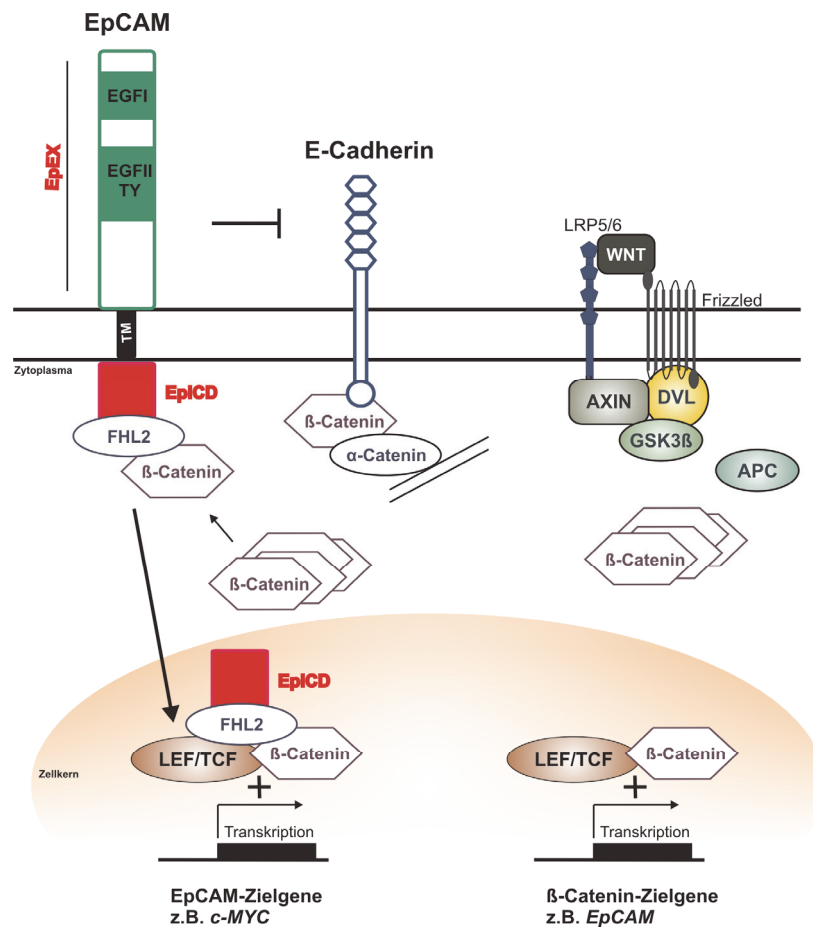


Abbildung 1.10: Mögliches Modell der EpCAM-Signaltransduktion.

Das Zelladhäsionsmolekül EpCAM besteht aus einer extrazellulären Domäne, EpEX, sowie einer intrazellulären Domäne, EpiCD. Nach nukleärer Translokation bildet EpiCD einen Komplex mit FHL2, LEF-1 und β-Catenin und induziert die Expression spezifischer Zielgene. Abbildung verändert nach Maetzel *et al.*, 2009.

Neben Zielgenen wie EpCAM sind auch sezernierte Wnt-Antagonisten (siehe Abschnitt 1.2.3) wichtige Zielstrukturen für Wirkstoffe geworden. So führt eine Verminderung der Wnt-Antagonisten *sfrp1* und *Dkk1* in Mäusen zu einer erhöhten Knochendichte. Beide Antagonisten kommen daher u.a. bei der Behandlung von Krankheiten, die mit einem Verlust der Knochenmasse einhergehen, in Betracht (Williams und Insogna, 2009). Antikörper gegen *Dkk1* werden bei der Behandlung von Osteoarthritis (Diarra *et al.*, 2007) sowie des Multiplen Myeloms (Yaccoby *et al.*, 2007) im Mausmodell eingesetzt. Auch humane Antikörper gegen *SOST* und *sFRP1* wurden bereits getestet und zeigen vielversprechende Ergebnisse in Bezug auf eine Zunahme der Knochendichte (Bodine *et al.*, 2009).

Zu den natürlichen Komponenten zählen u.a. die Vitamine A und D sowie deren Derivative. Studien konnten zeigen, dass nukleäre Vitaminrezeptoren mit β-Catenin interagieren, in Konkurrenz zur β-Catenin/TCF-Interaktion treten und so E-Cadherin,

ein β -Catenin-bindendes Glykoprotein, veranlassen, β -Catenin an der Zellmembran zu relokalisieren (Palmer *et al.*, 2001). Beide Vitamine sind ebenfalls in der Lage, die Expression der Wnt-Inhibitoren Dkk1/4 sowie Dab2 zu induzieren (Jiang *et al.*, 2008b; Pendas-Franco *et al.*, 2008).

Durch Hochdurchsatz-Screenings sowie nukleäre Magnetresonanzspektroskopie konnten in den letzten zehn Jahren zahlreiche neue Verbindungen identifiziert werden, die dem Wnt-Signalweg entgegenwirken. Vor allem synthetische Verbindungen wie PNU74654 und 2,4-Diamino-Quinazolin unterbinden die Interaktion zwischen β -Catenin und TCF4 im Zellkern (Lepourcelet *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2009).

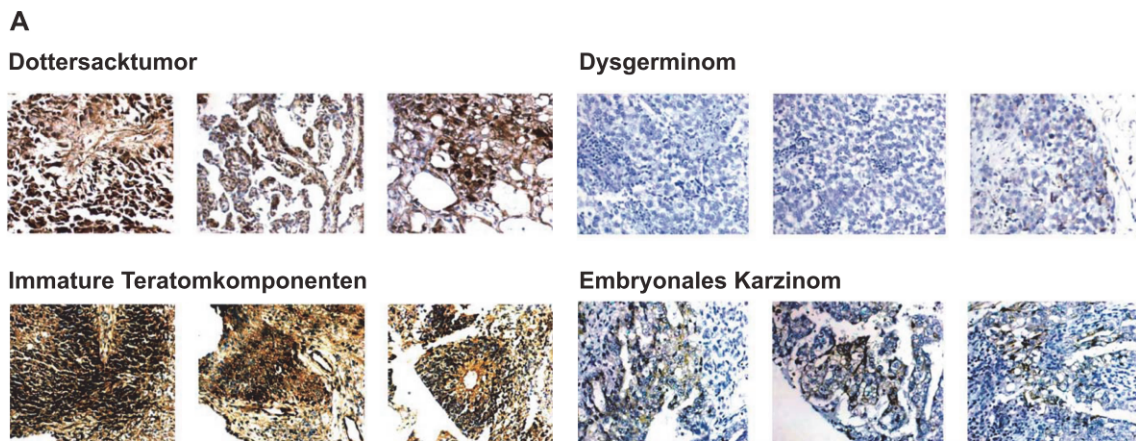
1.4 Keimzelltumoren und der Wnt-Signalweg

Eine aberrante, konstitutive Aktivierung des Signalweges konnte für zahlreiche Tumorentitäten, darunter auch embryonale Tumoren wie Hepatoblastome, Medulloblastome und Nephroblastome beschrieben werden. Sie geht mit einer nukleären Lokalisation von β -Catenin sowie einer gesteigerten Expression des β -Catenin-Gens *CTNNB1* einher (Reya *et al.*, 2001; Taipale und Beachy, 2001).

In malignen testikulären Nichtseminomen von Erwachsenen wurde im Rahmen einer Methylierungsanalyse von Promotorregionen verschiedener Tumorsuppressorgene im Vergleich zu Seminomen bei 29% der Tumoren eine Hypermethylierung des *APC*-Promotors beobachtet (Honorio *et al.*, 2003). Da eine Promotorhypermethylierung als häufige Ursache für eine transkriptionelle Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen gilt (siehe Abschnitt 1.3.1), ließ die aberrante Inaktivierung der *APC*-Expression eine konstitutive Aktivierung des Wnt-Signalweges über die Hemmung der β -Catenin-Degradation in diesen Tumoren vermuten. In einer umfassenden immunhistochemischen Untersuchung zur Beteiligung von β -Catenin an der Pathogenese von adulten Keimzelltumoren ergaben sich schließlich weitere Hinweise auf eine Beteiligung des Wnt-Signalweges auch in dieser Tumorentität. Während β -Catenin in nahezu sämtlichen nicht-seminomatösen Zellen exprimiert wurde (92–100%), war das Protein weder in Seminomen noch in Dysgerminomen nachzuweisen (Honecker *et al.*, 2004a).

Weiterführende Analysen an pädiatrischen Keimzelltumoren bestätigten diese Resultate. Hierarchische Clusteranalysen, die auf Ergebnissen von cDNA-Microarrays basierten und ausschließlich Wnt/ β -Catenin-Gene einbezogen, ermöglichten zunächst eine Diskriminierung zwischen zwei histologischen KZT-Subtypen. Aufgrund einer signifikant unterschiedlichen Expression von *WNT13* und *CTNNB1* war es möglich, Dysgerminome von Endodermalen Sinustumoren (Syn. Dottersacktumoren) zu unterscheiden. Differentielle Expressionsmuster zwischen den beiden Subtypen konnten ebenso für andere Wnt-Komponenten, wie *Frizzled*, *DVL* und *LRP6*, gezeigt

werden. Unter Verwendung eines Multi-Tissue-Arrays wurde in immunhistochemischen Untersuchungen schließlich eine erhöhte β -Catenin-Expression mit nukleärer Translokation insbesondere in Dottersacktumoren deutlich (14/26). Während altersunabhängig in nahezu allen unreifen Teratomen ebenfalls eine nukleäre Expression von β -Catenin vorhanden war (7/8), waren Seminome und Dysgerminome negativ (0/12) (Fritsch *et al.*, 2006) (siehe Abbildung 1.11).

**B**

Tumorentität	zytoplasmatisch/membranös (%)	nukleär (%)
Dottersacktumor	26/26 (100)	14/26 (54)
Germinom	2/12 fokal (17)	0/12 (0)
Reines matures Teratom	2/2 (100)	0/2 (0)
<u>Immature/mature Teratome</u>		
Mature Komponenten	20/20 (100)	14/20 (63)
Immature Komponenten	8/8 (100)	7/8 (88)
Embryonales Karzinom	3/4 schwach (75)	0/4 (0)

Abbildung 1.11: β -Catenin-Immunhistochemie an Keimzelltumoren.

Ergebnisse der β -Catenin-Immunhistochemie für unterschiedliche Keimzelltumorsubtypen aus Fritsch *et al.*, 2006. **(A)** Repräsentative Färbungen der β -Catenin-Immunhistochemie für Dottersacktumoren, immature Teratomkomponenten, Dysgerminome und Embryonale Karzinome. **(B)** Tabelle über die Ergebnisse der β -Catenin-Expression, basierend auf den immunhistochemischen Analysen. Abbildung und Tabelle entnommen und verändert aus/nach Fritsch *et al.*, 2006.

In Übereinstimmung mit den Methylierungsanalysen an Keimzelltumoren Erwachsener (Honorio *et al.*, 2003) wiesen Kato *et al.* bei sieben von zehn untersuchten Dottersacktumoren des Kindesalters ebenfalls eine Hypermethylierung des *APC*-Promotors nach. Diese korrelierte zwar mit einer verringerten *APC*-Expression, jedoch nicht mit einer nukleären Akkumulation von β -Catenin (Kato *et al.*, 2006). Die Autoren gingen daher nicht von einer Aktivierung des Wnt-Signalweges in Keimzelltumoren aus.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Bei Keimzelltumoren des Kindesalters ist eine Tumorprogression vom benignen Teratom zum malignen Dottersacktumor zu beobachten, die mit einer Zunahme an komplexen molekulargenetischen Aberrationen einhergeht und die Prognose der Patienten entscheidend verschlechtert. Dieser Verlauf ist mit der Progression von benignen kolorektalen Adenomen zu malignen Karzinomen vergleichbar, die mit Mutationen des Tumorsuppressors *APC* einhergeht und in einer aberranten, konstitutiven Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges resultiert.

Die Aktivierung des Wnt-Signalweges stellt eine molekularbiologische Veränderung dar, die nahezu regelhaft in Teratomen sowie in Dottersacktumoren nachgewiesen werden kann. Hinsichtlich der Bedeutung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges bei der Pathogenese von Keimzelltumoren des Kindesalters liegen bis heute jedoch wenige, überwiegend kontroverse Daten vor. Zahlreiche Komponenten des Signalweges sind zudem weder bei Keimzelltumoren des Erwachsenen- noch des Kindesalters spezifisch untersucht worden.

Es wird postuliert, dass dem Wnt-Signalweg eine entscheidende Rolle bei der gerichteten Progression vom Teratom zum Dottersacktumor zukommt, die mit einer nukleären Akkumulation von β -Catenin einhergeht und die genetische Grundlage für den Zugewinn chromosomaler Aberrationen schafft. Die folgenden Hypothesen bilden die Grundlage dieser Arbeit:

- i. Die Tumorprogression vom Teratom zum Dottersacktumor geschieht vor dem Hintergrund einer konstitutiven Wnt-Aktivierung.
- ii. Die Wnt-Aktivierung basiert auf Störungen in verschiedenen Regulatoren des Signalweges.
- iii. Die Tumorprogression wird durch die Dysregulation von Zielgenen gefördert.

Eine umfassende genetische und epigenetische Charakterisierung verschiedener Wnt/ β -Catenin-Regulatoren an unterschiedlichen pädiatrischen Keimzelltumor-Subentitäten soll die Relevanz des Signalweges für die Pathogenese dieser Tumoren klären.

2 MATERIAL

2.1 Patienten

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen stand Tumormaterial von insgesamt 50 Patienten zur Verfügung. Im Rahmen der MAKEI-Studie (Göbel *et al.*, 2000) – einer kooperativen Therapieoptimierungsstudie der Deutschen Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie (GPOH) zu nicht-testikulären KZT im Kindes- und Jugendalter – wurden 44 Patienten behandelt. Die klinischen Daten wurden von der MAKEI-Studienzentrale (aktuelle Studienleitung: Dr. Gabriele Calaminus, Universitätsklinikum Münster, Klinik für Kinder- und Jugendmedizin) bereitgestellt. Zusätzliches Tumorgewebe von sechs Patienten wurde von Dr. James C. Nicholson der *United Kingdom Cancer and Leukemia Group* (CCLG) zur Verfügung gestellt.

Die Untersuchungen erfolgten mit Zustimmung der Ethikkommission der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf bzw. des Review Boards der UK CCLG. Tabelle 2.1 gibt einen Überblick über die analysierten Tumorentitäten und Fallzahlen. Eine detaillierte Aufstellung kann Tabelle 8.1 des Anhangs entnommen werden.

Tabelle 2.1. Analyisierte Tumorentitäten und Fallzahlen (n).

Entität (dt.)	Entität (engl.)	Abkürzung	n
Reife Teratome	Mature teratoma	TER	6
Unreife Teratome	Immature teratoma	IT	9
Dottersacktumoren	Yolk sac tumors	YST	16
Gemischte maligne KZT	Mixed malignant GCT	MGCT	10
Dysgerminome	Dysgerminomas	DYS	9

Jeder Patient bzw. das Tumormaterial ist anonymisiert in der Düsseldorfer Keimzelltumor-Gewebebank erfasst und über die Access-Datenbank-Identnummer (#) identifizierbar. Für die Aufstellung wurden die Tumoren nach Tumorentität und aufsteigender Malignität (TER > IT > YST > MGCT > DYS) sortiert. Lediglich reine Teratome werden unter reifen bzw. unreifen Teratomen geführt. Teratome mit malignen Dottersacktumor-Mikrofoci werden hingegen der Gruppe der Dottersacktumoren zugeteilt (#14, #119). Eine Ausnahme stellen die Tumoren #76 und #104 dar; in beiden Fällen handelt es sich um unreife Teratome mit Dottersacktumoranteil. Nach referenzpathologischer Begutachtung war letztgenannte Komponente im untersuchten Material jedoch kaum nachweisbar, so dass diese Fälle in der Gruppe der Teratome verbleiben.

Tumoren mit zwei Tumorkomponenten wurden in Abhängigkeit der führenden Komponente der entsprechenden Gruppe zugeordnet, Mischtumoren mit mehr als zwei Tumorkomponenten wurden unter den gemischten malignen KZT geführt. Die

führende Komponente war hierbei in der Regel identifizierbar; sie wird in Tabelle 8.1 des Anhangs an jeweils erster Stelle aufgeführt.

Das Alter der Patienten bei Diagnose lag zwischen 0 (Neugeborene) und 18 Jahren. Aufgrund der Daten zur chromosomalen Konstitution der KZT bei Kindern und Jugendlichen (Schneider *et al.*, 2001a; Schneider *et al.*, 2006) wurden die Tumoren für die weiteren Auswertungen nach Alter getrennt ausgewertet. Die Gruppe der Säuglinge bzw. Kleinkinder umfasste dabei Patienten im Alter von 0–7 Jahren (n = 24), die Gruppe der Kinder bzw. Jugendlichen umfasste Patienten im Alter von ≥ 8 Jahren (n = 25). Material des Patienten #136 wurde als Einzelfall getrennt ausgewertet. Dieser Patient litt im Alter von 51 Jahren an einem reifen Teratom der Steißbeinregion.

Bei dem untersuchten Tumormaterial handelte es sich überwiegend um Primärmaterial ohne vorausgegangene Chemotherapie. Material nach Chemotherapie lag in lediglich vier Fällen vor (#99, #133, #39, #74). Im Fall #99 handelte es sich, als Folge eines metastasierten Dottersacktumors, um einen gemischten malignen Keimzelltumor des Hodens mit Lymphknotenmetastasen, die sich von der Symphyse bis zum Hals erstreckten und histologisch eine teratomatöse Differenzierung zeigten (Calaminus *et al.*, 2009).

Wenn Daten zum weiteren klinischen Verlauf der Patienten vorlagen, wurde der Status in Tabelle 8.1 des Anhangs mit aufgeführt. Daten zum klinischen Verlauf der sechs UK CCLG-Patienten (#U3, #U45, #U144, #U212, #U363, #U420) waren nicht vorhanden und werden daher nicht aufgeführt. In der untersuchten Kohorte haben acht Patienten im weiteren Verlauf ein Rezidiv (#23, #74, #104, #8, #34) oder eine Krankheitsprogression (#9, #74 – DOD, *dead of disease*; #11, #119 – DOC, *dead of complications*), erlitten. Im Fall des Patienten #9 handelte es sich um eine hochmaligne, hepatoide Variante eines Dottersacktumors mit Lungenmetastasen. Im Fall #74 wurde der Rezidivtumor eines Dysgerminoms untersucht, der sich als unreifes Teratom mit 5% unreifen, chondro-sarkomatösen Anteilen manifestierte. Die anderen, hier nicht explizit erwähnten Patienten, befanden sich zum Zeitpunkt der Abgabe dieser Arbeit in anhaltender Remission (CR, *complete remission*).

In Abhängigkeit der Menge des vorhandenen Materials bzw. dessen Qualität konnte nicht jeder Patient in die einzelnen Untersuchungen mit eingeschlossen werden. Eine Übersicht über die an dem Patientenmaterial durchgeführten Analysen kann dem Anhang entnommen werden (siehe Tabelle 8.2).

2.1.1 Tumorfrischgewebe

Für die Untersuchungen an KZT des Kindesalters standen frisch gefrorene Tumorgewebe aus der Keimzelltumorgewebebank der MAKEI-Studie zur Verfügung.

Das Gewebe wurde nach schriftlicher Einwilligung der Patienten bzw. ihrer Eltern während routinemäßiger Operationen im Rahmen der protokollgerechten, multimodalen Therapie gewonnen. Dabei wurde die pathologische Diagnosestellung durch die Aufarbeitung nicht eingeschränkt.

Die Aufarbeitung und histopathologische Begutachtung der Gewebe erfolgte durch den ortständigen Pathologen. Die Tumorprobe für die genetische Analyse wurde während des Zuschnittes des Tumors gewonnen, unmittelbar in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80° Celsius gelagert. Entsprechend der Empfehlung des MAKEI-Protokolls wurde bei allen Patienten eine referenzhistopathologische Begutachtung am Deutschen Kindertumorregister der Universität Kiel (Professor Dr. Dieter Harms und Professor Dr. Ivo Leuschner) veranlasst.

Die morphologische Klassifikation der Keimzelltumorgewebe erfolgte entsprechend der für die jeweilige Tumorlokalisierung passenden WHO-Klassifikation. Die histologische Einteilung testikulärer KZT erfolgte nach Mostofi und Sobin (Mostofi und Sobin, 1977), ovarialer KZT nach Serov und Scully (Serov und Scully, 1973) und intrakranialer KZT nach Kleihues *et al.* (Kleihues *et al.*, 1993). Die Festlegung des Unreifegrades von Teratomen orientierte sich an dem Gradingssystem von Gonzales-Crussi (Gonzalez-Crussi *et al.*, 1978). Dieses beurteilt den relativen Anteil unreifer embryonaler, meist neuroepithelialer, Strukturen in den Teratomen.

Vor der genetischen Analyse der Tumorproben wurden Gefrierschnitte durchgeführt und mit Hämatoxyllin-Eosin gefärbt. Nach histopathologischer Begutachtung der Gewebe wurden Proben mit weniger als 75% vitalem Tumoranteil von den Untersuchungen ausgeschlossen.

2.1.2 Paraffingewebe

Paraffinblöcke von 13 Patienten der MAKEI-Studie (#23, #89, #55, #78, #76, #54, #119, #14, #82, #4, #19, #6, #90) wurden zur Durchführung immunhistochemischer Untersuchungen von Prof. Dr. Ivo Leuschner des Kindertumorregisters der GPOH in Kiel zur Verfügung gestellt.

2.1.3 Blut

Von 16 Patienten der MAKEI-Studie (#23, #89, #76, #54, #119, #63, #4, #34, #48, #19, #90, #111, #51, #99, #33, #31) stand in Ergänzung zum kryokonservierten Gewebe peripheres EDTA-Blut zur Verfügung.

2.2 Referenzgewebe und -zelllinie

Fetale Ovarien als Referenzgewebe zu KZT spiegeln aufgrund ihrer hohen Zelldichte an Keimzellen die Situation des korrespondierenden Normalgewebes optimal wider. Da in den pathologischen Registern keine fetalen Ovarien von Aborten bzw. Totgeburten akquiriert werden konnten, mussten andere Referenzgewebe eingesetzt werden. Für die ersten Analysen wurde gesundes Hodengewebe als Referenz verwendet. Dieses wurde bei routinemäßigen Operationen im Rahmen von Orchidektomien gewonnen und von Prof. Dr. Wolfgang Schulz von der Urologischen Klinik der Unikliniken Düsseldorf zur Verfügung gestellt. Da es sich hierbei jedoch um qualitativ und quantitativ nur eingeschränkt verwendbare Proben handelte, wurde für die weiterführenden Analysen mittels quantitativer Real-Time PCR nach kurzer Zeit auf FirstChoice® Total-RNA (Ambion, Kassel) aus gesunden humanen Geweben (Human Ovary Total RNA, AM6974; Human Testes Total RNA, AM7972) zurückgegriffen.

Als Positivkontrolle für die quantitative Real-Time PCR wurde FirstChoice® Total-RNA der Mammakarzinom-Zelllinie MCF-7 (Breast Adenocarcinoma (MCF-7) Total RNA, AM7846) verwendet. Für weitere Analysen wurde diese Zelllinie kommerziell erworben (siehe Abschnitt 2.3) und kultiviert (siehe Abschnitt 3.5).

2.3 Humane Zelllinien

Bei den verwendeten humanen Zelllinien handelte es sich um adhärent wachsende, etablierte und charakterisierte Zelllinien, die in Tabelle 2.2 aufgelistet sind.

Tabelle 2.2. Verwendete humane Zelllinien.

Zelllinie	#	Organismus	Ursprung	Organ
JAR	HTB-144	Homo sapiens	Choriokarzinom	Plazenta
MCF-7	ACC-115	Homo sapiens	Mammakarzinom	Brust
NCCIT	CRL-2073	Homo sapiens	Pluripotentes Embryonales Karzinom, Teratokarzinom	
TE76.T	CRL-7732	Homo sapiens	Steißbeinteratom	Knochen
2102EP	/	Homo sapiens	Teratokarzinom, Dottersacktumor, Embryonales Karzinom	Hoden

Die Mammakarzinomzelllinie MCF-7 (Soule *et al.*, 1973) wurde bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) erworben. Da in dieser Zelllinie eine Aktivierung des Wnt-Signalweges gezeigt werden konnte (Melkonyan *et al.*, 1997; Veeck *et al.*, 2008b), wurde sie als Positivkontrolle und zu Etablierungszwecken herangezogen. Die Keimzelltumor-Zelllinien JAR (Pattillo *et al.*, 1971), NCCIT (Teshima *et al.*, 1988, Damjanov *et al.*, 1993) und TE76.T wurden

von der American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, USA) erworben. Die Embryonalkarzinom-Zelllinie 2102EP (Wang *et al.*, 1981) stellte Dr. Leendert Looijenga des Erasmus MC-University Medical Centers (Rotterdam, Niederlande) zur Verfügung.

2.4 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien und Reagenzien wurden mit dem Reinheitsgrad *pro analysis* verwendet.

2.4.1 Allgemeine Chemikalien und Reagenzien

Albumin, bovine	Sigma, Deisenhofen
Ampicillin	Sigma, Deisenhofen
5-Aza-2'-deoxycytidine, ≥97%	Sigma, Deisenhofen
Biozym LE Agarose	Biozym, Hessisch Oldendorf
Dimethylformamid (DMF)	Sigma, Deisenhofen
DMSO, ≥99.7%	Sigma, Deisenhofen
Eisessig	Merck, Darmstadt
Eosin G	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid, 10 mg·ml ⁻¹	Sigma, Deisenhofen
Ethanol	Merck, Darmstadt
Gelatine	Fluka, Buchs, CH
Guanidinthiocyanat	Merck, Darmstadt
HCl	Sigma, Deisenhofen
Insulin solution, human, 10 mg·ml ⁻¹	Sigma, Deisenhofen
Mayers Hämalaun	Merck, Darmstadt
β-Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
2-Propanol	Merck, Darmstadt
Trichostatin A, 5 mM in DMSO	Sigma, Deisenhofen
TRIS	Roth, Karlsruhe
TRIzol Reagent	Invitrogen, Karlsruhe
Trypanblau, 0,4%	Sigma, Deisenhofen
Wasserstoffperoxid, 30%	Merck, Darmstadt
X-Gal, 50 mg·ml ⁻¹	Promega, Mannheim
Xylol	Merck, Darmstadt

2.4.2 Spezielle Chemikalien und Reagenzien

AB-Serum, 10%	Biotest AG, Dreieich
Buffer (10x) with EDTA	Applied Biosystems, Darmstadt
Entellan	Merck, Darmstadt
Glykogen, 20 µg·µl ⁻¹	Invitrogen, Karlsruhe
Hi-Di™ Formamid	Applied Biosystems, Darmstadt
Liquid DAB, Substrate Chromo. System	Dako, Hamburg
Loading Dye Solution, 6x	Fermentas, St. Leon-Rot
Nuclease-Free Water	Applied Biosystems, Darmstadt
Peroxidase Blockierungsreagenz	Dako, Hamburg
POP-7 Polymer	Applied Biosystems, Darmstadt
Target Retrieval Solution, 10x	Dako, Hamburg

2.5 Puffer, Lösungen und Medien

Puffer, Lösungen und Medien wurden, falls nicht gesondert angegeben, mit destilliertem, 0,2 µM-sterilfiltriertem Wasser (Millipore, Schwalbach) angesetzt und bei Bedarf autoklaviert. Die Zusammensetzung entspricht Protokollen aus „Molecular Cloning“ (Sambrook *et al.*, 1989).

2.5.1 Puffer und Lösungen

Back Extraction Buffer	4 M Guanidinthiocyanat, 50 mM Natriumcitrat, 1 M TRIS pH 8,0
TAE-Puffer	Bio-Rad, München
TE-Puffer	1 M TRIS, 0,5 M EDTA, pH 7,6
TRIS/HCl	1 M TRIS pH 8,0

2.5.2 Lösungen und Medien für die Zellkultur

Dulbecco's PBS (1x), without Ca & Mg	PAA, Pasching
FCS, heat inactivated	PAA, Pasching
GIBCO DMEM	Invitrogen, Karlsruhe
GIBCO MEM NEAA (100x)	Invitrogen, Karlsruhe
GIBCO RPMI 1640 (1x), without L-Glut	Invitrogen, Karlsruhe
GIBCO Sodium Pyruvate, 100 mM	Invitrogen, Karlsruhe
L-Glutamine, liquid, 200 mM (100x)	Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin-Streptomycin, liquid	Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin/EDTA, (1x)	PAA, Pasching

2.5.3 Medien für die Bakterienkultur

LB Agar, Miller, 2% (w/v) in H ₂ O	Fluka, Buchs, CH
LB Broth, 3,7% (w/v) in H ₂ O	Sigma, Deisenhofen
SOC-Medium	Invitrogen, Karlsruhe

2.6 Bakterien

Klonierungen wurden mit One Shot® TOP10 Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen, Karlsruhe) durchgeführt.

2.7 Plasmide

Für die TOPO TA Klonierung® wurde der pCR®2.1-TOPO® Vektor (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Die Plasmidkarte kann Abbildung 8.2 des Anhangs entnommen werden.

2.8 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide (siehe Tabelle 2.3 bis Tabelle 2.7) wurden von der Firma Eurofins/MWG/Operon (Ebersberg) synthetisiert und mit Nuklease-freiem H₂O auf eine Konzentration von 10 µM eingestellt.

2.8.1 PCR und Sequenzierung

Bei den Oligonukleotiden der Gene *APC* und *WTX* handelte es sich um publizierte Sequenzen (Sievers *et al.*, 2006; Rivera *et al.*, 2007).

Tabelle 2.3. Oligonukleotide für die PCR und Sequenzierung.

T_a, Annealing-Temperatur.

Bezeichnung	Orientierung	Primer-Sequenz 5' → 3'	T _a (°C)
APC 429	Forward	CTACTGCTGAAAAGAGAGAG	55
	Reverse	CTCTCTCTTTTCAGCAGTAG	55
APC A 41/110	Forward	GGCTGCCACTTGCAAAGTT	56/58
	Reverse	GATGACTTTTGGTGGCATGGCAG	
β-Cat B	Forward	TTCAATGGGTCATATCACAGATTC	58/54
	Reverse	CTAACTTTTAGTTCTCAAACTGC	
β-Cat C	Forward	TCTACTAATGCTAATACTGTTTCG	58
	Reverse	AATCTGACTTTTCAGTAAGGCAATG	
M13 rev (-29)	Forward	CAGGAAACAGCTATGACC	55
WTX.AF	Forward	CCAGACCCCACTGTGATGCTTCCTG	55
WTX.AR	Reverse	CAGCCACAGATGTCTTACATCTGGAGC	55
WTX.BF	Forward	CAGCTCCAAGAAAGGTCTCAGCAAG	55
WTX.BR	Reverse	CTGGATCTTTACAGGCCATTTTCTC	55
WTX.CF	Forward	GTCAGAGCCAGGCCTCATGAGCACG	55
WTX.CR	Reverse	CATCATCATCTGGCAAGGCCATCTC	55
WTX.DF	Forward	GGGATGTGACATCCCTGAAAAGCTTTG	55
WTX.DR	Reverse	CCTCACCTGAATCATCCTCAAATCC	55
WTX.EF	Forward	CAATATGAACCTGGGCTACCATCCCAC	55
WTX.ER	Reverse	CTGGCATGAGCTTCTCGGGCACGTG	55
WTX.FF	Forward	CCTCCATGGTCTGAAGCTCTGAGATG	55
WTX.FR	Reverse	CATAACGCTTCTCCAGAGGACGGAAG	55
WTX.GF	Forward	GAGTATCAGATGAGGCCCTTAGG	55
WTX.GR	Reverse	CACATCAGCGATGTCAAAGGTCACC	55
WTX.HF	Forward	GGAATGCCACTGTGAGTTTCTCACAGG	55
WTX.HR	Reverse	GTCCTCCTCATCTGAATCTTCTCTGC	55
WTX.IF	Forward	GTGAGCAGCCTCCCTCGATACTTGG	55
WTX.IR	Reverse	ACGAGCTAGTTGAGGCCCAGATTC	55
WTX.JF	Forward	CCAACCAGTTGGACAGGCCTTCCAG	55
WTX.JR	Reverse	CTAGGTTTCCATTCATGGCAGTGGAG	55
WTX.KF	Forward	CTTCCAGTTCTGGAGGCTTCAGC	55
WTX.KRa	Reverse	GCAGATGCACTTGAGTTGAACGTGG	55

2.8.2 Reverse-Transkriptions-PCR

Bei den Oligonukleotiden für die Reverse-Transkriptions-PCR (RT-PCR) handelte es sich um Exon-Exon-Grenzen überspannende, cDNA-spezifische Primer.

Tabelle 2.4. Oligonukleotide für die RT-PCR.

T_a, Annealing-Temperatur.

Bezeichnung	Orientierung	Primer-Sequenz 5' → 3'	T _a (°C)
ACTB 903 / 904	Forward	TCATGAAGTGTGACGTGGACATC	60
	Reverse	CAGGAGGAGCAATGATCTTGATCT	
SFRP2 RT-PCR	Forward	ACCAGAACATGCGGCTGCCC	60
	Reverse	AGCGTTTCCATTATGTCGTTGTCATCA	

2.8.3 Methylierungsspezifische PCR

Der DNA-Methylierungsstatus der Gene *APC*, *DKK1* und *SFRP2* wurde mittels methylierungsspezifischer PCR (MSP) analysiert. Bei den eingesetzten Oligonukleotiden handelte es sich um publizierte Sequenzen (Sievers *et al.*, 2006; Suzuki *et al.*, 2007; Veeck *et al.*, 2008b).

Tabelle 2.5. Oligonukleotide für die methylierungsspezifische PCR.

T_a, Annealing-Temperatur.

Bezeichnung	Orientierung	Primer-Sequenz 5' → 3'	T _a (°C)
APC 832	Forward	GGGTTGTATTAATATAGTTATAT	50
APC 833	Reverse	TTCCTTACTTACTAAAACTAAAA	
APC 832	Forward	GGGTTGTATTAATATAGTTATAT	58
APC 892	Reverse	CGAAATACGAATCGAAAAACG	
APC 832	Forward	GGGTTGTATTAATATAGTTATAT	56
APC 893	Reverse	CAAAATACAAATCAAAAAACA	
DKK1 U-MSP	Forward	TTTTAAGGGGTTGGAATGTTTT	58
	Reverse	CCACAAAACCATACCAATTCAAC	
DKK1 M-MSP	Forward	TTAAGGGGTCGGAATGTTTC	58
	Reverse	CACGAAACCGTACCGATTC	
SFRP2 MSP U	Forward	TTTTGGGTTGGAGTTTTTTGGAGTTGTGT	58
	Reverse	AACCCACTCTCTTCACTAAATACAACCTCA	
SFRP2 MSP M	Forward	GGGTCGGAGTTTTTCGGAGTTGCGC	58
	Reverse	CCGCTCTCTTCGCTAAATACGACTCG	

2.8.4 Bisulfitsequenzierung

Bei den Oligonukleotiden für die weiterführende Methylierungsanalyse mittels Bisulfitsequenzierung handelte es sich im Fall der Gene *DKK1* und *SFRP2* um publizierte Sequenzen (Kawamoto *et al.*, 2008).

Tabelle 2.6. Oligonukleotide für die Bisulfittsequenzierung.T_a, Annealing-Temperatur.

Bezeichnung	Orientierung	Primer-Sequenz 5' → 3'	T _a (°C)
APC BGS	Forward	TAATTTTTTTGTTTTGTTGGGGATGGG	55
	Reverse	AACTACACCAATACAACCACATATC	
DKK1 BGS	Forward	GGGGTGAAGAGTGTTAAAGGTT	54
	Reverse	AAACCATCATCTCAAAAAAACTCAA	
	Reverse	CAAAAATAAACTTACAATTACTAC	

2.8.5 Mikrosatellitenanalyse

Die chromosomale Region 5q21-5q23 wurde mittels Mikrosatellitenanalysen auf das Vorliegen eines Allelverlustes (LOH) untersucht. Sequenzinformationen für die Oligonukleotide der Mikrosatelliten wurden dem UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>) sowie der Genome Database (<http://www.gdb.org/>) entnommen. Die eingesetzten *Forward*-Primer waren am 5'-Ende 6-FAM fluoreszenzmarkiert. Primer und PCR-Bedingungen der Marker D5S82, D5S1965 und D5S346 wurden entsprechend der Publikation von Sievers *et al.* (Sievers *et al.*, 2006) eingesetzt.

Tabelle 2.7. Mikrosatellitenmarker.

Marker	Position	Länge (bp)	Orient.	Primer-Sequenz 5' → 3'
D5S409	5q21.1	138-154	Forward	GAGGGGATGAAGTGTGGATAAAC
			Reverse	CTGTAGGATGGCAGTGCTCTTAG
D5S433	5q21.2	192-220	Forward	TGTAAGACATACTCTCTATCACCC
			Reverse	TCAGACATCCATCTGTGTG
D5S82	5q21.2/3	169-179	Forward	TGTAAGACATACTCTCTATCACCC
			Reverse	CCCAATTGTATAGATTTAGAAGTC
D5S2501	5q22.1	308-334	Forward	TGATTACTCTGAGGAAGAAGGC
			Reverse	TTGAAATGGGCACAGAAATT
D5S1965	5q22.2	230-252	Forward	TGTCCCGTTGATAAAAATTACTGCG
			Reverse	GTGTCTGGGATTTCTACGCAATG
D5S346	5q21-22	96-122	Forward	AGCAGATAAGACAGTATTACTAGTT
			Reverse	ACTCACTCTAGTGATAAATCGGG
D5S2065	5q22.3	109-135	Forward	CAGCCTCATTGTTTATTGACAG
			Reverse	AATGGCATAGTTTTGGCTC
D5S592	5q23.1	145-175	Forward	AGACAGACAGAGAGATTAGA
			Reverse	AGTAAAGTGAGTGGAGAGC

2.9 Größen- und Massenstandard

In der Agarosegelelektrophorese wurde die 1 kb Plus DNA-Ladder (Invitrogen, Karlsruhe) als DNA-Größenstandard verwendet. Als Proteinmarker für den Protein Truncation Test wurde die PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas, St. Leon-Rot) verwendet.

2.10 TaqMan® Assays

Für die quantitative Real-Time PCR wurden TaqMan® Gene Expression Assays, bestehend aus Primern und einer fluoreszenzmarkierten Sonde, von der Firma Applied Biosystems, Darmstadt, bezogen. Durch die Verwendung von Exon-Exon-Grenzen überspannenden Sonden wurde eine cDNA-spezifische Detektion gewährleistet. Die Sonden waren, sofern nicht anderweitig beschrieben, 5'-FAM (Fluorophor) und 3'-MGB (Quencher) markiert (siehe Tabelle 2.8).

Für die Ermittlung einer endogenen Kontrolle wurde die TaqMan® *Human* Endogenous Control Plate (Applied Biosystems, Darmstadt) eingesetzt. Der TaqMan® Predeveloped Assay 431941E (18SrRNA; VIC/MGB) ließ aufgrund seines Designs auch die Detektion genomischer DNA zu, sodass in der Folge der Experimente auf die Assays Hs00172187_m1 (POLR2A; FAM/MGB) und 4326320E (GUSB; VIC/MGB) zurückgegriffen wurde.

Tabelle 2.8. TaqMan® Assays.

Assay ID	Gename	Gensymbol
4319413E	18S	18SrRNA
Hs00181051_m1	Adenomatous polyposis coli	APC
Hs00394718_m1	Axin1	AXIN1
Hs00610344_m1	Axin2	AXIN 2
Hs00277039_m1	Cyclin D1	CCND1
Hs00905030_m1	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog	cMYC
Hs00170025_m1	Catenin, beta 1, 88 kDa	CTNNB1
Hs00376818_m1	dapper, antagonist of beta-catenin, homolog 3	DACT3
Hs00183740_m1	Dickkopf homolog 1 (<i>Xenopus laevis</i>)	DKK1
Hs00737028_m1	dishevelled, dsh homolog 1 (<i>Drosophila</i>)	DVL1
Hs00158980_m1	Epithelial cell adhesion molecule	EPCAM
Hs00361432_s1	frizzled homolog 2 (<i>Drosophila</i>)	FZD2
Hs00275656_m1	Glycogen synthase kinase 3 beta	GSK3 β
4326320E	Beta glucuronidase	GUSB
Hs00610483_m1	v-Ha-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog	HRAS
Hs00173587_m1	Lectin, galactoside-binding, soluble, 3	LGALS3
Hs00172187_m1	Polymerase (RNA) II polypeptide A	POLR2A
Hs00610060_m1	Secreted frizzled-related protein 1	SFRP1
Hs00293258_m1	Secreted frizzled-related protein 2	SFRP2
Hs00180066_m1	Secreted frizzled-related protein 4	SFRP4
Hs00169366_m1	Secreted frizzled-related protein 5	SFRP5
Hs00195591_m1	Snail homolog 1 (<i>Drosophila</i>)	SNAI1
Hs00183662_m1	WNT inhibitory factor 1	WIF1
Hs00403552_m1	FAM123B, familiy with sequence similarity 123B	WTX

2.11 Antikörper

Die primären Antikörper für die Immunhistochemie (IHC) wurden in Kombination mit dem Vectastain® ABC Kit (Mouse IgG) (Vector Laboratories, Burlingame, USA) bzw. dem REAL™ EnVision™ Detektionssystem, Peroxidase/DAB Anti-Kaninchen/Maus (Dako, Hamburg) verwendet. Sekundäre Antikörper wurden dem entsprechenden Kit entnommen. Der Western-Blot-Antikörper (WB) wurde im Rahmen des Protein-Truncation-Tests (PTT) eingesetzt.

Tabelle 2.9. Antikörper des PTT und der IHC.

IHC, Immunhistochemie; PTT, Protein Truncation Test; WB, Western Blot.

Antikörper	gerichtet gegen	Firma	Verwendung
Anti-HA-Peroxidase, High Affinity (3F10), rat, monoclonal	HA-Epitop	Roche, Grenzach	PTT/WB
beta-catenin C19220, clone 14, mouse, monoclonal	β-Catenin	Transduction Laboratories, Lexington, USA	IHC
BerEP4, M0804, mouse, monoclonal	EpCAM	Dako, Hamburg	IHC
FRP-2 (H-140), sc-13940, rabbit, polyclonal	SFRP2	Santa Cruz, Heidelberg	IHC
IgG1-κ, M9269, clone MOPC21, mouse, monoclonal	Isotypkontrolle	Sigma, Deisenhofen	IHC
Rabbit Immunoglobulin Fraction, Normal, X0903	Isotypkontrolle	Dako, Hamburg	IHC

2.12 Enzyme

2.12.1 Restriktionsenzyme

Für die Kontrolle der Klonierungsreaktionen mit dem pCR®2.1-TOPO® Vektor wurden die Restriktionsenzyme *EcoRI* bzw. FastDigest® *EcoRI* (NEB, Ipswich, USA) eingesetzt.

2.12.2 Sonstige Enzyme

Alkalische Phosphatase, Shrimp
Exonuclease I
HotStarTaq DNA Polymerase
Protease, 7,5 AU
Proteinase K, 20 mg·ml⁻¹
Taq DNA Polymerase

Roche, Grenzach
NEB, Ipswich, USA
Qiagen, Hilden
Qiagen, Hilden
Qiagen, Hilden
Qiagen, Hilden

2.13 Kit-Systeme

Agilent RNA 6000 Nano Kit	Agilent, Waldbronn
Amersham ECL Plus WB Detection Sytem	GE Healthcare, Freiburg
BigDye Terminator v1.1	Applied Biosystems, Darmstadt
CpGenome Universal Methylated DNA	Applied Biosystems, Darmstadt
DNeasy Blood and Tissue Kit	Qiagen, Hilden
DyeEx 2.0 Spin Kit	Qiagen, Hilden
Epitect Bisulfite Kit	Qiagen, Hilden
Epitect PCR Control DNA Set	Qiagen, Hilden
Expand High Fidelity PCR System	Roche, Darmstadt
FastPlasmid Mini Kit	Eppendorf, Hamburg
High Capacity cDNA RT Kit	Applied Biosystems, Darmstadt
NucleoSpin Extract Kit	Macherey-Nagel, Düren
QIAamp DNA Blood Midi Kit	Qiagen, Hilden
QIAamp DNA Micro Kit	Qiagen, Hilden
REAL™ EnVision™ Detektionssystem	Dako, Hamburg
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
TaqMan Universal PCR Master Mix	Applied Biosystems, Darmstadt
Taq PCR Master Mix	Qiagen, Hilden
TNT T7 Quick for PCR DNA Kit	Promega, Mannheim
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe
Vectastain ABC® Kit (Mouse IgG)	Vector Laboratories, Burlingame, USA

2.14 Verbrauchsmaterialien

Nicht gesondert aufgeführte Verbrauchsmaterialien wurden von den Firmen Applied Biosystems (Darmstadt), BD (Heidelberg), Eppendorf (Hamburg), Sarstedt (Nümbrecht) und Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) bezogen.

Corning Zellkulturflaschen, 75 cm ²	Corning-Costar, Bodenheim,
Deckgläser	Menzel, Braunschweig
MircoAmp Optical 96-well Reaction Plate	Applied Biosystems, Darmstadt
SuperFrost Plus Objektträger	Menzel, Braunschweig
Zellkulturschalen, 100x20 mm	Corning-Costar, Bodenheim

2.15 Geräte

Autoklav	Tuttnauer Systec 5075 ELVC	Systec, Wetztenberg
Bioanalyzer	Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent, Waldbronn
Brutschrank	Series II Water Jacketed CO2 Incubator	Thermo Fisher, Waltham, USA
Cycler	GeneAmp PCR System 2700	Applied Biosystems, Darmstadt
Digitalkamera	Camedia C-4040	Olympus, Hamburg
Gelelektrophorese-Netzgerät	Standard Power Pack P25	Biometra, Göttingen
Gelelektrophorese-System	Sub-Cell System	Bio-Rad, München
Geldokumentation I	LAS-3000 Mini 2UV Transilluminator	Fujifilm, Düsseldorf
Geldokumentation II	Gel iX Imager	Intas, Göttingen

Heizblock	Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Homogenisator	TissueRuptor®	Qiagen, Hilden
Mikroskop	Axiovert 200	Carl Zeiss AG, Jena
pH-Meter	Mikroprozessor pH/mV-Meter pH526	WTW, Weilheim
Real-Time System	7900HT Fast Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Darmstadt
Sequenzierer	3130 Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Darmstadt
Schüttler	Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Spektrophotometer	NanoDrop ND-1000	Thermo Fisher, Waltham, USA
Sterilbank	Holten LaminAir Clean Bench	Holten, Allerod, DK
UV-Tisch	UVT 2035	Herolab, Wiesloch
Waage	Kern 824	KERN, Balingen
Wasserbad	M2	Lauda, L.-Königshofen
Zentrifuge I	Biofuge fresco	Heraeus, Hanau
Zentrifuge II	Centrifuge 5430	Eppendorf, Hamburg

2.16 Software

3130 Data Collection v3.0	Applied Biosystems, Darmstadt
AxioVision	Carl Zeiss AG, Jena
GeneMapper v3.2	Applied Biosystems, Darmstadt
PASW Statistics 18	SPSS Inc., Chicago, USA
SDS Software v2.3	Applied Biosystems, Darmstadt
Sequencher 4.9 PC Software	Gene Codes Corp., Ann Arbor, USA

3 METHODEN

3.1 Molekularbiologische Methoden

Die im Folgenden nicht gesondert aufgeführten Standardmethoden wurden nach Protokollen aus „Molecular Cloning“ (Sambrook *et al.*, 1989) durchgeführt.

3.1.1 Nukleinsäureextraktion aus Gewebe

Wiederholte Auftau- und Einfrierzyklen des schockgefrorenen und bei -80°C gelagerten, kryokonservierten Gewebes wurden vermieden, um einer Degradation der Nukleinsäuren vorzubeugen.

3.1.1.1 Gewebe-Homogenisierung

Zur Nukleinsäureextraktion wurden zunächst 30–50 mg der kryokonservierten Gewebeprobe in einer Petrischale auf Trockeneis mit einem sterilen Skalpell zerkleinert und in einem Reaktionsgefäß mit 500 µl TRIzol® unter Verwendung des TissueRuptor®, eines Rotor-Stator-Homogenisators, homogenisiert und lysiert.

3.1.1.2 RNA-Extraktion

Die Nukleinsäureextraktion aus TRIzol erfolgte in Anlehnung an Chomczynski und Sacchi, 1987. Der Ansatz aus Abschnitt 3.1.1.1 wurde mit TRIzol® auf ein Gesamtvolumen von 1 ml gebracht, 5 min bei RT inkubiert, zur Phasentrennung mit 200 µl Chloroform versetzt und für 20 s invertiert. Nach 3 min Inkubation bei RT wurde der Ansatz zentrifugiert (12.000 g, 15 min, 4°C) und die obere, wässrige Phase für die RNA-Extraktion in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Intermediärphase sowie die Chloroform-Phenol-Phase wurden direkt für die DNA-Extraktion (siehe Abschnitt 3.1.1.3) weiterverwendet oder bei -80°C zur späteren Verwendung gelagert.

Für die RNA-Extraktion wurde die wässrige Phase mit 1 Volumen 70% Ethanol versetzt und für 20 s auf dem Vortex gemischt. Der Gesamtansatz wurde anschließend auf eine Mini Spin Säule (RNeasy Mini Kit, Qiagen) geladen und zentrifugiert (10.000 g, 1 min, RT). Die Extraktion erfolgte nach Angaben des Herstellers. Zur Elution wurde die Säule mit 40 µl Nuklease-freiem H₂O versetzt, 10

min bei RT inkubiert und die RNA eluiert (10.000 g, 1 min, RT). Die weiteren Arbeiten wurden auf Eis durchgeführt. Die Lagerung der aliquotierten RNA erfolgte bei -80°C.

Quantifiziert wurde die RNA am NanoDrop ND-1000 Spektrophotometer (siehe Abschnitt 3.1.3), die Qualitätsbestimmung erfolgte über den Agilent RNA 6000 Nano Chip am Agilent 2100 Bioanalyser (siehe Abschnitt 3.1.4).

3.1.1.3 DNA-Extraktion

Für die DNA-Extraktion wurden Intermediär- und Phenol-Phase aus 3.1.1.2 mit 500 µl Back Extraction Buffer versetzt, 15 s invertiert und 10 min bei RT inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation (12.000 g, 15 min, 4°C) wurde die obere, wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Lag die zu erwartende DNA-Ausbeute unter 20 µg, wurden 10–150 µg·ml⁻¹ Glykogen zur wässrigen Phase hinzugegeben und gemischt. Um die DNA zu präzipitieren, wurde der Ansatz nach Zugabe von 400 µl 2-Propanol für 15 s invertiert, 5 min bei RT inkubiert und zentrifugiert (12.000 g, 15 min, 4°C). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet zweimal mit je 1 ml 75% Ethanol gewaschen (12.000 g, 10 min, 4°C). Nach Abnahme des Überstands wurde das luftgetrocknete Pellet in TE-Puffer aufgenommen.

In einigen Fällen wurde die DNA über das DNeasy Blood and Tissue Kit extrahiert. Dazu wurde das zerkleinerte Gewebe (siehe Abschnitt 3.1.1.1) mit 200 µl Buffer ATL versetzt und eine erste Homogenisierung mittels TissueRuptor® vorgenommen. Anschließend wurde der Ansatz mit 20 µl Proteinase K (20 mg·ml⁻¹) versetzt und 15 s auf dem Vortex gemischt. Zur enzymatischen Lyse des Gewebes wurde der Ansatz für mindestens 3 h, längstens aber über Nacht, bei 56°C und 250 rpm im Heizblock inkubiert. Bei vollständig lysiertem Homogenisat erfolgte die DNA-Extraktion entsprechend den weiteren Angaben des Herstellers. Bei unvollständiger Lyse wurde der Ansatz erneut mit 20 µl Proteinase K versetzt und bis zur vollständigen Lyse inkubiert. Die gewonnene DNA wurde in 50–100 µl Nuklease-freiem H₂O eluiert. Die Quantifizierung der DNA erfolgte am NanoDrop ND-1000 Spektrophotometer (siehe Abschnitt 3.1.3).

3.1.2 Nukleinsäureextraktion aus Blut

Für die Nukleinsäureextraktion aus peripherem Blut wurden 200 µl einer frischen oder bei -20°C gelagerten EDTA-Blutprobe verwendet. Eine RNA-Extraktion wurde nicht durchgeführt. Die DNA-Extraktion erfolgte mittels QIAamp DNA Micro Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben. Die Elution erfolgte in 50 µl Nuklease-freiem H₂O. Die Quantifizierung der DNA wurde am NanoDrop ND-1000 Spektrophotometer durchgeführt (siehe Abschnitt 3.1.3).

3.1.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur Quantifizierung und Reinheitsbestimmung der Nukleinsäuren wurde die optische Dichte (OD) am NanoDrop ND-1000 Spektrophotometer bestimmt. Dabei wurde die Absorption der Nukleinsäuren bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen und der Quotient E260/E280 ermittelt. Reine Lösungen weisen hierbei einen Wert $\geq 1,8$ auf.

3.1.4 Qualitätsbestimmung von RNA

Die Qualitätsbestimmung der RNA erfolgte mit dem RNA 6000 Nano Chip am Agilent 2100 Bioanalyser nach Herstellerangaben. Dieses kapillarelektrophoretische System erlaubt, zusätzlich zur Darstellung des 28S/18SrRNA-Verhältnisses, eine Analyse der RNA-Integrität über die Ermittlung eines RIN-Wertes (RIN = 1, vollständig degradierte RNA; RIN = 10, hochqualitative RNA), der RNA Integrity Number (Imbeaud *et al.*, 2005). Somit konnte für die Genexpressionsanalysen mittels qPCR (siehe Abschnitt 3.1.11.3) der Einsatz von Proben hoher und vergleichbarer Qualität gewährleistet werden. Für die Experimente wurden lediglich Proben mit einem RIN-Wert ≥ 6 herangezogen.

3.1.5 DNA-Bisulfitmodifikation

Für die Analyse des Methylierungsstatus von Promotorregionen mittels methylierungsspezifischer PCR (siehe Abschnitt 3.1.10.2) und Bisulfitsequenzierung (siehe Abschnitt 3.1.12.2) wurde die DNA zunächst mit Natriumbisulfit modifiziert. Hierdurch werden nicht-methylierte Cytosin-Reste zu Uracil-Resten desaminiert (siehe Abbildung 3.1), während methylierte Cytosine unverändert als 5-Methylcytosine aus der Reaktion hervorgehen (Frommer *et al.*, 1992).

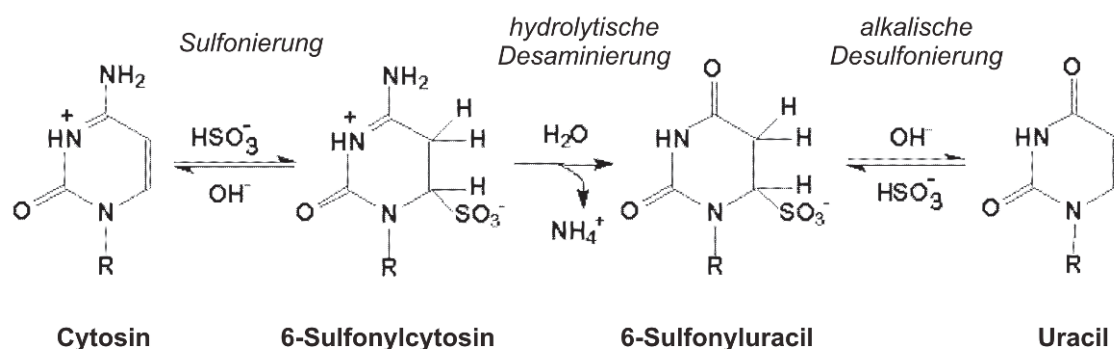


Abbildung 3.1: Ablauf der Desaminierung.

Modifizierte Darstellung nach Hayatsu, 1996.

Die bisulfitbehandelte DNA kann im Anschluss für eine PCR verwendet werden, bei der sämtliche Uracil- und Thymidinreste als Thymin amplifiziert und lediglich die 5-Methylcytosine als Cytosine vermehrt werden (Galm und Herman, 2005). Der durch diesen C/T-Polymorphismus im Amplifikat entstandene Primärsequenzunterschied erlaubt die Diskriminierung von methylierter und unmethylierter DNA und somit die Bestimmung des ursprünglichen Methylierungsgrades (Herman *et al.*, 1996). Die Modifikation von 1 µg genomischer DNA erfolgte mittels Epitect Bisulfite Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers.

3.1.6 Agarose-Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

Die analytische und präparative gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren erfolgte, entsprechend der Größen der aufzutrennenden Fragmente, in 0,7–1,5 % Agarose-Gelen, die mit 0,5 µg·ml⁻¹ Ethidiumbromid (EtBr) versetzt waren. Die Proben wurden zuvor mit 6x Ladepuffer versehen. Als Puffersystem wurde 1x TAE-Puffer (in H₂O) verwendet. Das in die Nukleinsäure interkalierte EtBr wurde unter dem UV-Transilluminator bei 302 nm angeregt, sodass die Nukleinsäuren durch die Fluoreszenzemission visualisiert werden konnten.

3.1.7 Aufreinigung von PCR-Produkten

3.1.7.1 Aufreinigung für die Klonierung

PCR-Produkte, die nach der Amplifikation mittels TOPO TA Cloning® kloniert werden sollten (siehe Abschnitt 3.2.2), wurden mittels NucleoSpin Extract II Kit nach Herstellerangaben aufgereinigt. Für anschließende Klonierungsreaktionen erfolgte die Elution der DNA in 25 µl NE-Buffer.

3.1.7.2 Aufreinigung für die Sequenzierung

PCR-Reaktionen mit einem spezifischem PCR-Produkt wurden vor der Sequenzierungsreaktion mittels Exonuclease 1 (Exo 1) und Shrimp Alkalischer Phosphatase (SAP) aufgereinigt. Exo 1 baut hierbei einzelsträngige DNA ab, während SAP die Dephosphorylierung des 5'-Phosphates der DNA katalysiert. Dazu wurden 15 µl des PCR-Produktes mit 2 U Exo 1 und 5 U SAP bei 37°C für 60 min inkubiert. Anschließend erfolgte eine Hitzeinaktivierung der Enzyme bei 75°C für 15 min im Thermocycler.

Traten in der Reaktion zusätzlich unspezifische PCR-Produkte auf, wurde das gewünschte DNA-Fragment nach der elektrophoretischen Auftrennung präparativ aus dem Agarose-Gel eluiert (siehe Abschnitt 3.1.7.3).

3.1.7.3 Aufreinigung von DNA aus Agarose-Gelen

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen wurden die elektrophoretisch aufgetrennten Banden (siehe Abschnitt 3.1.6) mit sterilen Skalpellens aus dem Gel ausgeschnitten und mittels NucleoSpin Extract II Kit (Macherey-Nagel) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Für anschließende Sequenzierungsreaktionen (siehe Abschnitt 3.1.12) erfolgte die Elution der DNA in 30 µl Nuklease-freiem H₂O.

3.1.8 Plasmid-DNA-Präparation aus Bakterien

Für die Anzucht von *E. coli*-Kulturen wurden weiße One Shot® TOP10 kompetente *E. coli*-Kolonien von einer LB-Agar-Platte (siehe Abschnitt 3.2.2) gepickt und in 2 ml LB-Medium mit Ampicillin (50 mg·ml⁻¹) angeimpft. Das Wachstum der Bakterien erfolgte über Nacht im Bakterenschüttler bei 37°C und 250 rpm und konnte durch eine Trübung des Mediums kontrolliert werden. Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* Bakterien erfolgte mit dem FastPlasmid Mini Kit nach Angaben des Herstellers. Die isolierte, rekombinante Plasmid-DNA wurde in 40 µl Nuklease-freiem H₂O eluiert und mittels Restriktionshydrolyse kontrolliert.

3.1.9 Restriktionsverdau von Plasmid-DNA

Der Restriktionsverdau von Plasmid-DNA aus dem pCR®2.1-TOPO® Vektor diente dem Nachweis der korrekten Insertgröße nach der TOPO TA Klonierung® (siehe Abschnitt 3.2.2). Dafür wurden die Enzyme *EcoRI* bzw. FastDigest® *EcoRI* eingesetzt. Es handelt sich dabei um eine bakterielle Restriktionsendonuklease des Typ II, welche die Schnitt- und Erkennungsstelle 5'-G/AATTC-3' besitzt. Die Reaktionsbedingungen unter Einsatz des entsprechenden 10x-Puffers entsprachen den Herstellerangaben. Die gelelektrophoretische Überprüfung erfolgte wie unter Abschnitt 3.1.6 beschrieben. Proben, die Vektor- und Insert-Banden korrekter Größe aufwiesen, wurden quantifiziert (siehe Abschnitt 3.1.3) und in die Sequenzierungsreaktion eingesetzt (siehe Abschnitt 3.1.12.1).

3.1.10 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR (Mullis und Faloona, 1987) wurde in dieser Arbeit für die gezielte Amplifikation von Genabschnitten eingesetzt. Die Selektivität der Reaktion wurde durch die Verwendung sequenzspezifischer Oligonukleotide (Primer) erreicht. Die PCR-Reaktion fand im Thermocycler statt. Die Produkte wurden jeweils gelelektrophoretisch aufgetrennt und für nachfolgende Applikationen aufgereinigt.

3.1.10.1 Standard-PCR

Bei dem Ausgangsmaterial für die Standard-PCR handelte es sich um genomische DNA. Das PCR-Produkt wurde in der Regel für die Sequenzanalyse verwendet (siehe Abschnitt 3.1.12). Im Standardansatz wurde 25–100 ng DNA eingesetzt, die in einem 25- oder 50- μ l-Ansatz zusammen mit 200–400 nM jedes Primers, 200 μ M des dNTP-Mix sowie 2,5–5 U des Enzyms amplifiziert wurde. Als Enzyme wurden die Taq DNA Polymerase, die HotStarTaq DNA Polymerase oder, für die Amplifikation großer Fragmente, der Expand High Fidelity Enzyme Mix mit 3'-5'-Exonuklease-Aktivität (*proofreading*-Aktivität) mit den vom Hersteller jeweils empfohlenen Pufferbedingungen verwendet. Die Ansätze wurden mit Nuklease-freiem H₂O auf das Reaktionsvolumen aufgefüllt. Als Negativkontrolle wurde der jeweils angesetzte Mastermix mit H₂O anstelle des DNA-Templates verwendet.

Das PCR-Programm bestand aus initialer Denaturierung von 5 min bei 95°C. Es folgten 30–40 Zyklen mit 30 s Denaturierung bei 95°C, 30 s Annealing bei 55–65°C und 30 s Elongation bei 72°C. Die finale Elongation betrug 10 min bei 72°C. Bei diesen PCR-Bedingungen für die Taq DNA Polymerase handelt es sich um Standard-PCR-Bedingungen. Diese variieren lediglich in der den jeweiligen Primern angepassten Annealing-Temperatur (T_a) und einer für die HotStarTaq DNA Polymerase verlängerten initialen Denaturierungszeit (15 min). Die Annealing-Temperatur lag im Durchschnitt 5–10°C unterhalb der Schmelztemperatur (T_m) der Primer.

Für die Amplifikation der *APC Mutation Cluster Region* (MCR) wurden die Primer *APC A 41* und *APC A 110* verwendet. Dem PCR-Ansatz wurde 1 mM BSA zugesetzt. Die Reaktion erfolgte mit Taq DNA Polymerase für 18 Zyklen bei einer Annealingtemperatur von 56°C und für 18 Zyklen bei einer Annealingtemperatur von 58°C. Das Exon 3 des β -Catenin-Gens *CTNNB1* wurde mittels Nested-PCR und HotStarTaq DNA Polymerase amplifiziert. Dafür wurden zunächst 100 ng DNA mit den äußeren Primern *β -Cat B FW* und *β -Cat B RV* für 5 Zyklen bei einer Annealingtemperatur von 58°C und für weitere 30 Zyklen bei einer Annealingtemperatur von 54°C vermehrt. Das Produkt der ersten PCR wurde als Template für eine zweite PCR mit dem inneren Primerpaar *β -Cat C FW* und *β -Cat C RV* für 30 Zyklen bei einer Annealingtemperatur von 58°C amplifiziert. Für die Amplifikation der gesamten codierenden Region von *WTX* wurden die Primerpaare *WTX.AF* und *WTX.ER* sowie *WTX.FF* und *WTX.KRa* verwendet. Die Reaktion wurde mit dem Expand High Fidelity Enzyme Mix durchgeführt. Das PCR-Programm bestand aus initialer Denaturierung von 2 min bei 94°C. Es folgten 35 Zyklen mit 15 s Denaturierung bei 94°C, 1 min Annealing bei 65 bzw. 61°C und 90 s Elongation bei 72°C. Die finale Elongation betrug 72°C für 10 min.

3.1.10.2 Methylierungsspezifische PCR

Die methylierungsspezifische PCR (MSP) diente der Analyse des Methylierungsstatus der Promotorregionen von *APC*, *DKK1* und *SFRP2*. Sie basiert, wie unter 3.1.5 beschrieben, auf der Umwandlung nicht-methylierter Cytosinreste zu Uracil mittels Natriumbisulfit und dem Einsatz von Primerpaaren, welche spezifisch zwischen methylierten bzw. nicht-methylierten Sequenzen diskriminieren können. Um eine gute Sensitivität zu gewährleisten, sollten die Primer dabei über mindestens 3 CpG-Dinukleotiden liegen (Galm und Herman, 2005). Sofern die hier verwendeten Oligonukleotidsequenzen nicht bereits publiziert waren, wurden sie mit Hilfe des Programms *MethPrimer* (<http://www.urogene.org/methprimer/index1.html>) ermittelt.

Als Template für die MSP wurde bisulfitmodifizierte, genomische DNA verwendet. (siehe Abschnitt 3.1.5). In die Reaktion wurden 50 ng DNA eingesetzt, die in einem Gesamtvolumen von 25 µl mit 200 nM jedes Primers, 200 µM des dNTP-Mixes, 2,5 U HotStarTaq DNA Polymerase sowie dem entsprechenden Reaktionspuffer amplifiziert wurde. Die Ansätze wurden mit Nuklease-freiem H₂O auf das Endvolumen aufgefüllt. Zur Kontrolle der Spezifität der MSP wurde das EpiTect PCR Control DNA Set verwendet. Alternativ kam modifizierte CpGenome Universal Methylated DNA bzw. modifizierte, nicht-methylierte DNA isoliert aus peripherem Blut zum Einsatz. Als Negativkontrolle der PCR-Reaktion wurde der jeweils angesetzte Mastermix mit H₂O anstelle des DNA-Template verwendet.

Für die MSP des *APC* 1A-Promotors wurde eine Nested-PCR durchgeführt. Dafür wurde die DNA zunächst mit dem methylierungsunabhängigen Primerpaar *APC* 832 und *APC* 833 für 35 Zyklen bei einer Annealingtemperatur von 50°C vermehrt. Für die M-MSP (PCR mit Primern, die spezifisch an methylierten Sequenzen binden) wurde das Produkt der ersten PCR als Template für eine zweite PCR mit dem Primerpaar *APC* 832 und *APC* 892 für 30 Zyklen bei einer Annealingtemperatur von 58°C amplifiziert. Für die U-MSP (PCR mit Primern, die spezifisch an unmethylierten Sequenzen binden) wurde mit dem Produkt der ersten PCR eine zweite PCR mit dem Primerpaar *APC* 832 und *APC* 893 für 30 Zyklen bei einer Annealingtemperatur von 56°C durchgeführt. Die M-MSP für den *DKK1*-Promotor wurde mit dem Primerpaar *DKK1* M-MSP FW und *DKK1* M-MSP RV, die U-MSP mit den Primern *DKK1* U-MSP FW und *DKK1* U-MSP RV für jeweils 35 Zyklen bei einer Annealingtemperatur von 58°C durchgeführt. Für den *SFRP2*-Promotor wurde die M-MSP mit den Primern *SFRP2* MSP M FW und *SFRP2* MSP M RV, die U-MSP mit den Primern *SFRP2* MSP U FW und *SFRP2* MSP U RV für jeweils 38 Zyklen bei einer Annealingtemperatur von 58°C durchgeführt.

Die PCR-Produkte wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert (siehe Abschnitt 3.1.6). Eine Validierung der MSP erfolgte durch die Wiederholung des Experiments mit DNA einer anderen Bisulfitmodifikation.

3.1.10.3 Reverse-Transkriptions-PCR

Die Reverse-Transkriptions-PCR (RT-PCR) diente entweder der Kontrolle der Reversen Transkription oder der semiquantitativen Quantifizierung von RNA. Sie wurde mit cDNA als Ausgangsmaterial durchgeführt. Nach der Reversen Transkription von 500 ng RNA wurden 25 ng cDNA mit je 200 pmol Primern und HotStarTaq DNA Polymerase in die Reaktion eingesetzt.

Die RT-PCR für *β-Actin* wurde mit den Exon-Exon-Grenzen überspannenden Primern *ACTB 903* und *ACTB 904* sowie für *SFRP2* mit den Primern *SFRP2 RT-PCR FW* und *SFRP2 RT-PCR RV*, mit jeweils 35 Zyklen und einer Annealingtemperatur von 60°C, durchgeführt. Die erfolgreiche Amplifikation wurde mittels Agarosegel-Elektrophorese (siehe Abschnitt 3.1.6) überprüft.

3.1.11 Quantitative Real-Time PCR

3.1.11.1 Ermittlung und Validierung der Housekeeping-Gene

Für die Normalisierung relativer Genexpressionsanalysen mittels quantitativer Real-Time PCR ist die Verwendung einer endogenen Kontrolle (HKG, *housekeeping gene*), notwendig. Hierüber wird eine Reduzierung der Varianz der Expressionsergebnisse, u.a. durch Konzentrationsunterschiede oder schwankende PCR-Effizienzen, erreicht. Dies führt zu einer Vergleichbarkeit der Proben untereinander. Bei HKG handelt es sich um Gene, die ubiquitär auf einem relativ konstanten Level exprimiert werden. Sie werden somit mit dem Zielgen ko-exprimiert, unter den gegebenen Versuchsbedingungen transkriptionell jedoch nicht reguliert.

Zur Ermittlung einer optimalen endogenen Kontrolle zur Normalisierung der Expression des zu untersuchenden Gens (GOI, *gene of interest*) wurden zunächst elf Gene (siehe Tabelle 3.1) auf der TaqMan® Human Endogenous Control Plate (Applied Biosystems) nach Angaben des Herstellers getestet.

Tabelle 3.1. Gene der TaqMan® Human Endogenous Control Plate.

Control Assay	Abkürzung
Internal Positive Control	IPC
18S rRNA	18S
Acidic ribosomal protein	huPO
Beta-actin	hubA
Cyclophilin	huCYC
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	huGAPDH
Phosphoglycerokinase	huPGK
b2-Microglobulin	hub2m
b-Glucuronidase	huGUS
Hypoxanthine ribosyl transferase	huHPRT
Transcription factor IID, TATA binding protein	huTBP
Transferrin receptor	huTfR

Die Analyse und Auswahl geeigneter HKG erfolgte anschließend mit dem frei verfügbaren, Excel-basierten Programm geNorm® (Vandesompele *et al.*, 2002). Dieses Programm vergleicht die Genexpressionsstabilitäten über einen berechneten Stabilitätswert „M“. Ziel ist die Identifikation eines oder mehrerer stabil exprimierter Gene sowie die Bestimmung der optimalen Anzahl der Gene zur Berechnung eines Normalisierungsfaktors (NF). Die M-Werte der HKG sollten hierbei unterhalb des empfohlenen geNorm-Grenzwertes von $M = 1,5$ liegen.

3.1.11.2 Reverse Transkription

Die Reverse Transkription von 500 ng Total-RNA erfolgte, nach Qualitätskontrolle der RNA (siehe Abschnitt 3.1.4), mittels High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) nach Herstellerangaben im Thermocycler. Die Konzentration der cDNA wurde, basierend auf der RNA-Konzentrationsmessung vor der reversen Transkription, auf $12,5 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ cDNA, eingestellt. Die aliquotierte cDNA wurde für maximal 6 Monate bei -20°C gelagert.

3.1.11.3 TaqMan® Real-Time PCR

Die quantitative Real-Time PCR wurde am 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) durchgeführt. Es wurden $12,5 \text{ ng}$ cDNA ($1 \mu\text{l}$) mit $10 \mu\text{l}$ TaqMan® Universal Master Mix (inklusive AmpErase® UNG), $1 \mu\text{l}$ genspezifischem TaqMan® Gene Expression Assay (siehe Abschnitt 2.10) und $8 \mu\text{l}$ Nuklease-freiem H_2O amplifiziert. Bei den Sonden der TaqMan® Gene Expression Assays handelte es sich um FAM/MGB markierte Oligonukleotide. Als endogene Kontrolle wurde initial *18SrRNA* (VIC/MGB) verwendet, für die weiterführenden Analysen wurden jedoch *POLR2A* (FAM/MGB) und *GUSB* (VIC/MGB) eingesetzt (siehe Abschnitt 4.1). Als Standardprogramm wurden 50°C für 2 min, 95°C für 10 min und 40 Zyklen bei 95°C für 15 s und 60°C für 1 min gewählt. Alle Reaktionen erfolgten entweder in Duplikaten, Triplikaten oder in Quadruplikaten.

Das Ziel der durchgeführten Genexpressionsanalysen bestand in der Ermittlung eines quantitativen Unterschiedes zwischen den verschiedenen Tumorentitäten bzw. den Zelllinien. Hierbei war das Verhältnis der Gruppen bzw. Proben zueinander, und nicht die Ermittlung der exakten Kopienzahlen, entscheidend. Zwecks Vergleichbarkeit zeitunabhängig voneinander durchgeführter Analysen desselben GOIs wurde auf jeder Platte ein interner Standard, normales Nebenhodengewebe bzw. FirstChoice® Total-RNA (siehe Abschnitt 2.2), mitgeführt, deren Ct-Werte Auskunft über die jeweilige PCR-Effizienz gaben. Bei der anschließenden relativen Quantifizierung der Proben mittels $\Delta\text{-Ct}$ -Methode (Pfaffl, 2001) wurde die mRNA-Expression des Zielgens gegen den Mittelwert der mRNA-Expression der Referenzgene normalisiert und logarithmisch transformiert. Lagen die Werte in den Gruppen einzelner GOIs im Nachkommabereich, wurden sie zwecks graphischer Darstellung mit einer

entsprechenden Zehnerpotenz multipliziert.

Um bei der Darstellung der Genexpressionsprofile der Wnt-Regulatoren anstelle einer unüberschaubaren Fülle aus Einzeldaten einen einfachen Überblick über die Unterschiede zwischen den Tumorentitäten sowie die Verteilung der Daten zu gewährleisten, wurde im Ergebnisteil eine Box-Whisker-Darstellung (BoxPlot) gewählt. Die Gruppe der Teratome umfasste dabei jeweils reife und unreife Teratome, die aufgrund ihrer geringen Fallzahlen zusammengefasst wurden. Ausreißer sind in den Abbildungen des Ergebnisteils durch entsprechende Kreise gekennzeichnet und werden im Text benannt.

3.1.12 DNA-Sequenzierung nach Sanger

Die DNA-Sequenzierung nach Sanger, der einzelsträngige DNA-Fragmente als Template zur Verfügung stehen, wird auch als Kettenabbruch- oder Didesoxynukleotidverfahren bezeichnet und beruht auf der 1977 erstmals beschriebenen Methode (Sanger *et al.*, 1977).

3.1.12.1 Standardsequenzierung

Die Sequenzierungsreaktionen erfolgten mit dem BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit entsprechend den Angaben des Herstellers. Für die Reaktion wurden 2–5 µl (ca. 100 ng DNA) des aufgereinigten PCR-Produktes (siehe Abschnitt 3.1.7.2), 400 nM des jeweiligen Sequenzierprimers und 4 µl Big Dye Terminator-Mix in einem 12 µl-Ansatz eingesetzt. Das Programm bestand aus einer initialen Denaturierung von 1 min bei 96°C. Es folgten 25 Zyklen von je 10 s Denaturierung bei 96°C, 50 s Annealing bei 55°C und 4 min Elongation bei 60°C. Im Anschluss wurde die Reaktion mit dem DyeEx 2.0 Spin Kit nach Herstellerangaben aufgereinigt, wobei der gesamte Ansatz auf die Säule geladen wurde. Das Eluat wurde mit dem entsprechenden Volumen Hi-Di™ Formamid versetzt und mit dem Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer sequenziert.

Die Sequenzierungen der *APC Mutation Cluster Region*, des Exon 3 von *CTNNB1* sowie der codierenden Region von *WTX* wurden wie oben beschrieben mit folgenden Sequenzierprimern (siehe Abschnitt 2.8.1) durchgeführt: *APC* (*APC 41*, *APC 429 FW*, *APC 429 RV* und *APC 110*); *CTNNB1* (β -Cat C FW, β -Cat RV); *WTX* (*WTX.AF* bis *WTX.KRa*).

Die Auswertung und das Alignment der Sequenzen erfolgte mit der Sequencher 4.9 PC Software gegen eine Datenbank-Referenzsequenz (RefSeq). Tabelle 3.2 gibt eine Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten RefSeqs und ihre GenBank-Nummern.

Tabelle 3.2. Referenzsequenzen und GenBank-Nummern.

GenBank-Nummer	Bezeichnung
NM 001127511.1	Homo sapiens adenomatous polyposis coli (<i>APC</i>), transcript variant 1, mRNA
NM 152424	Homo sapiens family with sequence similarity 123B (<i>FAM123B</i> , Syn. <i>WTX</i>), mRNA
ENSG00000145423	Secreted frizzled-related protein 2 precursor (<i>sFRP2</i>)
ENSG00000107984	Dickkopf homolog 1 (<i>Xenopus laevis</i>)
ENST00000349496	Catenin (cadherin-associated protein), beta 1, 88 kDa
NM 001101	Homo sapiens actin, beta (<i>ACTB</i>), mRNA
U0259	Human adenomatous polyposis coli (<i>APC</i>) gene, promoter sequence

3.1.12.2 Bisulfitsequenzierung

Das Verfahren der Bisulfitsequenzierung diente in dieser Arbeit der Analyse des Methylierungsgrades der *APC* 1A-Promotorregion sowie der Promotorregion von *DKK1* und *SFRP2*. Durch Amplifikation und Sequenzierung des entsprechenden Bereiches konnte Aufschluss über den Methylierungsstatus jedes CpG-Dinukleotids gewonnen werden.

Die Amplifikation von 100 ng bisulfitbehandelter, genomischer DNA (siehe Abschnitt 3.1.5) erfolgte in einem 50 µl-Ansatz mit HotStarTaq DNA Polymerase und jeweils 200 nM Primern, die die modifizierte DNA unabhängig einer vorliegenden Methylierung vermehrten. Die Reaktionen erfolgten nach PCR-Standardbedingungen (siehe Abschnitt 3.1.10.1). Für den *APC* 1A-Promotor wurde die Amplifikation mit den Primern *APC BGS FW* und *APC BGS RV* für jeweils 37 Zyklen bei einer Annealingtemperatur von 55°C durchgeführt. Für den *DKK1*-Promotor wurden die Primer *DKK1 BGS FW* und *DKK1 BGS RV* verwendet und die Reaktion für jeweils 38 Zyklen bei einer Annealingtemperatur von 54°C durchgeführt.

Nach Amplifikation und Aufreinigung (siehe Abschnitt 3.1.7.1) wurde das PCR-Produkt mittels TOPO TA Klonierung® (siehe Abschnitt 3.2.2) in den pCR®2.1-TOPO® Vektor ligiert und in One Shot® TOP10 kompetente *E. coli*-Bakterien transformiert. Pro Probe wurden anschließend 8–12 weiße Kolonien gepickt, kultiviert und die Plasmid-DNA extrahiert (siehe Abschnitt 3.1.8). Nach Überprüfung der Klone mittels Restriktionshydrolyse (siehe Abschnitt 3.1.9) wurden 2–5 µl der DNA in die Sequenzierungsreaktion eingesetzt. Die Klone wurden mit dem Primer *M13 FW* wie unter 3.1.12. beschrieben sequenziert. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit der Sequencher 4.9 PC Software.

3.1.13 Mikrosatellitenanalyse

In der vorliegenden Arbeit wurden Mikrosatellitenanalysen an korrespondierenden Proben von Tumorgewebe und peripherem Blut mit dem Ziel durchgeführt, einen

möglichen Heterozygotieverlust (LOH, loss of heterozygosity) an Chromosom 5q zu detektieren. Bei diesem Verfahren handelt es sich um eine Längenbestimmung mit polymorphen Markern (Mikrosatelliten) des Genoms, bei denen sich die Allele durch eine unterschiedliche Anzahl repetitiver Sequenzen (*short tandem repeats*) unterscheiden. Durch die vergleichende Analyse des maternalen bzw. paternalen Allels kann ein LOH festgestellt oder ausgeschlossen werden. Es wurden acht Mikrosatellitenmarker der Chromosomenregion 5q21.1–5q23.1 (D5S409, D5S433, D5S82, D5S2501, D5S1965, D5S346, D5S2065, D5S592) analysiert (siehe Tabelle 2.7). Die eingesetzten Primer flankierten die repetitive Sequenz des Mikrosatelliten. Der Vorwärtsprimer war am 5'-Ende 6-FAM fluoreszenzmarkiert. Sequenzinformationen wurden dem UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>) sowie der Genome Database (<http://www.gdb.org/>) entnommen. Die Primersequenzen und PCR-Bedingungen der Marker D5S82, D5S1965 und D5S346 wurden der Publikation Sievers *et al.*, 2006 entnommen. Für die Amplifikation der übrigen Regionen wurden 30 ng DNA-Template in einem 20 µl-Ansatz mit 200 nM jedes Primers, Taq PCR Master Mix und H₂O vermehrt. Standardprogramm war eine *Touchdown*-PCR, bei der die Bindungsspezifität der Primer durch eine zyklusweise Annäherung der Annealing-Temperatur (konsistente Reduktion von 1°C pro Zyklus) an den Schmelzpunkt der Primer erhöht wird.

Das PCR-Programm zur Amplifikation der Zielfragmente bestand aus initialer Denaturierung von 5 min bei 95°C. Es folgten zunächst 9 Zyklen von je 30 s Denaturierung bei 95°C, 30 s Annealing bei 63–54°C und 30 s Elongation bei 72°C. Es folgten weitere 25 Zyklen von je 30 s Denaturierung bei 95°C, 30 s Annealing bei 54°C und 30 s Elongation bei 72°C. Die finale Elongation betrug 72°C für 30 min.

Die PCR-Produkte wurden gelelektrophoretisch überprüft und der Ansatz gegebenenfalls mit H₂O verdünnt. Anschließend wurde 1 µl des (verdünnten) PCR-Produktes mit 1 µl des internen Größenstandards GeneScan™ 400HD ROX und 12 µl Hi-Di™ Formamid versetzt und die Fragmente nach Herstellerangaben am Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) kapillarelektrophoretisch aufgetrennt. Die Peak-Höhe der korrespondierenden Allele wurde mit der GeneMapper® Software v3.7 analysiert. Das Allel-Verhältnis (AR, allelic ratio) wurde wie zuvor beschrieben ermittelt (Sievers *et al.*, 2006).

$$\text{Allel-Verhältnis} = \frac{\text{Peak-Höhe des normalen Allels 2} / \text{Peak-Höhe des normalen Allels 1}}{\text{Peak-Höhe des Tumor-Allels 2} / \text{Peak-Höhe des Tumor-Allels 1}}$$

Dabei repräsentierte ein Verhältnis von $\leq 0,5$ und $\geq 1,5$ einen Heterozygotieverlust,

während ein Verhältnis von 0,5–0,8 bzw. 1,2–1,5 als nicht eindeutig und ein Verhältnis von 0,8–1,2 als Aufrechterhaltung des heterozygoten Status definiert wurde. Homozygote Loci wurden als nicht-informativ (n.i.) markiert.

3.2 Mikrobiologische Methoden

Die Arbeiten mit Bakterien erfolgten unter Einhaltung der Vorschriften für das Arbeiten mit GVO (S1) unter sterilen Bedingungen. Die Sterilisierung kontaminierter Arbeitsgeräte und mikrobiologischen Abfalls erfolgte im Autoklaven durch Dampfdrucksterilisation bei 120°C.

3.2.1 Kultivierung von Bakterienstämmen

Für die Anzucht von *E. coli*-Kulturen wurde 2 ml LB-Medium mit Ampicillin (50 mg·ml⁻¹) mit Einzelkolonien einer LB-Agar-Platte angeimpft und über Nacht bei 37°C und 250 rpm inkubiert (siehe Abschnitt 3.1.8).

3.2.2 TOPO TA Klonierung®

Bei der TOPO TA Klonierung®, die in dieser Arbeit für die Ligation und Transformation von DNA-Fragmenten in One Shot® TOP10 kompetente *E. coli*-Bakterien eingesetzt wurde, handelt es sich um ein Ligase-unabhängiges System. Hierbei wird ein mit Vaccinia Virus Topoisomerase I „aktivierter“ TA-Vektor verwendet und mit dem 3'-A-Überhang eines PCR-Produktes in den linearisierten Vektor mit 5'-T-Überhang kloniert (Shuman, 1994). Ausgangsmaterial für die Klonierung waren Taq bzw. HotStarTaq DNA Polymerase amplifizierte PCR-Produkte, die nach der Amplifikation mittels NucleoSpin Extract II Kit aufgereinigt wurden (siehe Abschnitt 3.1.7.1).

3.2.2.1 Addition von 3'-A-Überhängen

Da eine längerfristige Lagerung (≥ 2 Tage) der aufgereinigten PCR-Produkte mit einem Abbau der durch die HotStarTaq DNA Polymerase angefügten 3'-A-Überhänge einhergehen kann, wurden in diesem Fall die Überhänge unmittelbar vor der Klonierung erneut angefügt. Ein Aliquot des PCR-Produktes wurde mit 5 U Taq Polymerase, 0,2 mM dATP und H₂O versetzt, 15 min bei 72°C inkubiert und bis zur unmittelbar stattfindenden Ligation auf Eis gelagert.

3.2.2.2 Transformation von *E. coli*-Bakterien

Die Durchführung der Klonierungsreaktion erfolgte nach Angaben des Herstellers.

Dazu wurden 4 μl des PCR-Produktes (s.o.) mit 1 μl des pCR®2.1-TOPO® Vektors und 1 μl Salt Solution für 10 min bei RT inkubiert. Die Transformation wurde anschließend mit 50 μl One Shot® TOP10 kompetenten *E. coli*-Bakterien für 15 min auf Eis durchgeführt. Nach einem Hitzeschock des Transformationsansatzes für 30 s bei 42°C und anschließender Kultivierung in SOC-Medium für 1 h bei 37°C und 250 rpm wurden die Kulturen in verschiedenen Verdünnungen auf vorgewärmten, selektiven LB-Agarplatten (50 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ Ampicillin in H_2O ; 30 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ X-Gal in DMF) ausplattiert und ü.N. bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die langfristige Lagerung der Platten (≤ 3 Monate) erfolgte bei 4°C. Positive Transformanden wurden durch Blau-Weiß-Selektion ermittelt (siehe Abschnitt 3.2.2.3).

3.2.2.3 Blau-Weiß-Selektion

Der Blau-Weiß-Selektion liegt eine Unterbrechung des *lacZ'*-Gens auf dem pCR®2.1-TOPO® Vektor zu Grunde. Durch die Insertion eines DNA-Fragmentes in das *lacZ'*-Gen, welches für das N-terminale α -Fragment der β -Galactosidase kodiert, wird der ORF (*open reading frame*; Leserahmen) zerstört. Transformierte Bakterienkolonien bleiben in Anwesenheit von X-Gal farblos, d.h. „weiß“. Sie können so von nicht-transformierten Kolonien, deren intakte β -Galactosidase-Aktivität X-Gal zu einem wasserunlöslichen, blauen Indigofarbstoff umsetzen kann, unterschieden werden. Weiße Kolonien wurden mit sterilen Pipettenspitzen gepickt, kultiviert und für die Plasmid-DNA-Präparation (siehe Abschnitt 3.1.8) weiterverwendet.

3.3 Proteinanalytische Methoden

3.3.1 Protein-Truncation-Test (PTT)

Mit Hilfe des nicht-radioaktiven Protein-Truncation-Tests (Kahmann *et al.*, 2002) können Frameshift- und Nonsense-Mutationen auf Proteinebene aufgedeckt werden. Zur Analyse trunkierender Mutationen innerhalb des *APC* Gens wurde ein Fragment innerhalb der *Mutation Cluster Region* (MCR) analysiert. Die PCR-Amplifikation von 100 ng genomischer DNA, *in vitro* Transkription und Translation des PCR-Produktes sowie die anschließende Western Blot Analyse wurden am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie (AG Müller, Carla Fritsch) in Dortmund, wie zuvor beschrieben, durchgeführt (Sievers *et al.*, 2006). Für die *in vitro* Transkription und Translation wurde das TNT® T7 Quick for PCR DNA Kit verwendet. Der Antikörper Anti-HA-Peroxidase, High Affinity (3F10), zur Bindung an den HA-Tag des 5'-Primers wurde 1:5000 verdünnt und 1 h bei RT inkubiert. Die Detektion erfolgte abschließend mit dem Amersham ECL Plus Western Blotting Detection System.

3.4 Histologische Methoden

3.4.1 Anfertigung von Paraffinschnitten

Um eine optimale immunhistochemische Detektion bei gleichzeitig optimaler histopathologischer Zuordnung der einzelnen Tumorkomponenten zu gewährleisten, wurde für die immunhistochemischen Untersuchungen auf entsprechende Referenz-Paraffinblöcke (siehe Abschnitt 2.1.2) zurückgegriffen.

Paraffindünnschnitte (4–5 μm) wurden an einem Weichschnitt-Mikrotom im Chirurgischen Forschungslabor (AG Stöcklein) des Universitätsklinikums angefertigt und auf SuperFrost® Plus Objektträger aufgezogen. Zur optimalen Anheftung wurden die Schnitte 15 min bei 80°C gebacken und ü.N. bei 37°C inkubiert. Die langfristige Lagerung erfolgte bei -20°C.

3.4.2 Immunhistochemische Färbung

An nativ asservierten Proben durchgeführte Färbungen waren in Bezug auf die histologische Differenzierbarkeit oft unzureichend. Um eine optimale immunhistochemische Detektion bei gleichzeitig optimaler histopathologischer Zuordnung der einzelnen Tumorkomponenten zu gewährleisten, wurde daher für die immunhistochemischen Untersuchungen auf entsprechende Referenz-Paraffinblöcke vom Kindertumorregister der GPOH in Kiel zurückgegriffen.

Die immunhistochemische Detektion der Wnt-Regulatoren β -Catenin und EpCAM wurde unter Verwendung von Vectastain® ABC Kits, durch die Bildung eines Avidin-Biotin-Komplexes (ABC) mittels Peroxidase und dem Peroxidasesubstrat Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB), durchgeführt. Zunächst wurden die angefertigten Paraffindünnschnitte in Xylol entparaffiniert, in einer absteigenden Alkoholreihe für je 3 Minuten gewässert und 5 min in H_2O rehydriert. Die Demaskierung der Bindungsstellen erfolgte im Wasserbad für 30 min bei 95°C in 1x Target Retrieval Solution. Die endogene Peroxidase wurde durch 30-minütige Inkubation bei RT in 0,3% H_2O_2 (in 1x PBS) inhibiert und die unspezifischen Bindungsstellen durch die Inkubation mit normalem Serum des entsprechenden Vectastain® ABC Kits für 20 min abgesättigt. Für die Färbung wurden jeweils spezifische Primärantikörper (β -Catenin C19220, 1,25 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ in 10% AB-Serum; EpCAM M0804, 1 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ in 10% AB-Serum) gegen das nachzuweisende Protein verwendet. Eine Isotyp-Kontrolle, die derselben Spezies und Immunglobulingattung angehörte, wurde in gleicher Konzentration als Negativkontrolle mitgeführt. Biotinylierte Antikörper aus dem Vectastain® ABC Kit wurden als Sekundärantikörper gegen die jeweils verwendete Immunglobulingattung des Primärantikörpers

eingesetzt. Die Antikörper-Inkubationen erfolgten für jeweils 30 min bei RT. Die Visualisierung der Färbung erfolgte, nach Inkubation von Avidin (Reagenz A) und biotinyliertem Enzym (Reagenz B) aus dem Vectastain® ABC Kit, mittels DAB für 10 min im Dunkeln. Zwischen den einzelnen Schritten, außer nach der Absättigung mit Normalserum, wurden die Schnitte zweimal für je 3 min in 1x PBS gewaschen. Nach einer Gegenfärbung mit Mayers Hämalaun für 15 s und einer fließenden Wässerung für 15 min unter H₂O wurden die Gewebe in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert, in Xylol fixiert und abschließend mittels Entellan eingedeckelt.

Die immunhistochemische Darstellung des Wnt-Regulators SFRP2 wurde mit dem REAL™ EnVision™ Detektionssystem, Peroxidase/DAB Anti-Kaninchen/Maus durchgeführt. Entparaffinierung, Wässerung und Demaskierung erfolgten wie zuvor bereits beschrieben. Die endogene Peroxidase wurde mittels Peroxidase Blockierungsreagenz für 5 Minuten inhibiert. Für die Färbung wurde ein spezifischer Primärantikörper (FRP-2 H-140, 1:30, 6,6 µg·ml⁻¹ in 10% AB-Serum) gegen SFRP2 verwendet. Als Isotypkontrolle diente X0903 (rabbit immunoglobulin fraction, normal) in entsprechender Konzentration. Die Antikörper-Inkubationen erfolgten für jeweils 30 min bei RT. Peroxidase-markiertes Polymer (Reagenz A) diente als Sekundärantikörper und wurde ebenfalls 30 Minuten bei RT inkubiert. Zwischen den einzelnen Schritten wurden die Schnitte zweimal für je 3 min in 1x PBS gewaschen. Die Visualisierung der Färbung erfolgte mit der nach Herstellerangaben angesetzten DAB Substrat-Chromogenlösung (Reagenz B und C) für 10 min im Dunkeln. Anschließend wurden die Schnitte für je 5 Minuten in VE-H₂O gewaschen. Gegenfärbung, Entwässerung, Fixierung und Eindeckelung erfolgten wie zuvor beschrieben.

3.4.3 Mikroskopie

Alle Bilder wurden an einem Leitz Orthoplan-Mikroskop mit einer Olympus Camedia C-4040 Digitalkamera unter Verwendung der Firmensoftware AxioVision aufgenommen und als jpeg-Datei gespeichert.

3.5 Zellkulturtechniken

Die Arbeiten im Zellkulturbereich erfolgten unter Einhaltung der Vorschriften für das Arbeiten mit GVO (S1) unter sterilen Bedingungen. Die Sterilisierung kontaminierter Arbeitsgeräte und biologischen Abfalls erfolgte im Autoklaven durch Dampfdrucksterilisation bei 120°C.

3.5.1 Kultivierung humaner, adhärenter Zellen

Die verwendeten humanen Zelllinien wurden in 75 cm² Corning-Zellkulturflaschen im Brutschrank unter Standardkulturbedingungen bei 37°C und 5% CO₂-Begasung kultiviert. Für ein optimales Zellwachstum wurden die Zellkulturflaschen dazu vor Verwendung mit 10 ml 0,1% Gelatine (in H₂O) überschichtet und für 1 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde die Gelatine entfernt und durch 15–20 ml Nährmedium ersetzt. Für die Zelllinien JAR, NCCIT und MCF-7 wurde als Nährmedium GIBCO RPMI 1640 verwendet, welches vor Gebrauch mit 10% hitzeinaktiviertem, fötalen Kälberserum (FCS), 100 U·ml⁻¹ Penicillin, 100 µg·ml⁻¹ Streptomycin und 1 mM L-Glutamin komplettiert wurde. Für die Zelllinie MCF-7 wurde dem Nährmedium zudem 1% Natriumpyruvat, 1% nicht-essentielle Aminosäuren (NEAS) sowie 0,1% humanes Insulin beigefügt. Die Zelllinien TE76.T und 2102EP wurden in GIBCO DMEM, komplettiert mit 10% hitzeinaktiviertem FCS, 100 U·ml⁻¹ Penicillin, 100 µg·ml⁻¹ Streptomycin und 2 mM Glutamin, kultiviert.

Das Zellwachstum wurde täglich mittels Phasenkontrastmikroskop kontrolliert, um eine adhärente *Monolayer*-Schicht zu gewährleisten. Bei Erreichen einer nahezu vollständigen Konfluenz (80–90%) wurden die Zellen passagiert. Dazu wurde das verbrauchte Medium entfernt, der verbleibende Zellrasen mit 10 ml kaltem (4°C) 1x D-PBS gewaschen und die Zellen mit 0,5% Trypsin/EDTA vom Flaschenboden abgelöst. Eine maximale Enzym-Aktivität wurde durch die Inkubation des Ansatzes bei 37°C im Brutschrank erreicht. Die Reaktion wurde durch die Zugabe des entsprechenden Nährmediums abgestoppt, die Zellen darin resuspendiert und, abhängig von der Proliferationsrate, im Verhältnis 1:2 bis 1:12 in neue, gelatinebeschichtete Zellkulturflaschen gegeben und auf ein Volumen von 20 ml gebracht. Die Zellpassagen wurden entsprechend dokumentiert.

3.5.2 Lebendzellzahlbestimmung

Die Zellzahlbestimmung erfolgte mittels Trypanblau-Lösung in der Neubauer Zählkammer. Die mit Trypsin abgelösten Zellen wurden in 10 ml Medium gründlich resuspendiert und ein Aliquot von 30 µl mit dem entsprechenden Volumen Trypanblau versetzt und auf die Zählkammer gegeben. Tote Zellen mit blau gefärbtem Zytoplasma konnten von vitalen, ungefärbten Zellen unterschieden werden und wurden bei der Zählung nicht berücksichtigt.

3.5.3 Kryokonservierung humaner Zellen

Für die Langzeitlagerung der humanen Zelllinien wurden die Zellen kryokonserviert. Dazu wurden sie zunächst mittels Trypsin/EDTA abgelöst (siehe Abschnitt 3.5.3),

pelletiert (500 g, 5 min, RT) und anschließend nach Resuspension von 10^5 – 10^6 Zellen pro Milliliter in 10% DMSO in FCS in Kryoröhrchen überführt. Die langsame und schonende Einfrierung (Kühlungsrate $-1^\circ\text{C}/\text{min}$) der Röhrchen erfolgte bei -80°C in mit 2-Propanol befüllten Behältern. Für die langfristige Lagerung der Zellen (>1 Woche) wurden die Röhrchen in Tanks mit flüssigem Stickstoff überführt. Zur Rekultivierung wurden sie im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und das DMSO durch Pelletierung der Zellen (500 g, 5 min, RT) entfernt. Die Kultivierung erfolgte nach Resuspension der Zellen in frischem Medium wie zuvor beschrieben (siehe Abschnitt 1.1.1).

3.5.4 Nukleinsäureextraktion aus Zellen

Für die Isolation von DNA bzw. RNA aus humanen Zellen wurden diese mittels Trypsin/EDTA abgelöst (siehe Abschnitt 3.5.3) und pelletiert (1500 g, 5 min, RT). Das Pellet wurde wiederholt mit 1x D-PBS gewaschen und anschließend in 1,5 ml 1x D-PBS aufgenommen. Nach erneuter Zentrifugation (1500 g, 5 min, RT) wurde der Überstand dekantiert, das Pellet in 1 ml TRIzol aufgenommen und sorgfältig resuspendiert. Nach 5 min Inkubation bei RT zur vollständigen Lyse der Zellen wurde der Gesamtansatz zur späteren Verwendung entweder bei -80°C weggefroren oder direkt weiterverarbeitet. RNA- und DNA-Isolierung erfolgten mittels Phenol-Chloroform-Extraktion wie unter Abschnitt 3.1.1.2 und 3.1.1.3 beschrieben.

3.5.5 Demethylierung und Acetylierung humaner Zellen

Um den Zusammenhang von Promotormethylierungsstatus und Expression des extrazellulären Wnt-Inhibitors *SFRP2* zu analysieren, wurden Demethylierungs- und Acetylierungsversuche an humanen Zelllinien durchgeführt. Zur Demethylierung wurden die proliferierenden Zellen mit 5-Aza-2'-deoxycytidine (5-Aza) stimuliert. Zur Acetylierung der Zellen wurde Trichostatin A (TSA) zugegeben.

Die Versuche wurden in drei biologischen Replikaten mit unterschiedlichen Zellpassagen für je 96 h durchgeführt. Hierzu wurden die Zelllinien JAR und NCCIT mit einer Dichte von $3 \cdot 10^5$ Zellen, die Zelllinie MCF-7 mit einer Dichte von $5 \cdot 10^5$ Zellen in 5 Ansätzen in 100 mm-Zellkulturschalen ausgesät. Die Zellen wurden in verschiedenen Ansätzen entweder mit 5-Aza, TSA, einer Kombination aus beiden Reagenzien oder dem entsprechendem Volumen DMSO (Mockkontrolle, im Folgenden als Mock bezeichnet) behandelt. Dabei wurden Endkonzentrationen von 1 μM 5-Aza (in DMSO) bzw. 100 nM oder 300 nM TSA (in DMSO) eingesetzt. Unbehandelte Zellen wurden als Negativkontrolle mitgeführt. Es erfolgte ein täglicher Mediumwechsel, wobei 5-Aza dem Nährmedium über die Versuchsdauer alle 24 h beigefügt wurde. Die Zugabe von TSA erfolgte nach 72 h für die letzten 24 h des Versuchs. Aufgrund der toxischen Wirkung von 300 nM TSA auf die hochproliferativen Zelllinien JAR und NCCIT musste die Konzentration hier auf 100 nM verringert

werden. Nach 96 h wurden die Zellen geerntet und RNA bzw. DNA für weitere Analysen extrahiert (siehe Abschnitt 3.5.4).

3.6 Datenanalyse

3.6.1 Statistik

Die Ergebnisse der durchgeführten Experimente wurden nach Bearbeitung der Rohdaten (s.o.) in eine Microsoft Excel 2003 Tabelle übertragen und für die statistische Analyse aufgearbeitet. Die statistischen Analysen wurden mit dem Statistikprogramm PASW Statistics 18 von SPSS durchgeführt. Kategorische Daten wurden mit dem Chi-Quadrat Test verglichen. Für die Analyse nicht normalverteilter quantitativer Daten, wie u.a. aus den Expressionsanalysen, wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Für Korrelationsanalysen wurde der Korrelationskoeffizient nach Pearson für bivariate und metrisch skalierte Daten, ermittelt. P-Werte $\leq 0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen.

3.6.2 Standardabweichung

Zur Ermittlung der Standardabweichung im Rahmen der funktionellen Analysen an Zelllinien (siehe Abschnitt 4.7) wurden zunächst die einzelnen delta-Ct-Werte (siehe quantitative Real-Time PCR, Abschnitt 3.1.11.3) der biologischen Replikate durch Abzug des Mittelwertes der Housekeeper gebildet. Die Delogarithmierung sowie die anschließende Ermittlung der Standardabweichung erfolgten an den einzelnen delta-Ct-Werten. In den Diagrammen ist jeweils der Mittelwert der delogarithmierten delta-Ct-Werte dargestellt (siehe Abbildung 4.35, Abbildung 4.36 und Abbildung 4.37). Durch die (negative) Potenzierung des delta-Ct-Wertes ($2^{-\text{delta-Ct}}$) machen sich selbst geringe Schwankungen der Rohdaten häufig in großen Fehlerbalken bemerkbar.

3.6.3 Diagramme

Alle Diagramme wurden in Microsoft Office Excel 2003 erstellt. BoxPlot-Darstellungen der quantitativen Real-Time-Ergebnisse wurden in PASW Statistics 18 von SPSS generiert und gegebenenfalls nachträglich in Microsoft Office Powerpoint 2003 beschriftet.

4 ERGEBNISSE

4.1 Validierung der Housekeeping-Gene

Für die Genexpressionsanalysen mittels quantitativer Real-Time PCR war die Ermittlung eines geeigneten Housekeeping-Gens (HKG) notwendig. Dieses sollte die Normalisierung relativer Genexpressionslevel in den verschiedenen klinischen Proben gewährleisten. Analysiert wurden elf Gene der TaqMan® Human Endogenous Control Plate (siehe Abschnitt 3.1.11) sowie das RNA Polymerase 2A-Gen (*POLR2A*), das sich als HKG bereits in einer Vielzahl unterschiedlicher Gewebe ausgezeichnet hat (Radonic *et al.*, 2004).

Zur Analyse und Auswahl der Kandidatenreferenzgene dienten zunächst sechs Proben unterschiedlicher Tumorphistologie (#1, TER; #104, IT; #63, YST; #82, YST; #6, MGCT und #33, DYS). Die mit dem Programm geNorm® (Vandesompele *et al.*, 2002) für jedes Gen errechneten Stabilitätswerte (M) lagen mit Ausnahme des Gens *B2M* ($M = 1,722$) alle unterhalb des geNorm-Grenzwertes von $M = 1,5$ (siehe Abbildung 4.1, A). Die durchschnittlichen Expressionsstabilitätswerte sind in Abbildung 4.1, B, dargestellt. Der Kurvenverlauf der M-Werte stellt einen schrittweisen Ausschluss der Gene mit niedriger Genexpressionsstabilität und hohen M-Werten dar. *CYC* und *GAPDH* konnten von geNorm® in dem verwendeten experimentellen Setting demnach als die am stabilsten exprimierte Gene identifiziert werden.

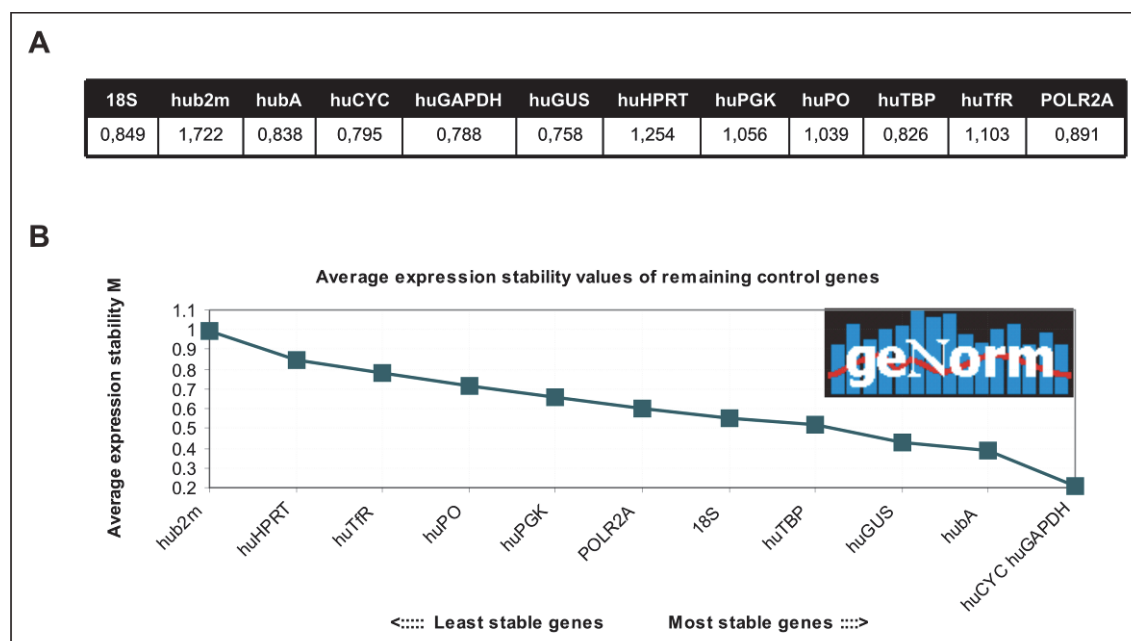


Abbildung 4.1: Ermittlung stabil exprimierter Referenzgene in KZT.

(A) Mittels geNorm® generierte Stabilitätswerte „M“ verschiedener Kandidatenreferenzgene (siehe Tabelle 3.1) und (B) schrittweiser Ausschluss der Gene mit niedriger Genexpressionsstabilität (Diagramm entspricht Originalausdruck).

In weiterführenden Analysen mit erhöhter Probenanzahl konnte eine gleichmäßig stabile Expression über die verschiedenen KZT-Entitäten jedoch lediglich für die HKG *POLR2A* und *GUSB* (*huGUS*) beobachtet werden (Ergebnisse nicht dargestellt). Nach dem initialen Einsatz von *18SrRNA* (*18S*) als endogene Kontrolle wurde eine optimale Normalisierung der Genexpression in KZT in weiterführenden Experimenten durch die Kombination dieser beiden Gene erzielt.

4.2 Charakterisierung von β -Catenin, Zielgenen und Rezeptoren

4.2.1 Expressionsprofil des Schlüsselregulators β -Catenin

Die Pathogenese zahlreicher Tumoren ist mit einer aberranten Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges assoziiert. Vordaten in KZT bei Kindern und Erwachsenen lassen auf eine konstitutive Aktivierung des Signalweges schließen (Honorio *et al.*, 2003; Honecker *et al.*, 2004a; Fritsch *et al.*, 2006). Da diese in der Regel mit einer gesteigerten Expression des Schlüsselregulators β -Catenin einhergeht und ebenfalls im Rahmen von Progressionsereignissen beobachtet werden konnte (Reya *et al.*, 2001; Taipale und Beachy, 2001; Ryo *et al.*, 2001; Gunther *et al.*, 2003), wurde für KZT unterschiedlicher Histologie ein Expressionsprofil von β -Catenin auf mRNA- und Proteinebene erstellt.

4.2.1.1 Expression auf mRNA-Ebene

In der *CTNNB1*-Real-Time PCR wurden Teratome (n = 9), Dottersacktumoren (n = 11), gemischte maligne KZT (n = 9) und Dysgerminome (n = 4) analysiert. Die Gruppe der Teratome umfasste reife (n = 5) und unreife (n = 4) Teratome. Die logarithmisch transformierten Werte wurden gegen *18SrRNA* normalisiert und zwecks Darstellung mit 10^5 multipliziert. Dabei zeigte sich die höchste *CTNNB1*-Expression in Dottersacktumoren und Teratomen (siehe Abbildung 4.2), während Dysgerminome eine lediglich geringe *CTNNB1*-Expression aufwiesen. Signifikante Expressionsunterschiede konnten zwischen Dottersacktumoren und gemischten malignen KZT (p = 0,02), Dottersacktumoren und Dysgerminomen (p = 0,004) sowie zwischen Teratomen und Dysgerminomen (p = 0,09) ausgemacht werden. Bei den Ausreißern in Abbildung 4.2 handelt es sich um die Patienten #23 (TER) und #126 (YST).

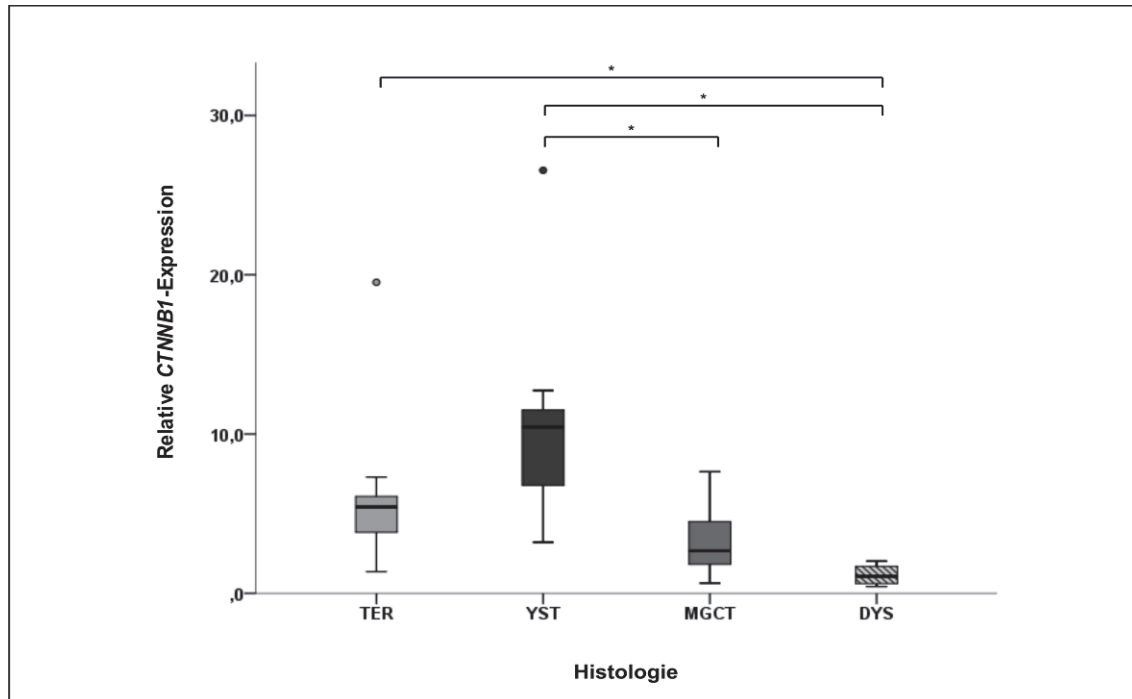


Abbildung 4.2: Relative CTNNB1-Expression in KZT.

Mittels quantitativer Real-Time PCR wurden Teratome (TER; n = 9), Dottersacktumoren (YST; n = 11), gemischte maligne KZT (MGCT; n = 9) und Dysgerminome (DYS; n = 4) analysiert. Die Normalisierung erfolgte gegen *18SrRNA*. Signifikante Expressionsunterschiede zwischen den Tumorentitäten werden durch Sterne markiert, Kreise stellen Ausreißer dar (Werte und Fälle siehe Text).

4.2.1.2 Expression auf Protein-Ebene

Um ergänzend zu den Arbeiten von Honecker *et al.* und Fritsch *et al.* (Honecker *et al.*, 2004a; Fritsch *et al.*, 2006) zur Beteiligung des Wnt-Signalweges an der Pathogenese von KZT eine zelluläre Lokalisation der β -Catenin-Expression und im Falle der Mischtumoren deren Zuordnung zum jeweiligen Tumoranteil zu ermöglichen, wurden immunhistochemische Analysen an ausgewählten Paraffingewebeschnitten durchgeführt. Dazu wurden insgesamt 13 Tumoren, darunter reife und unreife Teratome (#23, #89, #55, #76, #78), Dottersacktumoren (#119, #14, #82, #4) und gemischte maligne KZT (#54, #19, #6, #90) analysiert. Abbildung 4.3 zeigt repräsentative Ergebnisse der Färbungen.

Kolonkarzinomschnitte wurden als Positivkontrolle herangezogen. Die immunhistochemischen Analysen zeigten in dem hochproliferativen Gewebe eine starke, basal betonte und teilweise nukleäre Färbung von β -Catenin, die sich zumeist auf die Drüsenschläuche beschränkte (siehe Abbildung 4.3, A).

Einzig der Teratom-Anteil des gemischten malignen KZT (#14, siehe Abbildung 4.3, B) wies neben einer membranösen und zytoplasmatischen ebenfalls eine nukleäre Färbung auf. Diese zeigte sich insbesondere in den Kernen des schmalen Zytoplasmasaums von Becherzellen. Zwar war eine membranöse und

zytoplasmatische Färbung ebenfalls im reifen Teratom des Falls #23 (Ergebnisse nicht dargestellt) sowie in unreifen Teratomen nachweisbar, eine nukleäre Lokalisation von β -Catenin konnte hier hingegen nicht bestätigt werden. Die Fälle #89 (siehe Abbildung 4.3, C und D), #55 (Ergebnisse nicht dargestellt) und #78 (Ergebnisse nicht dargestellt) zeigten unabhängig des Malignitätsgrades vor allem eine kräftige zytoplasmatische und membranöse Färbung der Epithelien. Im Fall des Tumors #76 (Ergebnisse nicht dargestellt), bei dem es sich um ein unreifes Teratom mit geringem Dottersacktumor-Anteil handelte, zeigte der untersuchte Schnitt neben unreifen auch reife Teratomanteile. Dabei waren die Anteile des unreifen Teratoms zwar nicht nukleär, jedoch deutlich stärker zytoplasmatisch gefärbt als die Bereiche des reifen Teratoms.

Eine andere Situation stellte sich in Dottersacktumoren dar. Während eine membranöse Lokalisation von β -Catenin weder in den Fällen #119, #82, #4 noch im Dottersacktumor-Anteil des Falls #14 auftrat, konnte hier eine nukleäre Lokalisation nachgewiesen werden. So zeigte sich die Kernfärbung, neben einer insgesamt stark positiven Färbung, u.a. in Drüsenschläuchen (#119, Ergebnisse nicht dargestellt) und Erythrozyten (#4, Ergebnisse nicht dargestellt). Im Fall #14 ging die nukleäre Lokalisation mit einer deutlich zytoplasmatischen Lokalisation einher (siehe Abbildung 4.3, E und F). Der Dottersacktumor-Anteil des gemischten malignen KZT #6 wies im Gegensatz zu oben dargestellten Fällen in Ergänzung zur kräftig positiven und nukleären Färbung ebenso eine retikuläre, teilweise membranöse Färbung auf (Ergebnisse nicht dargestellt). Im Fall des Tumors #54 handelt es sich um ein Embryonales Karzinom, dessen Paraffinschnitt neben dem Embryonalen Karzinom-Anteil ebenfalls geringe Dottersacktumor- und Choriokarzinom-Anteile aufwies. Während sich die Anteile des Embryonalen Karzinoms sowie die mehrkernigen Zellen des Choriokarzinoms sehr stark membranös und zytoplasmatisch anfärbten, wiesen Stromazellen eine lediglich schwache Färbung auf (Ergebnisse nicht dargestellt).

Die gemischten malignen KZT lassen, wie bereits dargestellt, eine Identifizierung der β -Catenin-Expression in Abhängigkeit der jeweiligen Tumorkomponenten zu. In Ermangelung geeigneten Materials konnten keine reinen Dysgerminome untersucht werden; der gemischte KZT #19 zeigte jedoch weder im Dysgerminom- noch im Choriokarzinom-Anteil des Tumors, im Gegensatz zu #54, eine nachweisbare β -Catenin-Expression (siehe Abbildung 4.3, G und H).

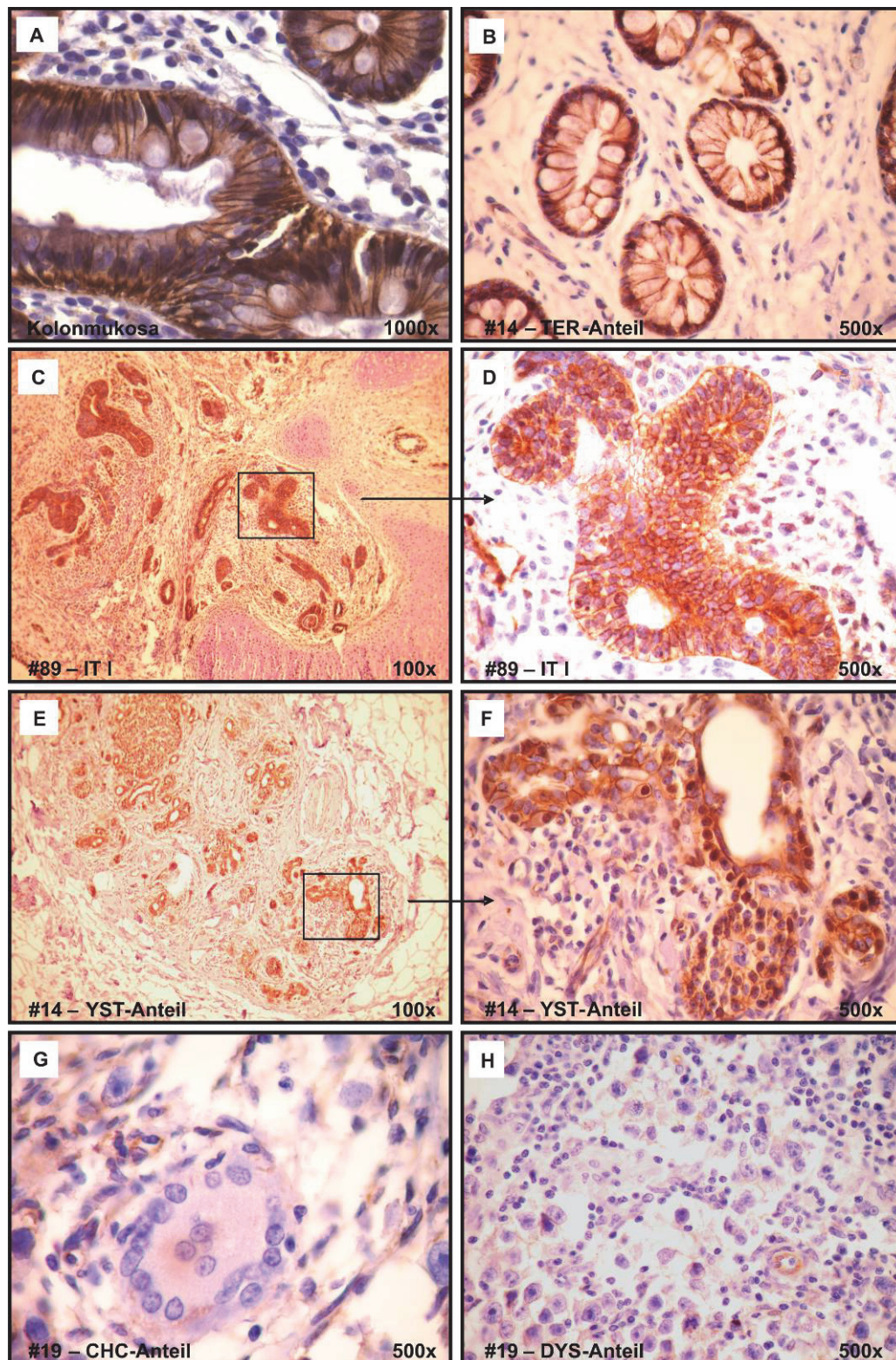


Abbildung 4.3: β -Catenin-Expression in KZT.

Mittels immunhistochemischer Färbungen wurden Paraffinschnitte von Teratomen (TER; n = 5), Dottersacktumoren (YST; n = 4) und gemischten malignen KZT (MGCT; n = 4) analysiert. Dargestellt sind repräsentative Ergebnisse der Färbungen an (A) gesunder Kolonmukosa, (B) dem Teratomanteil eines gemischten malignen KZT, (C und D) einem unreifen Teratom, (E und F) dem Dottersacktumorteil eines gemischten malignen KZT sowie (G) dem Choriokarzinom- bzw. (H) dem Dysgerminomanteil eines gemischten malignen KZT. Originale Vergrößerungen siehe Abbildung.

Tabelle 4.1 fasst die Ergebnisse der β -Catenin-Immunhistochemie anhand der Tumorentität bzw. im Fall der gemischten KZT anhand der jeweils analysierten Tumorkomponente zusammen.

Tabelle 4.1. Übersicht der β -Catenin-Immunhistochemie an KZT.

+, gering exprimiert; ++, mäßig exprimiert; +++, stark exprimiert; -, ungefärbt/nicht exprimiert.

Histologie/Komponente	β -Catenin-Expression		
	membranös	zytoplasmatisch	nukleär
Teratom, reif	+	+	(+)/-
Teratom, unreif	++	++	-
Dottersacktumor	+	++	+++
Embryonales Karzinom	+++	+++	-
Choriokarzinom	++	++	-
Dysgerminom	-	-	-

Da das Material für die immunhistochemischen Untersuchungen und die quantitative Real-Time PCR nicht durchgehend aus demselben Tumormaterial entnommen werden konnten, wurde keine Korrelation der β -Catenin Gen- und Proteinexpression vorgenommen. Die in der Real-Time-PCR beobachtete Hochregulierung von *CTNNB1* entspricht jedoch der stark positiven bzw. nukleären Expression des Proteins in der Immunhistochemie. Eine signifikant niedrigere *CTNNB1*-Expression in Dysgerminomen weist somit auf eine fehlende Proteinexpression hin, die sich entsprechend in den ungefärbten Anteilen des Tumors (#19, s.o.) widerspiegelt.

4.2.2 Mutationsanalyse an Exon 3 im β -Catenin-Gen

Heterozygote, dominant wirkende Mutationen im β -Catenin-Gen (*CTNNB1*) stellen eine häufige Ursache für eine Aktivierung des Wnt-Signalweges dar (Morin *et al.*, 1997; Polakis *et al.*, 1999). Betroffen ist in der Regel die Phosphorylierungsdomäne im N-terminalen Bereich von β -Catenin, die durch Exon 3 codiert wird (siehe Abbildung 1.5). Um die Tumoren aufgrund der differentiellen β -Catenin mRNA- und Proteinexpressionslevel (siehe Abschnitt 4.2.1) auf Mutationen im Exon 3 (Chr. 3: 41,266,017–41,266,244; 228 bp) des *CTNNB1*-Gens zu untersuchen, wurde diese Region in den unterschiedlichen Subentitäten amplifiziert und sequenziert (siehe Abbildung 4.4, A).

Analysiert wurden Teratome (n = 11), Dottersacktumoren (n = 11), gemischte maligne KZT (n = 10) und Dysgerminome (n = 6). Die Gruppe der Teratome umfasste reife (n = 4) und unreife (n = 7) Teratome. Die im Einzelnen untersuchten Tumoren können Tabelle 8.2 im Anhang entnommen werden. Sequenziert wurden jeweils die Nukleotide 3–223 des Exons 3 von *CTNNB1*. Mutationen in diesem Bereich waren nicht nachweisbar (Ergebnisse nicht dargestellt). Abbildung 4.4, B, stellt exemplarisch einen Ausschnitt des Chromatogramms des Tumors #126 dar.

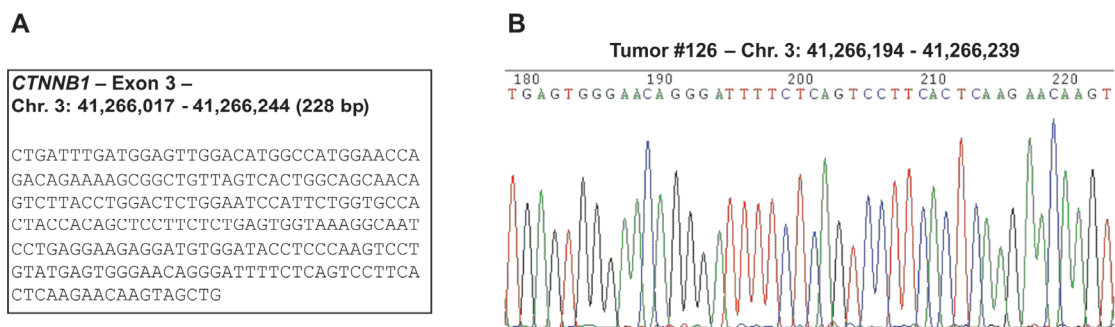


Abbildung 4.4: Mutationsanalyse des Exon 3 von CTNNB1.

(A) Die Phosphorylierungsdomäne im N-terminalen Bereich von β -Catenin wird durch Exon 3 des Gens (*CTNNB1*, ENSG00000168036, Transkript ENST00000349496) codiert. Analysiert wurden Teratome (TER; n = 11), Dottersacktumoren (YST; n = 11), gemischte maligne KZT (MGCT; n = 10) und Dysgerminome (DYS; n = 6). (B) Exemplarisch ist ein Ausschnitt des Chromatogramms des Tumors #126 dargestellt.

4.2.3 Expressionsprofil der β -Catenin-regulierten Gene *CCND1* und *c-MYC*

Um die Hypothese der Wnt-Aktivierung in KZT zu verifizieren und einen möglichen Zusammenhang zwischen der differentiellen mRNA- und Proteinexpression von β -Catenin (siehe Abschnitt 4.2.1) und der Expression spezifischer Wnt-Zielgene zu ermitteln, wurden Expressionsprofile der Gene *CCND1* und *c-MYC* erstellt.

In der *CCND1*-Real-Time PCR wurden Teratome (n = 10), Dottersacktumoren (n = 12), gemischte maligne KZT (n = 9) und Dysgerminome (n = 5) analysiert. Die Gruppe der Teratome umfasste reife (n = 5) und unreife (n = 5) Teratome. Die logarithmisch transformierten Werte wurden gegen *18SrRNA* normalisiert und zwecks Darstellung mit 10^5 multipliziert. Dabei zeigte sich in der Gruppe der Teratome eine im Vergleich zu den anderen Entitäten erhöhte *CCND1*-Expression (siehe Abbildung 4.5), während Dysgerminome im Gegensatz dazu die geringste *CCND1*-Expression aufwiesen. Signifikante Expressionsunterschiede konnten zwischen Teratomen und Dysgerminomen ($p = 0,007$) sowie zwischen Teratomen und Dottersacktumoren ($p = 0,021$) ausgemacht werden. Bei den Ausreißern in Abbildung 4.5 handelt es sich um die Fälle #89 (TER), #78 (IT), #6 (MGCT) und #99 (MGCT).

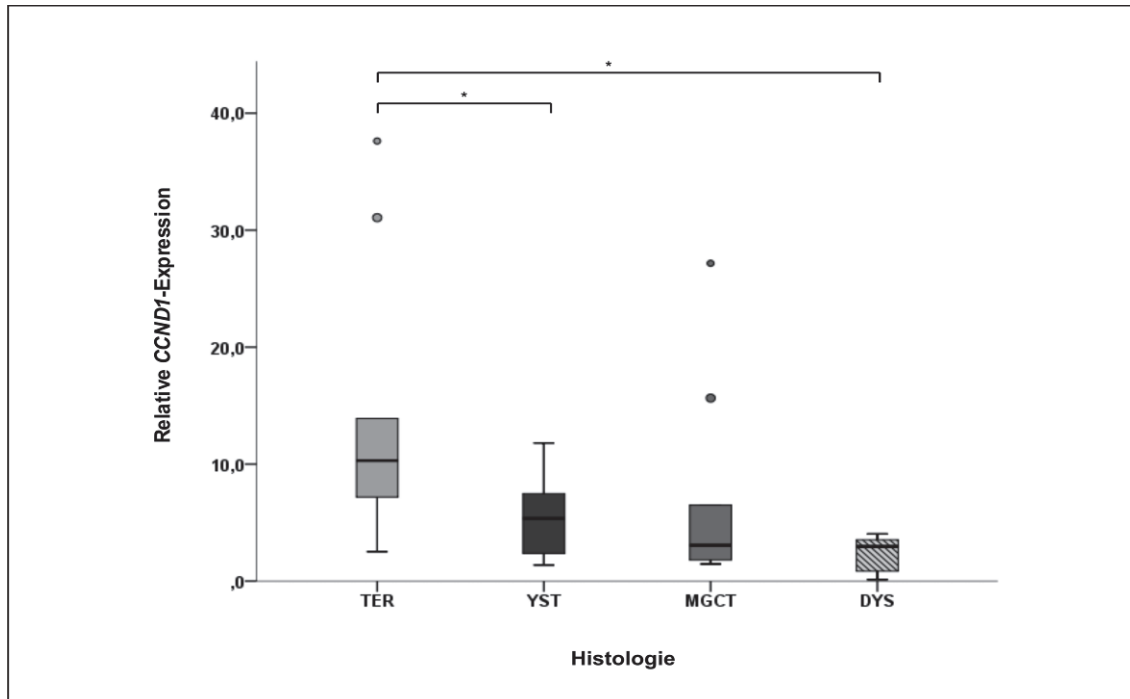


Abbildung 4.5: Relative CCND1-Expression in KZT.

Mittels quantitativer Real-Time PCR wurden Teratome (TER; n = 10), Dottersacktumoren (YST; n = 12), gemischte maligne KZT (MGCT; n = 9) und Dysgerminome (DYS; n = 5) analysiert. Die Normalisierung erfolgte gegen *18SrRNA*. Signifikante Expressionsunterschiede zwischen den Tumorentitäten werden durch Sterne markiert, Kreise stellen Ausreißer dar (Werte und Fälle siehe Text).

In der *c-MYC*-Real-Time PCR wurden TER (n = 10), YST (n = 13), MGCT (n = 5) und DYS (n = 6) analysiert. Die Gruppe der Teratome umfasste reife (n = 5) und unreife (n = 5) Teratome. Die logarithmisch transformierten Werte wurden gegen *POLR2A* und *GUSB* normalisiert. Auch hier wurde in der Gruppe der TER eine erhöhte mRNA-Expression gemessen (siehe Abbildung 4.6). Im Gegensatz zur *CCND1*-Expression konnte die geringste *c-MYC*-Expression für die Gruppe der YST ausgemacht werden. Signifikante Expressionsunterschiede bestanden zwischen TER und YST ($p = 0,000$), TER und MGCT ($p = 0,014$) sowie TER und DYS ($p = 0,009$). Bei den Ausreißern in Abbildung 4.6 handelt es sich um die Fälle #23 (TER; nicht aufgeführt), #9 (YST) und #U212 (DYS).

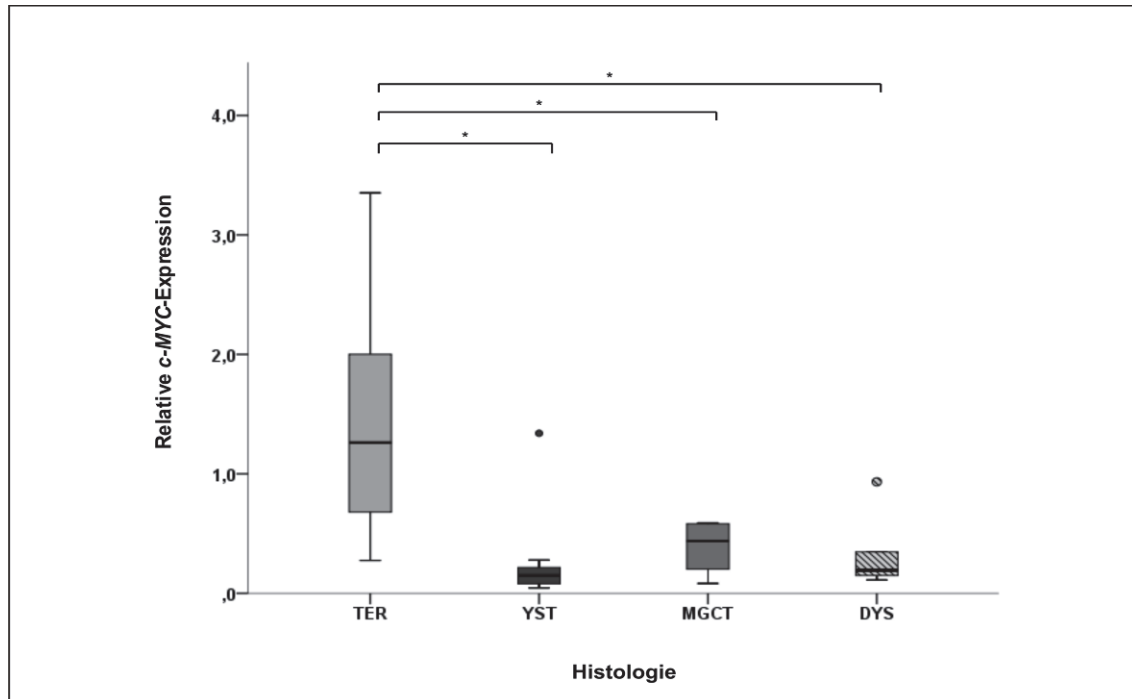


Abbildung 4.6: Relative c-MYC-Expression in KZT.

Mittels quantitativer Real-Time PCR wurden Teratome (TER; n = 10), Dottersacktumoren (YST; n = 13), gemischte maligne KZT (MGCT; n = 5) und Dysgerminome (DYS; n = 6) analysiert. Die Normalisierung erfolgte gegen *POLR2A* und *GUSB*. Signifikante Expressionsunterschiede zwischen den Tumorentitäten werden durch Sterne markiert, Kreise stellen Ausreißer dar (Werte und Fälle siehe Text).

4.2.4 Expressionsprofil des Membranrezeptors *FZD2*

FZD2 gehört zur Familie der Frizzled-Membran-Rezeptoren und dient als Rezeptor der Wnt-Moleküle (siehe Abschnitt 1.2). Eine hohe Expression dieses Rezeptors konnte u.a. in Brustkrebs beobachtet werden und lässt auf eine gesteigerte Wnt-Aktivität rückschließen (Milovanovic *et al.*, 2004). Ergänzend zu den mRNA-Untersuchungen an *CTNNB1* und den Zielgenen *CCND1* und *c-MYC* wurde daher auch der mRNA-Expressionsstatus von *FZD2* bestimmt.

In der *FZD2*-Real-Time PCR wurden Teratome (n = 10), Dottersacktumoren (n = 13), gemischte maligne KZT (n = 5) und Dysgerminome (n = 6) analysiert. Die Gruppe der Teratome umfasste dabei reife (n = 5) und unreife (n = 5) Teratome. Die logarithmisch transformierten Werte wurden gegen *POLR2A* und *GUSB* normalisiert. Entsprechend der *CTNNB1*-Expression zeigte sich für Dysgerminome die geringste *FZD2*-Expression, während Teratome und Dottersacktumoren *FZD2* deutlich höher exprimierten (siehe Abbildung 4.7). In der Gruppe der MGCT fiel der Ausreißer des Falls #6 durch eine abweichend hohe *FZD2*-Expression auf. Signifikante Expressionsunterschiede konnten zwischen Teratomen und Dysgerminomen ($p = 0,005$) sowie zwischen Dottersacktumoren und Dysgerminomen ($p = 0,001$) ausgemacht werden. Bei dem Ausreißer in der Gruppe der Dottersacktumoren handelt

es sich um den Fall #U45.

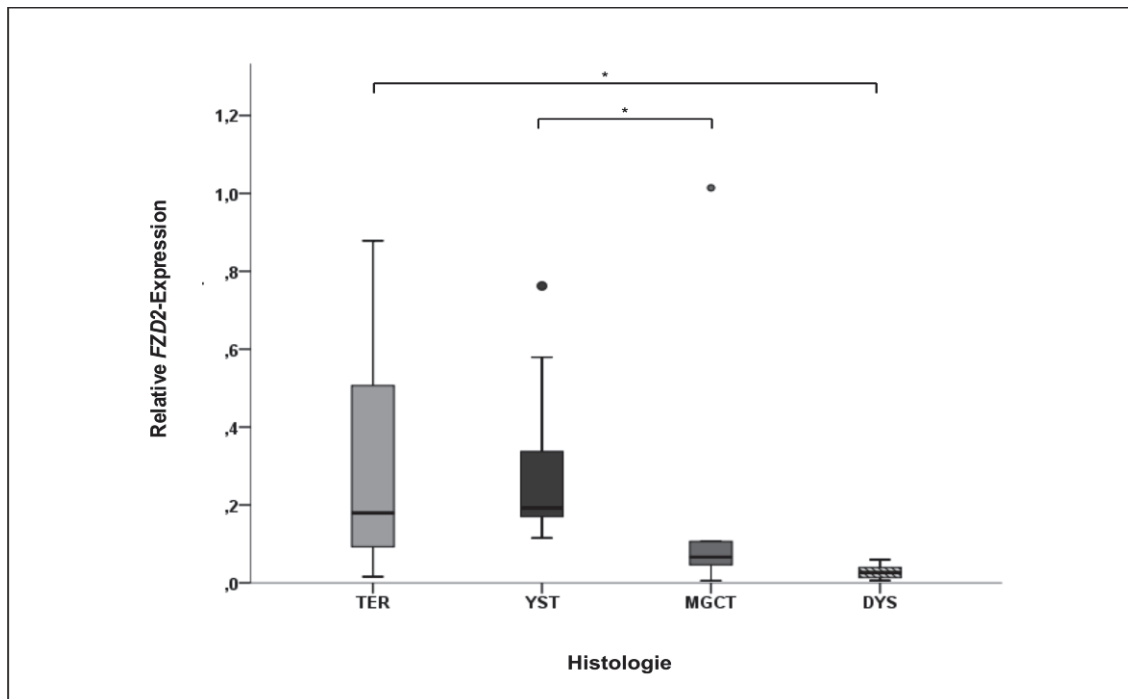


Abbildung 4.7: Relative FZD2-Expression in KZT.

Mittels quantitativer Real-Time PCR wurden Teratome (TER; n = 10), Dottersacktumoren (YST; n = 13), gemischte maligne KZT (MGCT; n = 5) und Dysgerminome (DYS; n = 6) analysiert. Die Normalisierung erfolgte gegen *POLR2A* und *GUSB*. Sterne markieren signifikante Expressionsunterschiede zwischen den Tumorentitäten, Ausreißer werden durch Kreise dargestellt (Werte und Fälle siehe Text).

4.3 Charakterisierung des Tumorsuppressors APC

Die aberrante, konstitutive Aktivierung des Wnt-Signalweges in Tumoren geht häufig mit dem Verlust der Tumorsuppressorfunktion von APC einher und führt zu einer Progression der Erkrankung (Miyaki *et al.*, 1994; Ryo *et al.*, 2001). Neben zahlreichen anderen Tumorentitäten konnte dies insbesondere für die Progression von benignen kolorektalen Adenomen zu malignen Karzinomen gezeigt werden (siehe Abschnitt 1.3.2). Da dieser Verlauf mit der Keimzelltumorphprogression vergleichbar ist, wurde APC im Rahmen der vorliegenden Arbeit umfassend charakterisiert.

4.3.1 Mutationsanalyse der *Mutation Cluster Region* im APC-Gen

Für die Aktivierung des Wnt-Signalweges in Kolonkarzinomen sind Mutationen im APC-Gen häufiger verantwortlich als Mutationen des *CTNNB1*-Gens (Morin *et al.*, 1997; Polakis *et al.*, 1999). Da in den Tumoren keine Mutationen im Exon 3 des *CTNNB1*-Gens nachgewiesen werden konnten (siehe Abschnitt 4.2.2), wurden Mutationsanalysen an APC durchgeführt, die sich auf die *Mutation Cluster Region*

(MCR), den „Hotspot“ der Mutationen, konzentrierten. Um das gesamte Spektrum möglicher Genmutationen erfassen zu können, wurden direkte Sequenzierungen dieser Region an Material von insgesamt 38 Tumoren unterschiedlicher Subentitäten (TER, n = 4; IT, n = 7; YST; n = 10; MGCT, n = 10; DYS; n = 7) durchgeführt.

In 19 Fällen (TER, n = 2; IT, n = 4; YST; n = 7; MGCT, n = 3; DYS; n = 3) konnte an bp-Position 4565 der Referenzsequenz NM_001127511.1 (NM 000038.4) der bekannte, homozygote SNP rs41115 (G => A) nachgewiesen werden, 18 Fälle (TER, n = 2; IT, n = 3; YST; n = 3; MGCT, n = 6; DYS; n = 4) wiesen den heterozygoten SNP rs41115 (G/A) auf. Ein Fall (#34) zeigte an der Position das normale, ancestrale Allel (G). Das auf mRNA-Ebene betroffene Triplet (ACG => ACA) codiert in beiden Fällen für die Aminosäure Threonin (Thr). Auf Proteinebene (NP_000029.2) findet demnach an Position 1493 kein Aminosäureaustausch statt; es handelt sich um eine stille Mutation. Die im Einzelnen untersuchten Tumoren können Tabelle 8.2 im Anhang entnommen werden. Abbildung 4.8 zeigt eine exemplarische Darstellung des SNP rs41115 innerhalb der MCR des APC-Gens.

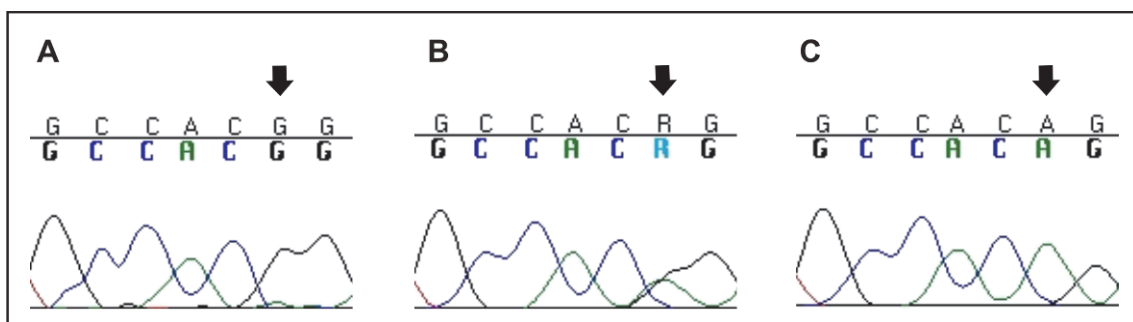


Abbildung 4.8: SNP rs41115 innerhalb der *Mutation Cluster Region* (MCR) des APC-Gens.

Sequenziert wurde die APC-MCR (UCSC: Chr. 5, 112175026 – 112176054, 1029 bp) an Material von insgesamt 38 Tumoren (TER, n = 4; IT, n = 7; YST; n = 10; MGCT, n = 10; DYS; n = 7). Der Pfeil markiert die Position 4565 (bp) mit (A) dem normalen, ancestralen Allel G, (B) dem heterozygoten SNP rs41115 G/A sowie (C) dem homozygoten SNP rs41115 G => A der Referenzsequenz NM_001127511.1.

4.3.2 *Protein Truncation Test* zur Identifizierung trunkierender Mutationen

Um APC in Ergänzung zu den MCR-Mutationsanalysen (siehe Abschnitt 4.3.1) auf Leserasterverschiebungen (Insertionen, Deletionen) oder *nonsense*-Mutationen zu untersuchen, die zu einem vorzeitigen Stop-Signal im Gentranskript führen können und damit in einem Carboxy-terminal trunkierten Protein resultieren, wurde der *Protein Truncation Test* (PTT) mit Primern aus der MCR-Region durchgeführt. Die hohe Sensitivität des Tests ermöglicht die Detektion einer veränderten Gen-Kopie vor einem Hintergrund von bis zu 40 Wildtyp-Gen-Kopien (Kahmann *et al.*, 2002).

Analysiert wurden reife (n = 3) und unreife (n = 7) Teratome, Dottersacktumoren (n = 10), gemischte maligne KZT (n = 9) und Dysgerminome (n = 7). In Abbildung 4.9

sind repräsentative Ergebnisse dargestellt. In allen Fällen wurde ausschließlich eine Bande auf Höhe der Wildtypbande von ~75 kD detektiert. Zusätzliche Banden, die den Hinweis auf ein trunziert vorliegendes Protein geben, waren nicht detektierbar. Die variierenden Bandenintensitäten resultieren aus unterschiedlichen Effizienzen der *in vitro* Transkription und Translation und können hinsichtlich des Resultats unberücksichtigt bleiben.

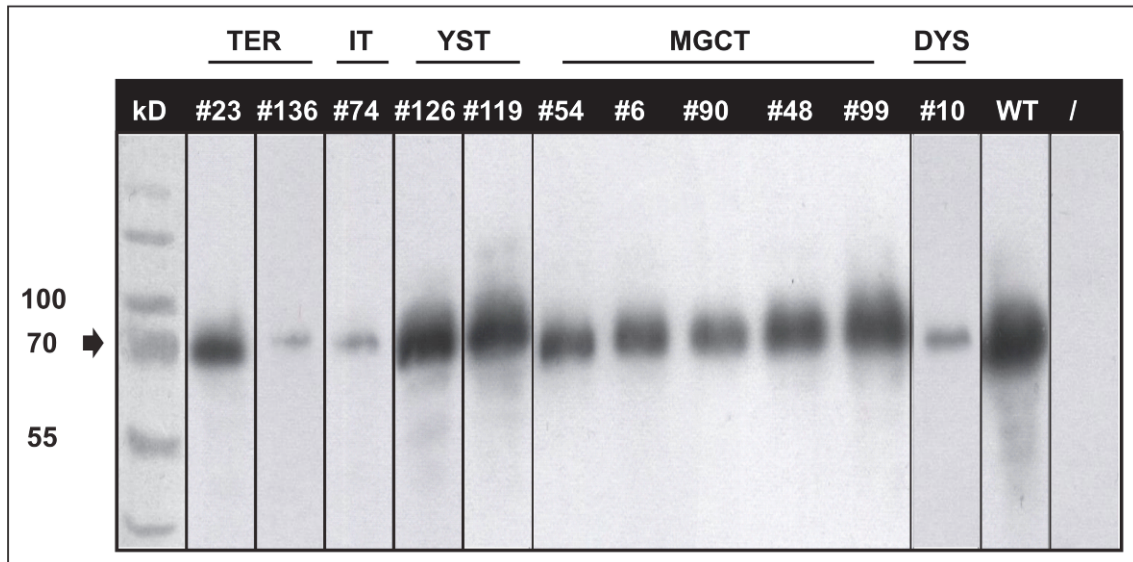


Abbildung 4.9: Mutationsanalyse des APC-Proteins in KZT.

Zum Test auf trunzierend wirkende Mutationen in APC wurde der Protein-Truncation-Test (PTT) an Teratomen (TER; n = 3; IT, n = 7), Dottersacktumoren (YST; n = 10), gemischten malignen KZT (MGCT; n = 9) und Dysgerminomen (DYS; n = 7) durchgeführt. Dargestellt sind exemplarisch die Ergebnisse für zwei TER, ein IT, zwei YST, fünf MGCT sowie ein DYS. Die Fälle sind mit Datenbank-Identnummern (#) codiert. Als Proteinmarker diente der PageRuler™ Prestained Protein Ladder. Der Pfeil markiert die Wildtypbande des APC-Proteins bei ~75 kD. WT, Wildtyp; /, Negativkontrolle. Abbildung verändert nach Okpanyi *et al.*, 2010.

4.3.3 Mikrosatellitenanalyse des APC-Locus auf Chromosom 5q

Deletionen, die zu einem Heterozygotieverlust (LOH) führen, sind als Ursache für den Funktionsverlust eines der beiden *APC*-Allele in Kolon- und Mammakarzinomen beschrieben worden (Esteller, 2000; Sarrio *et al.*, 2003). In Fällen, in denen zusätzlich zum Tumormaterial peripheres Blut als gesundes Keimbahnmaterial vorlag, wurden daher Mikrosatellitenanalysen der Chromosomenregion 5q21.1–5q23.1 mit acht lokusspezifischen Markern durchgeführt. Das *APC*-Gen ist auf 5q21–q22 (Entrez Gene; HGNC) bzw. 5q22.2 (Ensembl) lokalisiert. Marker D5S1965 sollte die zytogenetische Lage des Gens demnach exakt markieren.

Analysiert wurden reife (n = 1) und unreife Teratome (n = 2), Dottersacktumoren (n = 4), gemischte maligne KZT (n = 7) und Dysgerminome (n = 2). Die exemplarische Darstellung eines Allelverlustes (Mikrosatellitenmarker D5S2065, Tumor #119) kann der Abbildung 4.10 entnommen werden. Hier liegt zwischen peripherem Blut (A) und Tumorgewebe (B) ein Allel-Verhältnis (AR, allelic ratio) von 1,97 vor. Der Pfeil markiert

das in seinen Peakhöhen deutlich reduzierte zweite Allel.

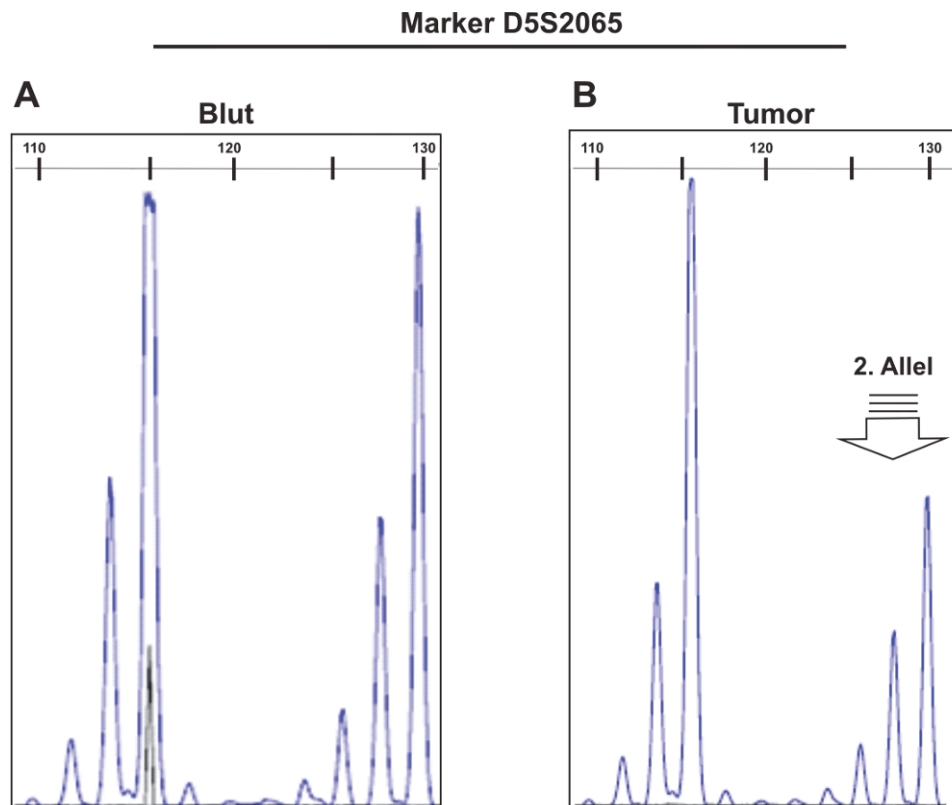


Abbildung 4.10: Mikrosatellitenanalyse der Chromosomenregion 5q22.3 des APC-Gens.

Darstellung eines Allelverlustes – nachgewiesen mit dem Mikrosatellitenmarker D5S2065 an Material des Patienten #119. Zwischen (A) peripherem Blut und (B) Tumorgewebe liegt ein Allel-Verhältnis (AR) von 1,97 vor. Der Pfeil markiert das in seinen Peakhöhen deutlich reduzierte zweite Allel, repräsentiert durch die drei beieinanderstehenden Peaks. Einheit in bp. Abbildung, dem Original entsprechend, nachträglich beschriftet.

Die im Einzelnen untersuchten Tumoren und ihre Ergebnisse an der jeweiligen Chromosomenposition werden in Abbildung 4.11 aufgeführt. Die Spalten repräsentieren die einzelnen Tumoren, wobei jede Zeile einem Marker zugeordnet ist. Ein Heterozyotieverlust wurde bei einem Verhältnis (AR, allelic ratio) von $<0,5$ und $>1,5$ angenommen (schwarzer Kasten), während bei einem AR von $0,5-0,8$ bzw. $1,2-1,5$ der Status nicht eindeutig definiert werden konnte (grauer Kasten). Die Aufrechterhaltung des heterozygoten Status lag bei einem AR von $0,8-1,2$ vor (weißer Kasten). Bei Markierung des Kastens als nicht-informativ (n.i.) handelt es sich um einen homozygoten Locus. Im Fall der nicht-auswertbaren Loci (n.a.) war in der Regel entweder eine PCR-Amplifikation nicht möglich oder den Analysen lagen unspezifische, nicht zu analysierende Chromatogramme zugrunde.

Marker	Position	TER		IT		YST				MGCT					DYS		
		23	89	76	34	119	63	4	19	111	51	90	48	99	54	31	33
D5S409	5q21.1	n.i.	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	n.a.
D5S433	5q21.2	n.i.	■	■	■	■	■	■	n.i.	■	■	n.i.	■	n.i.	n.i.	n.i.	n.a.
D5S82	5q21.3	■	■	■	n.a.	n.a.	n.i.	■	n.a.	■	n.a.	■	■	n.i.	■	n.i.	n.i.
D5S2501	5q22.1	■	■	■	■	■	■	■	■	n.i.	n.a.	■	n.a.	■	n.i.	■	■
D5S1965	5q22.2	n.i.	■	n.i.	n.i.	■	■	■	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	■	■	■	n.i.
D5S346	5q21-22	■	n.a.	n.i.	■	■	■	■	■	■	■	■	■	n.a.	n.a.	■	■
D5S2065	5q22.3	■	■	■	n.i.	■	n.i.	■	■	n.i.	n.i.	■	n.a.	n.a.	■	n.i.	n.a.
D5S592	5q23.1	■	■	■	n.a.	■	■	■	n.a.	n.a.	■	■	n.a.	n.i.	■	■	n.a.

Abbildung 4.11: Mikrosatellitenanalyse der Chromosomenregion 5q21.1–5q23.1 in KZT.

Unter Verwendung von acht Mikrosatellitenmarkern wurden Teratome (TER; n = 1; IT, n = 2), Dottersacktumoren (YST; n = 4), gemischte maligne KZT (MGCT; n = 7) und Dysgerminome (DYS; n = 2) auf Allelverluste der APC-Region auf Chromosom 5q analysiert. Spalten repräsentieren einzelne Tumoren. Jede Zeile ist einem Marker zuzuordnen. Die Tumorfälle sind mit Datenbank-Identnummern kodiert. Schwarze Kästen repräsentieren einen Heterozygotieverlust (LOH), graue Kästen einen nicht eindeutigen Status und weiße Kästen die Aufrechterhaltung des heterozygoten Status. Homozygote Loci wurden als nicht-informativ (n.i.) markiert, nicht auszuwertende Loci als nicht-auswertbar (n.a.). Abbildung verändert nach Okpanyi *et al.*, 2010.

Die analysierten reifen bzw. unreifen Teratome zeigten in allen drei Fällen an zwei, maximal an fünf der analysierten Marker einen Allelverlust an. Bemerkenswert war der Heterozygotieverlust des Tumorfalles #23, bei dem es sich um ein rezidiertes, reifes Teratom ohne vorausgegangene Chemotherapie handelt.

Von vier analysierten Dottersacktumoren zeigten drei einen eindeutigen oder möglichen Allelverlust an, während für Tumor #4 an allen Markerpositionen ein heterozygoter Status festgestellt werden konnte. Auch zwei der sieben gemischten malignen KZT (#19, DYS, CHC; #111, EC, IT, CHC) wiesen keinen Allelverlust auf, während die KZT #51, #90, #48, #99 und #54 an wenigstens zwei, maximal jedoch an fünf Markerpositionen einen Allelverlust zeigten. Im letztgenannten Fall (#54) handelt es sich um ein reines, hochmalignes Embryonales Karzinom. Die Aussage bezüglich eines Allelverlusts des Falls #99 sollte zurückhaltend betrachtet werden, da die Hälfte der Marker einen homozygoten Status anzeigte bzw. nicht auswertbar war. Marker D5S1965 zeigte jedoch ebenso wie D5S2501 einen heterozygoten Status an. Beide analysierten Dysgerminome zeigten keinen Verlust des untersuchten Allels.

In einem Großteil der Fälle wurde dem Marker D5S1965 ein konstitutionell-homozygoter Status zugeordnet, sodass über ein LOH an dieser Stelle keine Aussage getroffen werden konnte. Befanden sich jedoch unmittelbar links und rechts von diesem Marker eindeutig von einem Allelverlust betroffene Regionen (siehe u.a. Fälle #23 und #90), war von einem Allelverlust auch am APC-Locus auszugehen.

4.3.4 Methylierungsprofil der *APC*-Promotorregion

Die epigenetische Stilllegung von *APC* stellt in der Entwicklung von Kolonkarzinomen einen alternativen Mechanismus zum Funktionsverlust des Gens durch genetische Veränderungen dar (Esteller *et al.*, 2000; Koinuma *et al.*, 2006). Häufig sind epigenetische Veränderungen in einem Allel auch mit einem Verlust des anderen Allels (u.a. durch LOH) als „second hit“ assoziiert. In Ergänzung zu den vorangegangenen Untersuchungen wurden daher Methylierungsanalysen an der Promotorregion des *APC*-Gens durchgeführt.

Das Gen verfügt über zwei Promotoren, 1A und 1B, deren Aktivität in zwei verschiedenen Transkripten resultiert. Einer Regulation durch DNA-Methylierung unterliegt lediglich der *APC* 1A-Promotor (Tsuchiya *et al.*, 2000). Dieser war daher Gegenstand der Untersuchungen und wird im Folgenden als *APC*-Promotor bezeichnet.

In Abbildung 4.12, A, ist die *APC*-Promotorregion (U02509.1, 866 bp) mit einer CpG-Insel von 149 bp graphisch dargestellt. Der GC-Gehalt dieser Region liegt bei >50%, die untersuchte Region umfasst die Nukleotide 629–826 und beinhaltet insgesamt 19 CpG-Dinukleotide (CpGs), von denen die CpGs 6–9 in der methylierungsspezifischen PCR (MSP) analysiert wurden, während in der Bisulfidsequenzierung (BGS) der Methylierungsstatus aller CpGs bestimmt werden konnte (B).

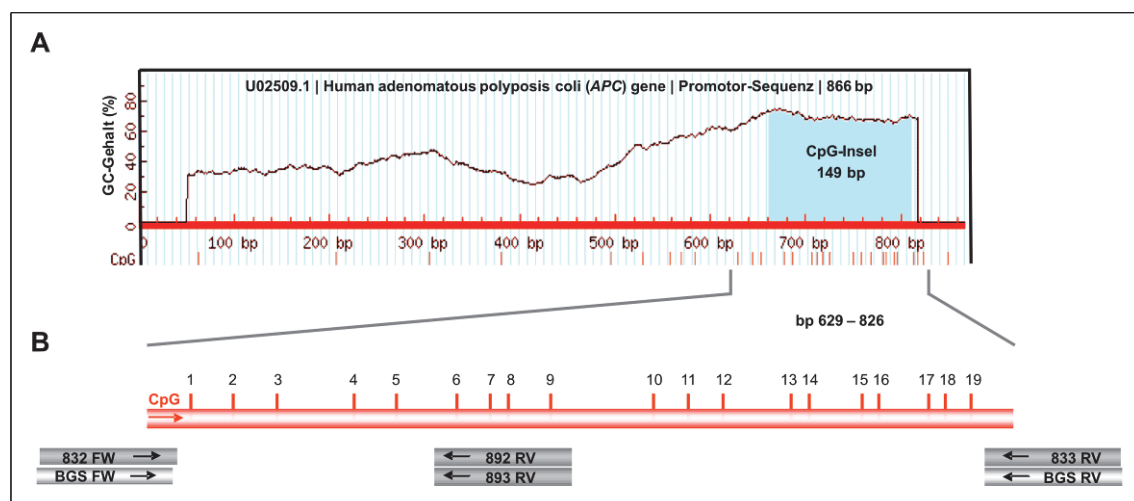


Abbildung 4.12: CpG-Insel innerhalb des *APC* 1A-Promotors.

(A) Schematisch dargestellt (verändert nach: MethPrimer, <http://www.urogene.org/methprimer/index1.html>) ist die *APC*-Promotorregion U02509.1 mit den analysierten CpG-Dinukleotiden innerhalb der CpG-Insel (149 bp; Kriterien: GC-Gehalt >50%, Inselgröße >100 bp, beobachtet/erwartet >0,60) des Promotors. (B) Der untersuchte Bereich umfasste insgesamt 19 CpGs. Vertikale, rote Striche repräsentieren die einzelnen CpGs; horizontale, graue Rechtecke stellen schematisch die Lage der für die methylierungsspezifische PCR (siehe Abschnitt 2.8.3) bzw. die Bisulfidsequenzierung (siehe Abschnitt 2.8.4) verwendeten Primerpaare dar.

4.3.4.1 Methylierungsstatus

Um in einem ersten Screening zunächst den Methylierungsstatus der APC-Promotorregion in unterschiedlichen KZT-Entitäten zu ermitteln, wurden die CpGs 6–9 (s.o.) mittels methylierungsspezifischer PCR (MSP) analysiert. Diese wurde an reifen (n = 4) und unreifen (n = 7) Teratomen, Dottersacktumoren (n = 12), gemischten malignen KZT (n = 10) und Dysgerminomen (n = 9) durchgeführt.

In Abbildung 4.13 sind exemplarisch die Ergebnisse für reife und unreife Teratome (A), Dottersacktumoren (B) sowie Dysgerminomen (C) dargestellt. Die Ergebnisse für gemischte maligne KZT sind nicht aufgeführt. Eine Übersicht über alle analysierten Tumoren und ihre Ergebnisse kann der schematischen Darstellung der Abbildung 8.1 (siehe Anhang) entnommen werden. Eine Methylierung der Promotorregion konnte für reife (2/4) und unreife (6/7) Teratome, Dottersacktumoren (10/12) und gemischte maligne KZT (7/10) nachgewiesen werden (siehe M-MSP). Dysgerminome zeigten in keinem Fall eine Methylierung (0/9). Die in allen Fällen nachweisbaren Banden der U-MSP sind auf Anteile nicht-maligner Stromazellen in den Proben zurückzuführen.

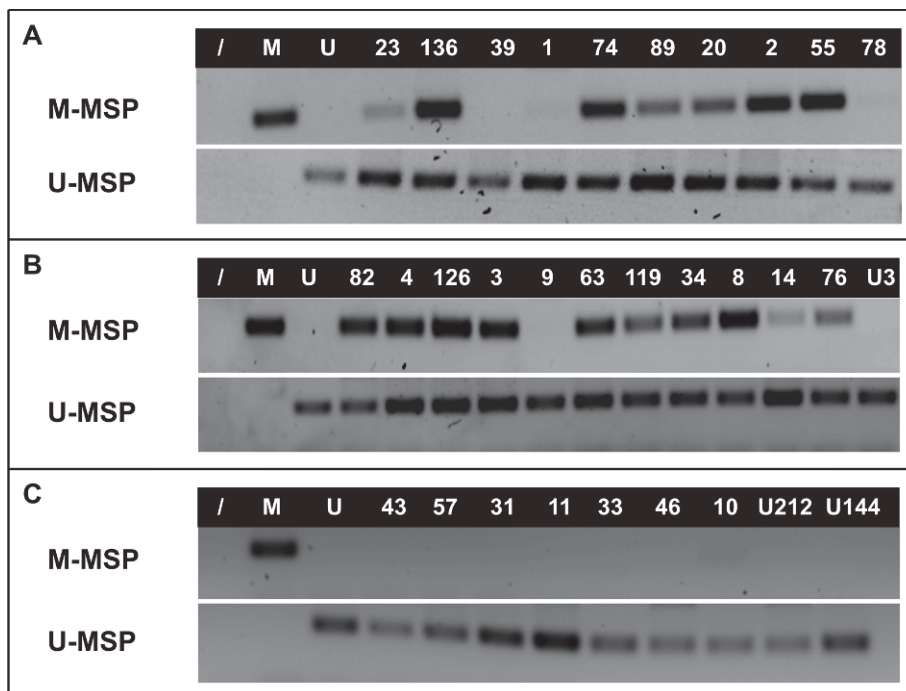


Abbildung 4.13: Methylierungsstatus des APC 1A-Promotors in KZT.

Mittels methylierungsspezifischer PCR wurden Teratome (TER; n = 4; IT, n = 7), Dottersacktumoren (YST; n = 12), gemischte maligne KZT (MGCT; n = 10; hier nicht aufgeführt) und Dysgerminome (DYS; n = 9) analysiert. Exemplarisch dargestellt sind hier die Ergebnisse für (A) TER und IT, (B) YST sowie (C) DYS. Die Fälle sind mit ihren Datenbank-Identnummern codiert. M, Positivkontrolle, universal-methylierte DNA; M-MSP, PCR mit Primern, die spezifisch an methylierte Bereiche binden; U, Positivkontrolle, nicht-methylierte DNA; U-MSP, PCR mit Primern, die spezifisch an nicht-methylierte Bereiche binden; /, Negativkontrolle. Abbildung verändert nach Okpanyi *et al.*, 2010.

Fall #76 wird in Abbildung 4.13 unter Dottersacktumoren aufgeführt, wurde in dieser wie in allen anderen Analysen jedoch aufgrund nachträglicher referenzpathologischer Begutachtung bedingt durch den geringen Dottersacktumor-Anteil unter reifen bzw. unreifen Teratomen geführt.

4.3.4.2 Methylierungsgrad

Zur ergänzenden Quantifizierung der *APC*-Promotormethylierung wurden die Analysen um die Bisulfitsequenzierung erweitert. Die Untersuchung mehrerer Klone eines Tumorfalles erstellt dabei ein repräsentatives Gesamtbild an allen 19 CpGs.

Sequenziert wurden Teratome (n = 10), Dottersacktumoren (n = 10), gemischte maligne KZT (n = 9) und Dysgerminome (n = 7). Die Gruppe der Teratome umfasste reife (n = 3) und unreife (n = 7) Teratome. In Abbildung 4.14 sind exemplarisch die Sequenzen (A) und Chromatogramme (B) mehrerer, gegen die bisulfitmodifizierte Version der *APC*-Referenz (GenBank U02509.1) alignierten, Klone des Tumorfalles #122 dargestellt.

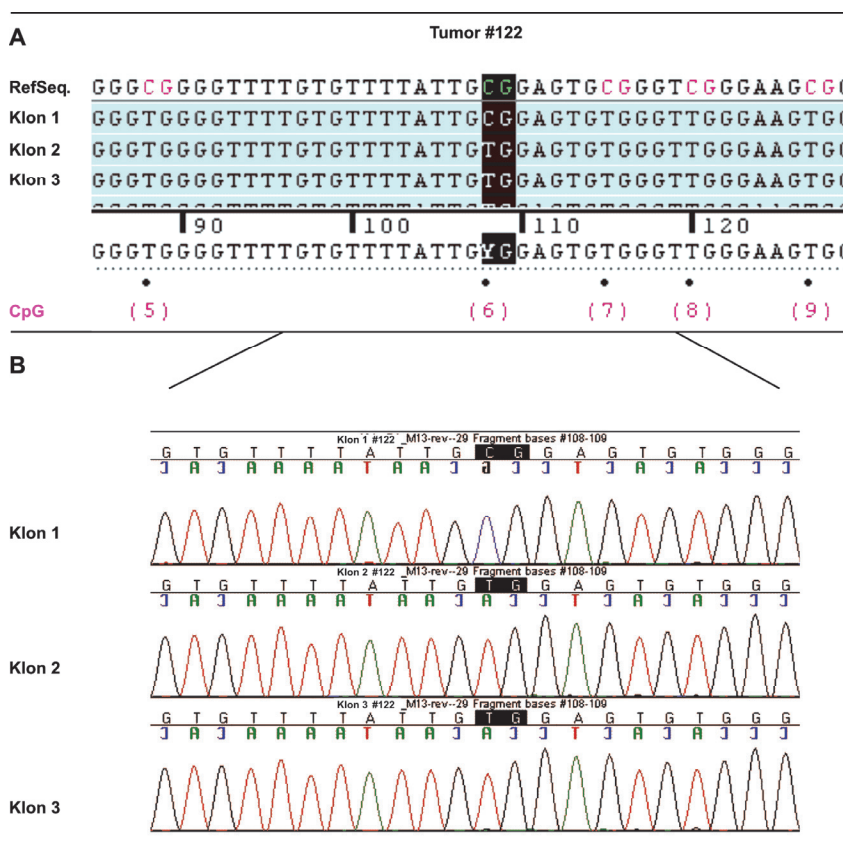


Abbildung 4.14: Methylierungsstatus des *APC* 1A-Promotors im Fall #122.

(A) Das Sequencher®-Alignment von drei bisulfitsequenzierten Klonen des Tumorfalles #122 stellt den Bereich der CpGs 5–9 (violett markiert) des *APC* 1A-Promotorbereichs dar. (B) Das Chromatogramm der Sequenzen stellt den Bereich der CpGs 6 und 7 dar, wobei CpG 6 schwarz unterlegt ist und für Klon 1 einen methylierten Status, für die Klone 2 und 3 einen nicht-methylierten Status widerspiegelt. CpG, CpG-Dinukleotid; RefSeq., Referenzsequenz.

Zur Erstellung eines *Dot*-Diagramms wurde der Methylierungsstatus jedes CpGs nach Auswertung der Chromatogramme farblich codiert. *Dot*-Diagramme wurden für alle analysierten Fälle erstellt, werden aufgrund ihres Umfangs hier jedoch nicht aufgeführt. Die im Einzelnen untersuchten Tumoren und ihre Ergebnisse können Abbildung 8.1 im Anhang entnommen werden. Sie werden dort den Ergebnissen der *APC*-MSP (sowie den Ergebnissen der *DKK1*- und *SFRP2*-MSP) gegenübergestellt. In Abbildung 4.15 sind exemplarisch die Ergebnisse der analysierten Klone der Fälle #43 (A) und #119 (B) dargestellt. Der untersuchte *APC*-Promotorbereich zeigt sich im Fall des Dysgerminoms #43 mit 1,3% nahezu unmethyliert, während der Promotor des Dottersacktumors #119 zu 82% methyliert vorliegt.

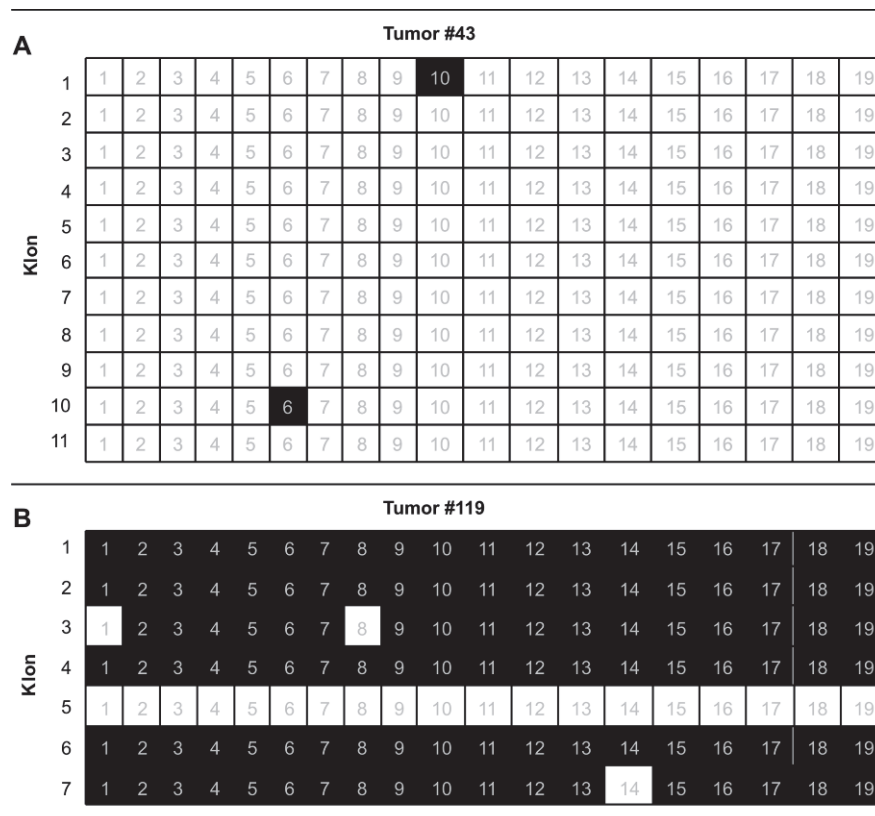


Abbildung 4.15: Methylierungsstatus des APC 1A-Promotors der Fälle #43 und #119.

Die *Dot*-Diagramme stellen exemplarisch den mittels Bisulfitsequenzierung ermittelten Methylierungsstatus (A) der 11 Klone des Dysgerminoms #42 bzw. (B) der 7 Klone des Dottersacktumors #119 dar. Jede Reihe repräsentiert einen sequenzierten Klon, jede Spalte repräsentiert ein CpG. Die Zahlen innerhalb der Quadrate kennzeichnen das entsprechende CpG (siehe auch Abbildung 4.12). Schwarze Quadrate stellen einen methylierten, weiße Quadrate einen nicht-methylierten Status des jeweiligen CpGs dar.

Die Ergebnisse der Bisulfitsequenzierung wurden in einem *Box-Plot* zusammengefasst (siehe Abbildung 4.16). In der Gruppe der Dottersacktumoren wurde ein im Vergleich zu den anderen Entitäten signifikant erhöhter Promotormethylierungsgrad deutlich (TER und YST, $p = 0,002$; YST und MGCT, $p = 0,003$; YST und DYS, $p = 0,001$). Teratome und Dysgerminome wiesen einen nahezu vollständig unmethylierten Promotorbereich auf. Bei den Ausreißern handelt es sich um die Fälle #74 (TER; 68%) und 6# (MGCT; 51%).

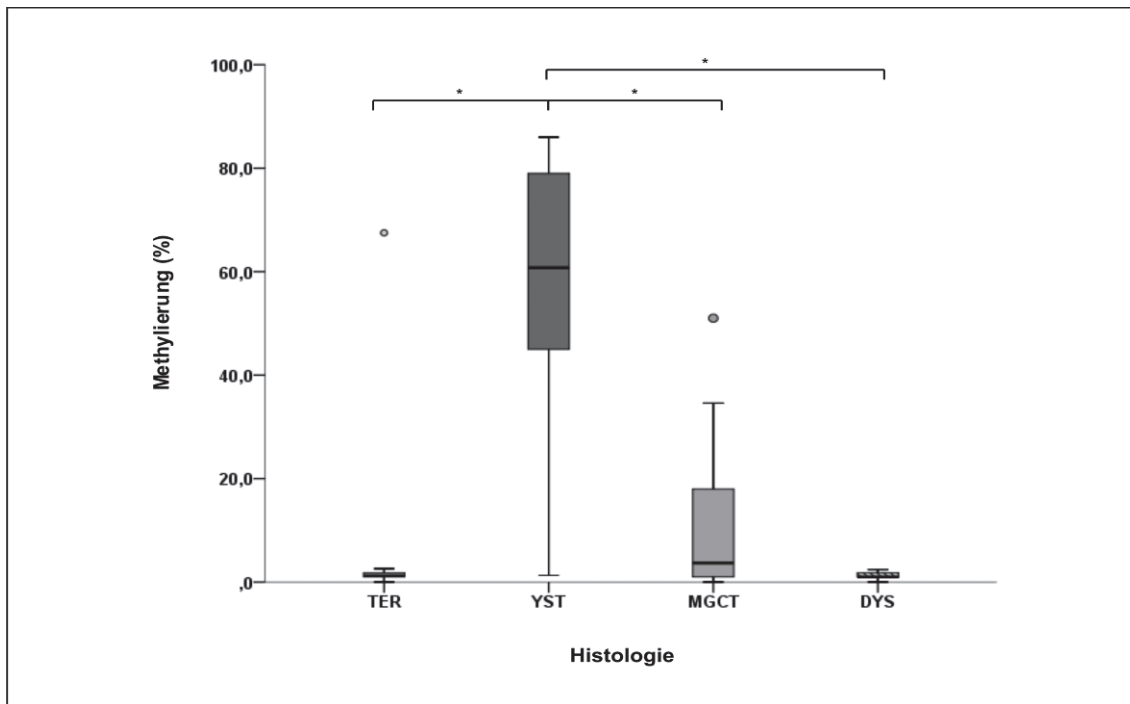


Abbildung 4.16: Methylierungsgrad des APC 1A-Promotors in KZT.

Mittels Bisulfitsequenzierung wurden Teratome (TER; $n = 10$), Dottersacktumoren (YST; $n = 10$), gemischte maligne KZT (MGCT; $n = 9$) und Dysgerminome (DYS; $n = 7$) analysiert. Signifikante Expressionsunterschiede zwischen den Tumorentitäten werden durch Sterne markiert, Kreise stellen Ausreißer dar (Werte und Fälle siehe Text). Abbildung verändert nach Okpanyi *et al.*, 2010.

Um einen Zusammenhang zwischen dem Alter der Patienten bei Diagnosestellung, ihrer Tumorphistologie und der Promotormethylierung herzustellen, wurden die Ergebnisse der Bisulfitsequenzierung in entsprechenden Gruppen (siehe Tabelle 4.2) zusammengefasst.

In der Gruppe der Säuglinge bzw. Kleinkinder (0–7 Jahre) weisen fünf der sieben analysierten Dottersacktumoren eine Promotorhypermethylierung (>66%) auf. Bei Kindern bzw. Jugendlichen (≥ 8 Jahre) ist dies nur für eines (#74; s.o.) der vier Teratome der Fall. Gemischte maligne KZT wie auch Dottersacktumoren dieser Gruppe sind lediglich gering methyliert (MGCT, MW = 12,9%; YST, MW = 17,1%). Dysgerminome, wie auch Teratome bei Säuglingen bzw. Kleinkindern, zeigen sich mit einem Mittelwert von jeweils 1,3% nahezu unmethyliert. Teratome der Kinder bzw. Jugendlichen liegen mit einem Mittelwert von 17,8% deutlich stärker methyliert vor.

Tabelle 4.2. Bisulfitsequenzierung des APC 1A-Promotors.

Aufgeführt ist die Promotormethylierung (%), zusammengefasst in Gruppen mit geringer (<33%), mittlerer (33-66%) und hoher (>66%) Methylierung. Das Tumormaterial wurde anhand des Alters der Patienten bei Diagnosestellung (Säuglinge und Kleinkinder, 0–7 Jahre; Kinder und Jugendliche, ≥ 8 Jahre) sowie der Histologie in Gruppen eingeteilt. Detaillierte Ergebnisse mit Einzelwerten können Abbildung 8.1 des Anhangs entnommen werden. MW, Mittelwert; SD, Standardabweichung in %.

Alter	n	Histologie		Promotormethylierung				
				< 33%	33-66%	> 66%	MW (%)	SD (+/-)
0–7 Jahre	24	TER	TER	5	-	-	1,3	0,9
		MGCT	TER + YST	1	1	-	23	31,1
			YST	-	2	5	68,3	15,1
≥ 8 Jahre	26	TER	TER	3	-	1	17,8	33,2
		Nicht-Germinome	MGCT	7	2	-	12,9	18,4
			YST	1	1	-	17,1	22,4
		Germinome	DYS	7	-	-	1,3	0,8

4.3.5 Expressionsprofil des APC-Gens

Die Expression von *APC* ist häufig mit dem Methylierungsstatus des Promotorbereichs korreliert (Jin *et al.*, 2001; Sarrío *et al.*, 2003; Dulaimi *et al.*, 2004). Um den Einfluss der *APC*-Methylierung (siehe Abschnitt 4.3.4) sowie des Allelverlustes (siehe Abschnitt 4.3.3) auf die Expression des Gens zu untersuchen, wurde ein *APC* mRNA-Expressionsprofil erstellt.

In der *APC*-Real-Time PCR wurden Teratome (n = 8), Dottersacktumoren (n = 12), gemischte maligne KZT (n = 9) und Dysgerminome (n = 5) analysiert. Die Gruppe der Teratome umfasste reife (n = 4) und unreife (n = 4) Teratome. Die logarithmisch transformierten Werte wurden gegen *18SrRNA* normalisiert und zwecks Darstellung mit 10^5 multipliziert. Dabei konnten für die Subentitäten keine signifikanten Expressionsunterschiede ausgemacht werden (siehe Abbildung 4.17). Bei den Ausreißern in Abbildung 4.17 handelt es sich um die Fälle #55 (TER), #10 (DYS) und #57 (DYS). Die *APC*-Methylierung (siehe 4.3.4.2) korrelierte nicht-signifikant mit der *APC*-Expression (n = 32; Korrelation nach Pearson, $p = 0,041$; Signifikanz, $p = 0,824$).

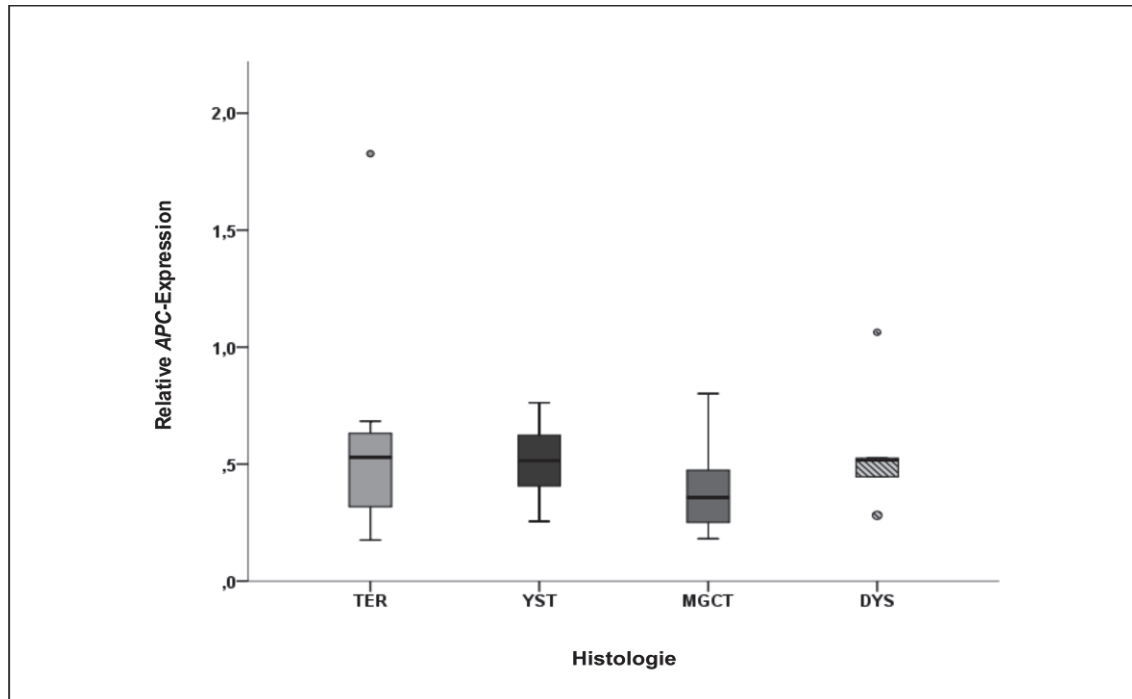


Abbildung 4.17: Relative APC-Expression in KZT.

Mittels quantitativer Real-Time PCR wurden Teratome (TER; n = 8), Dottersacktumoren (YST; n = 12), gemischte maligne KZT (MGCT; n = 9) und Dysgerminome (DYS; n = 5) analysiert. Die Gruppe der Teratome umfasste dabei reife (n = 4) und unreife (n = 4) Teratome. Die Normalisierung erfolgte gegen *18SrRNA*. Ausreißer werden durch Kreise dargestellt (Werte und Fälle siehe Text). Abbildung verändert nach Okpanyi *et al.*, 2010.

4.4 Komponenten des Degradationskomplexes

Für die konstitutive Aktivierung des Wnt-Signalweges können neben APC auch Veränderungen in anderen Regulatoren des β -Catenin-Degradationskomplexes verantwortlich sein (siehe Abschnitt 1.3). Zur Identifizierung von Kandidaten wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit Expressionsprofile einiger Komponenten erstellt.

4.4.1 Expressionsprofil der *AXIN1*- und *AXIN2*-Gene

Prominente Mitglieder des β -Catenin-Degradationskomplexes stellen die Gerüstproteine AXIN1 sowie das Homolog AXIN2 (Syn. Conductin) dar. Mutationen in ihren Genen können zu ihrer Inaktivierung und damit zu einer Prädisposition für Kolonkarzinome führen (Lammi *et al.*, 2004) (siehe Abschnitt 1.3).

In den mittels quantitativer Real-Time PCR durchgeführten Analysen an *AXIN1* und *Conductin* waren jeweils Teratome (n = 10), Dottersacktumoren (n = 13), gemischte maligne KZT (n = 5) und Dysgerminome (n = 6) eingeschlossen. Die Gruppe der Teratome umfasste jeweils reife (n = 5) und unreife (n = 5) Teratome. Die logarithmisch transformierten Werte wurden gegen *POLR2A* und *GUSB* normalisiert

und zwecks Darstellung mit 10 multipliziert.

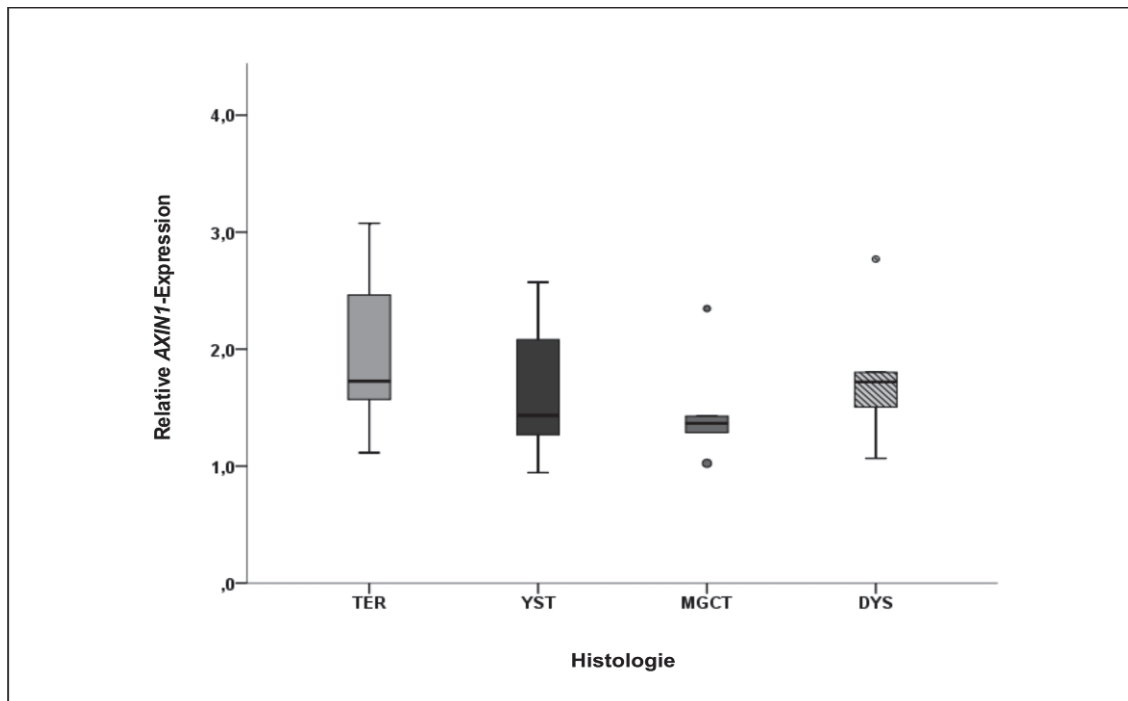


Abbildung 4.18: Relative AXIN1-Expression in KZT.

Mittels quantitativer Real-Time PCR wurden Teratome (TER; n = 10), Dottersacktumoren (YST; n = 13), gemischte maligne KZT (MGCT; n = 5) und Dysgerminome (DYS; n = 6) analysiert. Die Normalisierung erfolgte gegen *POLR2A* und *GUSB*. Ausreißer werden durch Kreise dargestellt (Werte und Fälle siehe Text).

Für die mRNA-Expression von *AXIN1* zeigten sich keine signifikanten Expressionsunterschiede zwischen den Subentitäten (siehe Abbildung 4.18). Bei den Ausreißern in der Abbildung handelt es sich um die Fälle #51 (MGCT), #54 (MGCT) und #10 (DYS).

Für die mRNA-Expression von *Conductin* zeigte sich in der Gruppe der gemischten malignen KZT eine im Vergleich zu den anderen Entitäten deutlich verringerte Expression (siehe Abbildung 4.19). Teratome und Dottersacktumoren wiesen signifikant erhöhte Expressionslevel auf (TER und MGCT, $p = 0,020$; YST und MGCT, $p = 0,016$). Ein signifikanter Unterschied bestand ebenfalls zwischen gemischten malignen KZT und Dysgerminomen ($p = 0,045$). Auffällig ist die hohe *Conductin*-Expression für den Fall #63 (YST). Bei den weiteren Ausreißern in Abbildung 4.19 handelt es sich um die Fälle #51 (MGCT) und #54 (MGCT).

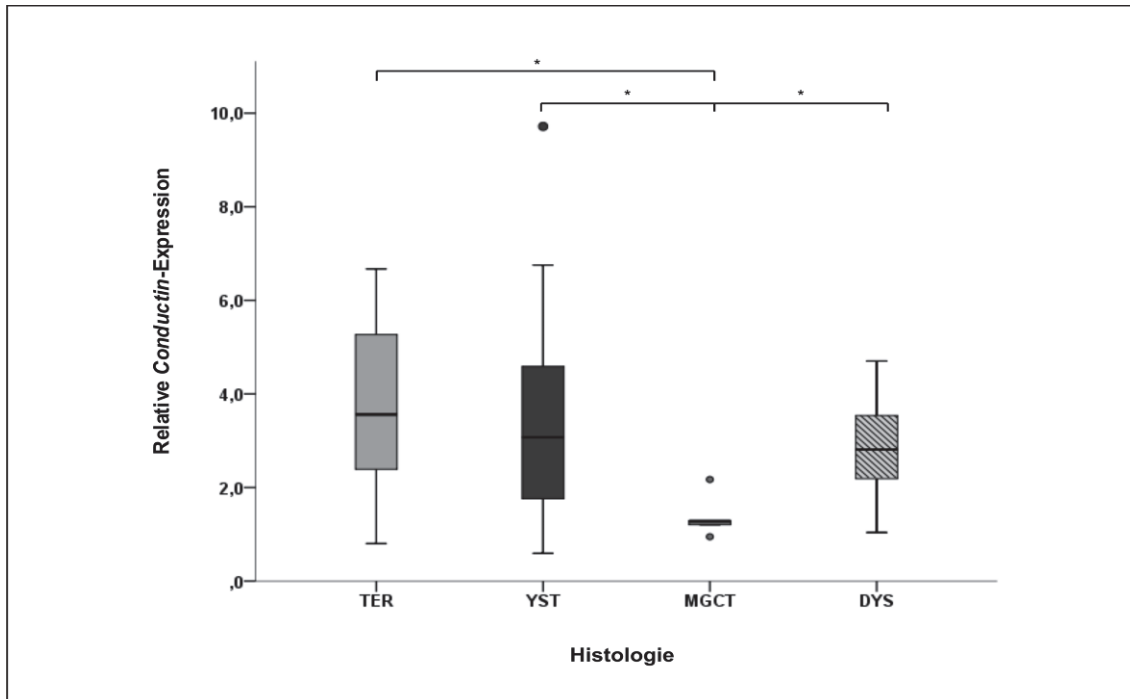


Abbildung 4.19: Relative *Conductin*-Expression in KZT.

Mittels quantitativer Real-Time PCR wurden Teratome (TER; n = 10), Dottersacktumoren (YST; n = 13), gemischte maligne KZT (MGCT; n = 5) und Dysgerminome (DYS; n = 6) analysiert. Die Normalisierung erfolgte gegen *POLR2A* und *GUSB*. Sterne markieren signifikante Expressionsunterschiede zwischen den Tumorentitäten, Ausreißer werden durch Kreise dargestellt (Werte und Fälle siehe Text).

4.4.2 Expressionsprofil des *GSK3β*-Gens

Da eine Inaktivierung der hochkonservierten, konstitutiven Glykogen Synthase Kinase 3β (*GSK3β*) u.a. eine verminderte bzw. ausbleibende β-Catenin-Destabilisierung zur Folge haben kann (Yost *et al.*, 1996), war *GSK3β* als eine weitere Komponente des β-Catenin-Degradationskomplexes ebenfalls Ziel der Untersuchungen.

Mittels quantitativer Real-Time PCR wurde das mRNA-Expressionsprofil von *GSK3β* ermittelt. Analysiert wurden Teratome (n = 9), Dottersacktumoren (n = 12), gemischte maligne KZT (n = 9) und Dysgerminome (n = 5). Die Gruppe der Teratome umfasste reife (n = 5) und unreife (n = 4) Teratome. Die logarithmisch transformierten Werte wurden gegen *18SrRNA* normalisiert und zwecks Darstellung mit 10^5 multipliziert. Dabei zeigten sich keine signifikanten Expressionsunterschiede zwischen den Tumor-Subentitäten (siehe Abbildung 4.20). Bei einem Ausreißer handelt es sich um den Fall #23 (TER; nicht dargestellt).

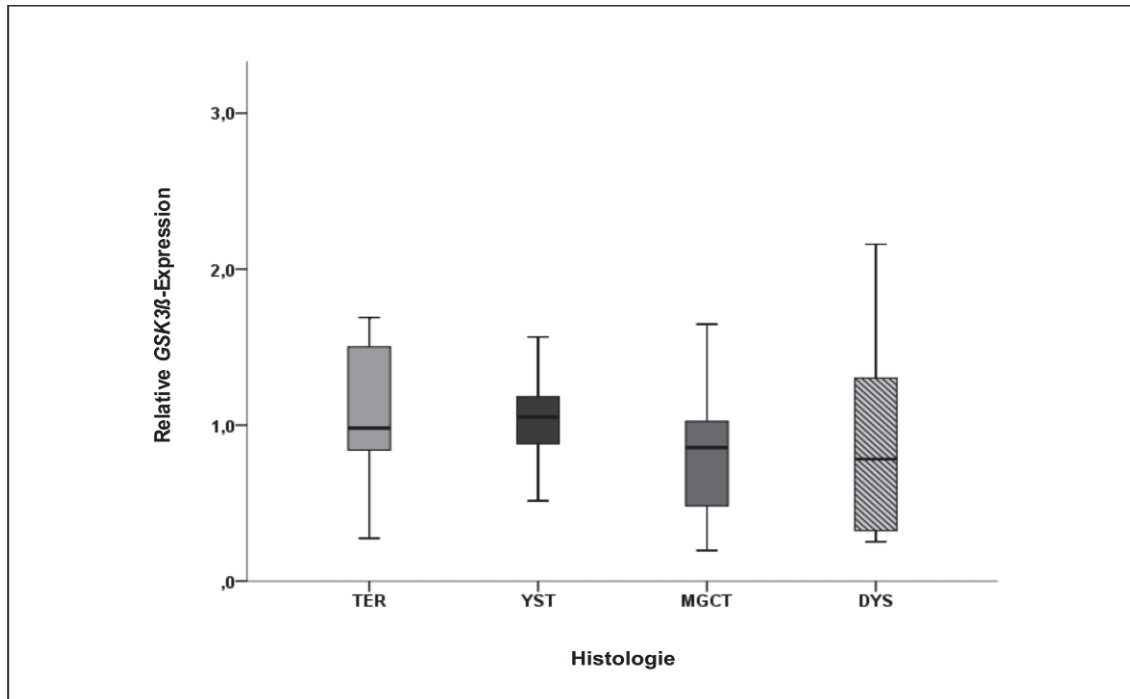


Abbildung 4.20: Relative GSK3 β -Expression in KZT.

Mittels quantitativer Real-Time PCR wurden Teratome (TER; n = 9), Dottersacktumoren (YST; n = 12), gemischte maligne KZT (MGCT; n = 9) und Dysgerminome (DYS; n = 5) analysiert. Die Normalisierung erfolgte gegen *18SrRNA*.

4.4.3 Mutationsanalyse der kodierenden Region des *WTX*-Gens

Bei *WTX* (Wilms tumor gene on the X chromosome) handelt es sich um eine jüngst entdeckte Komponente des β -Catenin-Degradationskomplexes (Major *et al.*, 2007). Durch den Prozess der X-Chromosom-Inaktivierung sowie dem Fehlen eines Homologs auf dem Y-Chromosom handelt es sich bei *WTX* um einen *single-copy*-Tumorsuppressor. Mutationen in einem Allel bzw. der Verlust des Allels können ausreichend sein, um eine Tumorentstehung oder -progression zu begünstigen (siehe Abschnitt 1.3).

Zunächst wurde daher der Mutationsstatus von *WTX* bestimmt. Dazu wurde die gesamte Konsensussequenz (CCDS, 14377.2, 3408 bp) des Gens (ENSG00000184675; Transkript, ENST00000330258, 8443 bp) nach PCR-Amplifikation der genomischen Tumor-DNA sequenziert. Insgesamt wurden 41 Patientenproben, darunter reife (n = 6) und unreife (n = 8) Teratome, Dottersacktumoren (n = 11), gemischte maligne KZT (n = 9) sowie Dysgerminome (n = 7) analysiert. Die im Einzelnen untersuchten Fälle können Tabelle 8.2 im Anhang entnommen werden. Mutationen konnten nicht nachgewiesen werden (Ergebnisse nicht dargestellt).

4.4.4 Expressionsprofil des *WTX*-Gens

Da es sich bei der Inaktivierung von *WTX* um ein häufig zu beobachtendes Ereignis in Tumoren, insbesondere den Wilms-Tumoren, handelt (siehe Abschnitt 1.3) und die Inaktivierung mit deregulierten Expressionsleveln assoziiert ist, wurde in Ergänzung zu den Mutationsanalysen (siehe Abschnitt 4.4.3) das mRNA-Expressionsprofil des *WTX*-Gens erstellt.

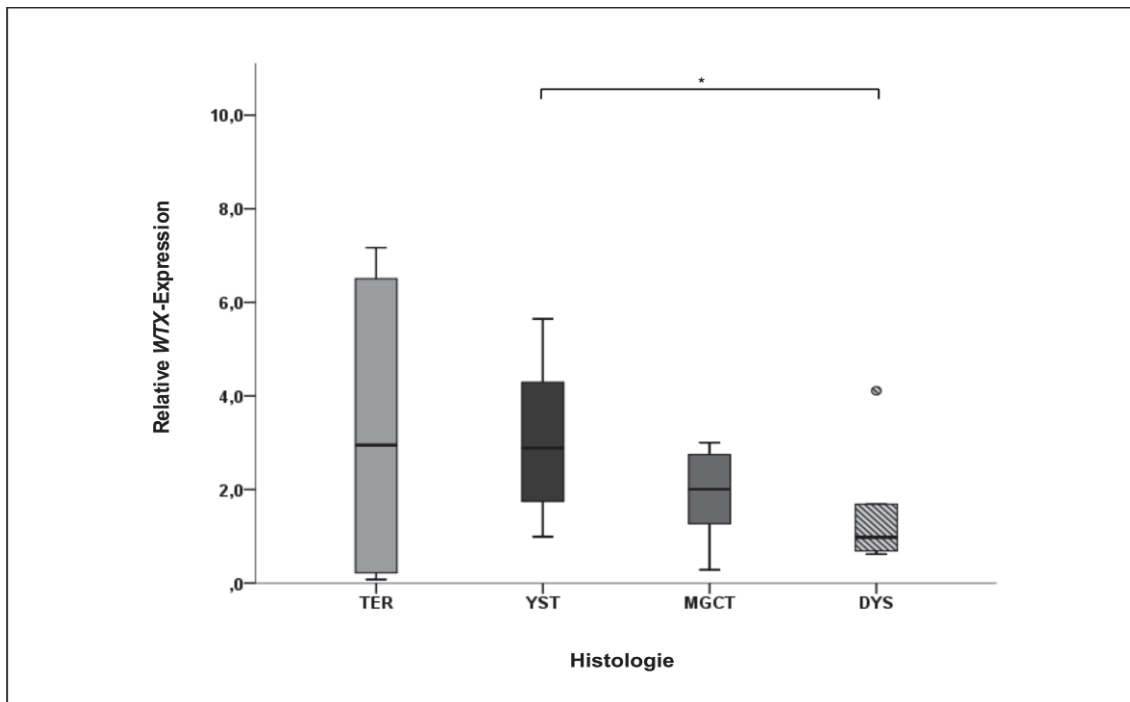


Abbildung 4.21: Relative *WTX*-Expression in KZT.

Mittels quantitativer Real-Time PCR wurden Teratome (TER; n = 10), Dottersacktumoren (YST; n = 13), gemischte maligne KZT (MGCT; n = 9) und Dysgerminome (DYS; n = 6) analysiert. Die Normalisierung erfolgte gegen *18SrRNA*. Der signifikante Expressionsunterschied zwischen den Tumorentitäten wird durch den Stern markiert, der Kreis stellt einen Ausreißer dar (Wert und Fall siehe Text).

Mittels quantitativer Real-Time PCR wurden Teratome (n = 10), Dottersacktumoren (n = 13), gemischte maligne KZT (n = 9) und Dysgerminome (n = 6) analysiert. Die Gruppe der Teratome umfasste reife (n = 6) und unreife (n = 4) Teratome. Die logarithmisch transformierten Werte wurden gegen *18SrRNA* normalisiert und zwecks Darstellung mit 10^6 multipliziert. Dabei zeigte sich die höchste *WTX*-Expression in Dottersacktumoren und Teratomen (siehe Abbildung 4.21), während Dysgerminome das niedrigste Expressionslevel aufwiesen. Signifikante Expressionsunterschiede konnten zwischen Dottersacktumoren und Dysgerminomen ($p = 0,023$) ausgemacht werden. Bei den Ausreißern in Abbildung 4.21 handelt es sich um die Fälle #23 (TER; nicht dargestellt), #90 (MGCT; nicht dargestellt) und #10 (DYS).

4.5 Charakterisierung weiterer intrazellulärer Wnt-Regulatoren

An der Regulation des Wnt-Signalweges sind zahlreiche weitere intrazelluläre Moleküle beteiligt. Diese umfassen sowohl Antagonisten als auch Agonisten der Signalkaskade. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden einige Regulatoren, die im Zusammenhang mit einer aberranten Aktivierung des Signalweges beschrieben wurden, hinsichtlich ihres Expressionsprofils analysiert.

4.5.1 Expressionsprofil des *HRAS*-Gens

Der Umsatz des endogenen wie auch des überexprimierten H-RAS-Proteins (*HRAS*) wird u.a. über den Wnt-Signalweg, durch *AXIN* und *APC*, kontrolliert (Kim *et al.*, 2009). Zur Feststellung einer möglichen Beteiligung der RAS-Onkogenfamilie an der Pathogenese von KZT wurde das mRNA-Expressionsprofil des *HRAS*-Gens ermittelt.

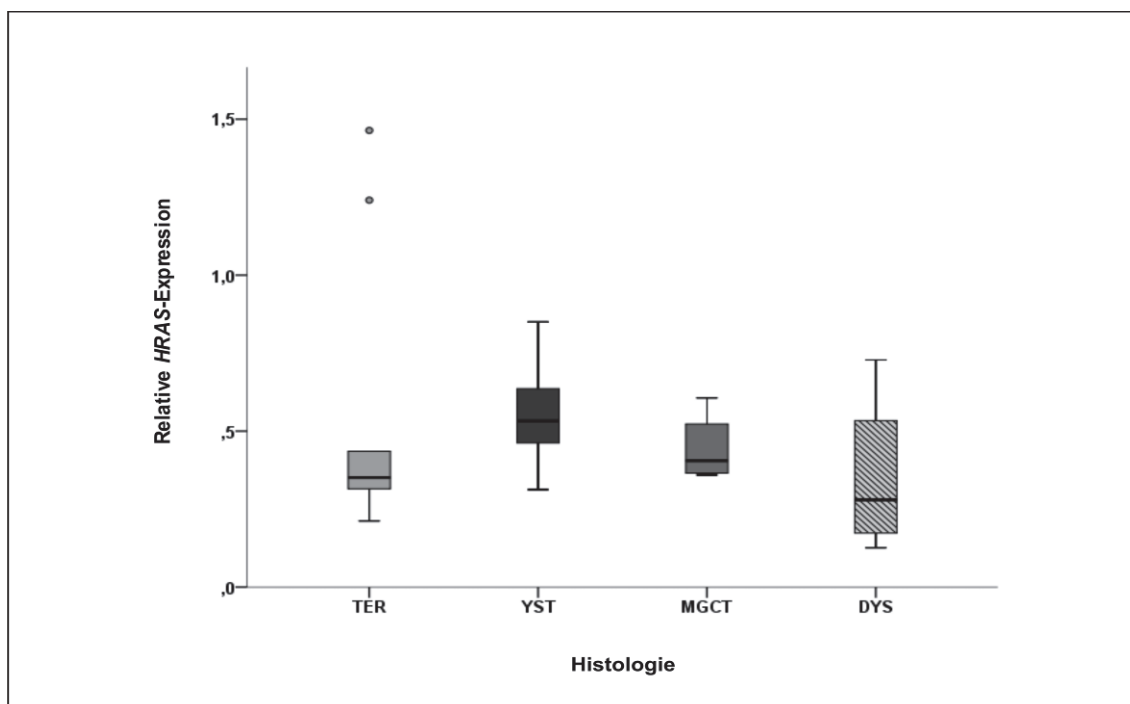


Abbildung 4.22: Relative *HRAS*-Expression in KZT.

Mittels quantitativer Real-Time PCR wurden Teratome (TER; n = 10), Dottersacktumoren (YST; n = 13), gemischte maligne KZT (MGCT; n = 4) und Dysgerminome (DYS; n = 4) analysiert. Die Normalisierung erfolgte gegen *POLR2A* und *GUSB*. Ausreißer werden durch Kreise dargestellt (Werte und Fälle siehe Text).

In der *HRAS*-Real-Time PCR wurden Teratome (n = 10), Dottersacktumoren (n = 13), gemischte maligne KZT (n = 4) und Dysgerminome (n = 5) analysiert. Die Gruppe der Teratome umfasste dabei reife (n = 5) und unreife (n = 5) Teratome. Die logarithmisch transformierten Werte wurden gegen *POLR2A* und *GUSB* normalisiert. Dabei zeigten sich keine signifikanten Expressionsunterschiede zwischen den Subentitäten (siehe

Abbildung 4.22). Bei den Ausreißern handelt es sich um die Fälle #76 (TER) und #23 (TER).

4.5.2 Expressionsprofil des *DACT3*-Gens

DACT3 (dapper, antagonist of beta-catenin, homolog 3) stellt einen intrazellulären, epigenetisch regulierten Antagonisten des Wnt-Signalweges dar, dessen Transkription durch bivalente Histonmodifikationen in Kolonkarzinomen reprimiert vorliegt (Jiang *et al.*, 2008a). Zur Ermittlung einer möglichen differentiellen Regulation in KZT wurde das mRNA-Expressionsprofil des *DACT3*-Gens erstellt.

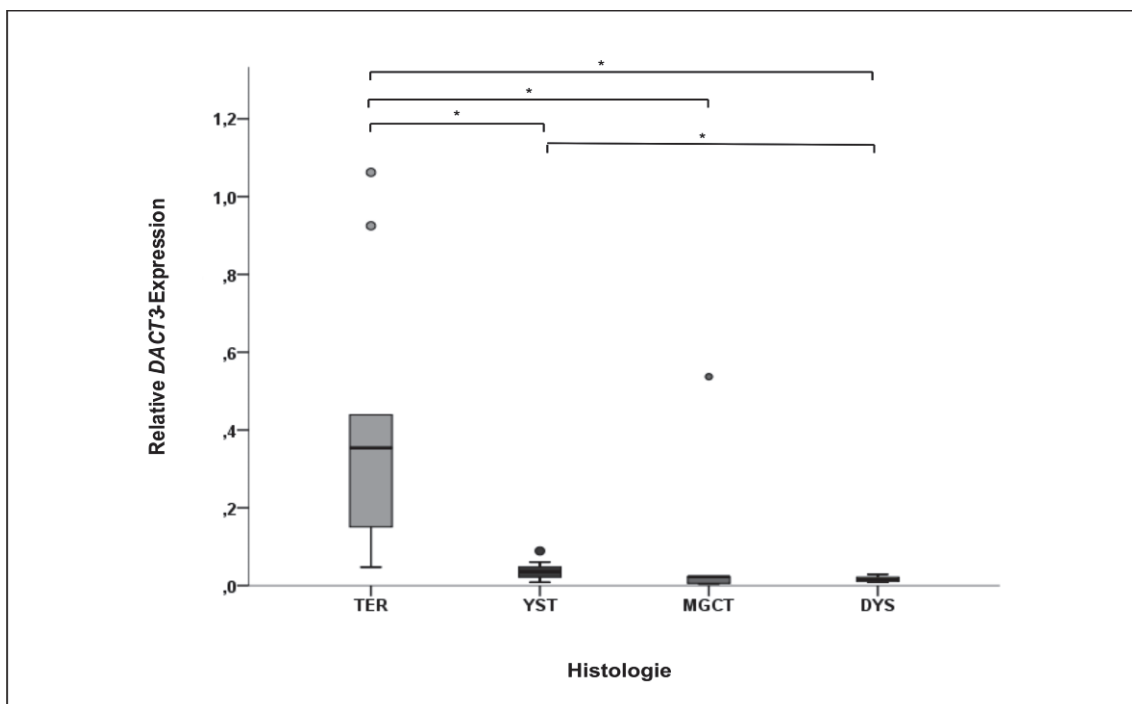


Abbildung 4.23: Relative *DACT3*-Expression in KZT.

Mittels quantitativer Real-Time PCR wurden Teratome (TER; n = 10), Dottersacktumoren (YST; n = 13), gemischte maligne KZT (MGCT; n = 5) und Dysgerminome (DYS; n = 6) analysiert. Die Normalisierung erfolgte gegen *POLR2A* und *GUSB*. Sterne markieren signifikante Expressionsunterschiede zwischen den Tumorentitäten, Ausreißer werden durch Kreise dargestellt (Werte und Fälle siehe Text).

In der *DACT3*-Real-Time PCR wurden Teratome (n = 10), Dottersacktumoren (n = 13), gemischte maligne KZT (n = 5) und Dysgerminome (n = 6) analysiert. Die Gruppe der Teratome umfasste dabei reife (n = 5) und unreife (n = 5) Teratome. Die logarithmisch transformierten Werte wurden gegen *POLR2A* und *GUSB* normalisiert. Dabei zeigte sich für Teratome eine signifikant höhere *DACT3*-Expression gegenüber den anderen Tumorentitäten (siehe Abbildung 4.23), die *DACT3* gering bis gar nicht exprimierten. Signifikante Expressionsunterschiede konnten zwischen Teratomen und Dysgerminomen ($p = 0,001$), Teratomen und gemischten malignen KZT ($p = 0,037$), Teratomen und Dottersacktumoren ($p = 0,000$) sowie ergänzend zwischen

Dottersacktumoren und Dysgerminomen ($p = 0,044$) ausgemacht werden. Bei den Ausreißern in Abbildung 4.23 handelt es sich um die Fälle #76 (TER), #89 (TER), #U3 (YST) und #6 (MGCT).

4.5.3 Expressionsprofil des *SNAI1*-Gens

SNAI1 und *SNAI2* gehören zur Gruppe der Zink-Finger-Transkriptionsfaktoren und modulieren Prozesse wie die Zellbewegung während der Embryonalentwicklung und die Progression von Tumoren. Eine Überexpression von *SNAI1*, das als WNT5A-Zielmolekül von GSK3 β phosphoryliert wird (Dissanayake *et al.*, 2007), wird für zahlreiche Karzinomen beschrieben und ist mit einer schlechten Prognose der Patienten assoziiert (Peinado *et al.*, 2007; Kalluri und Weinberg, 2009).

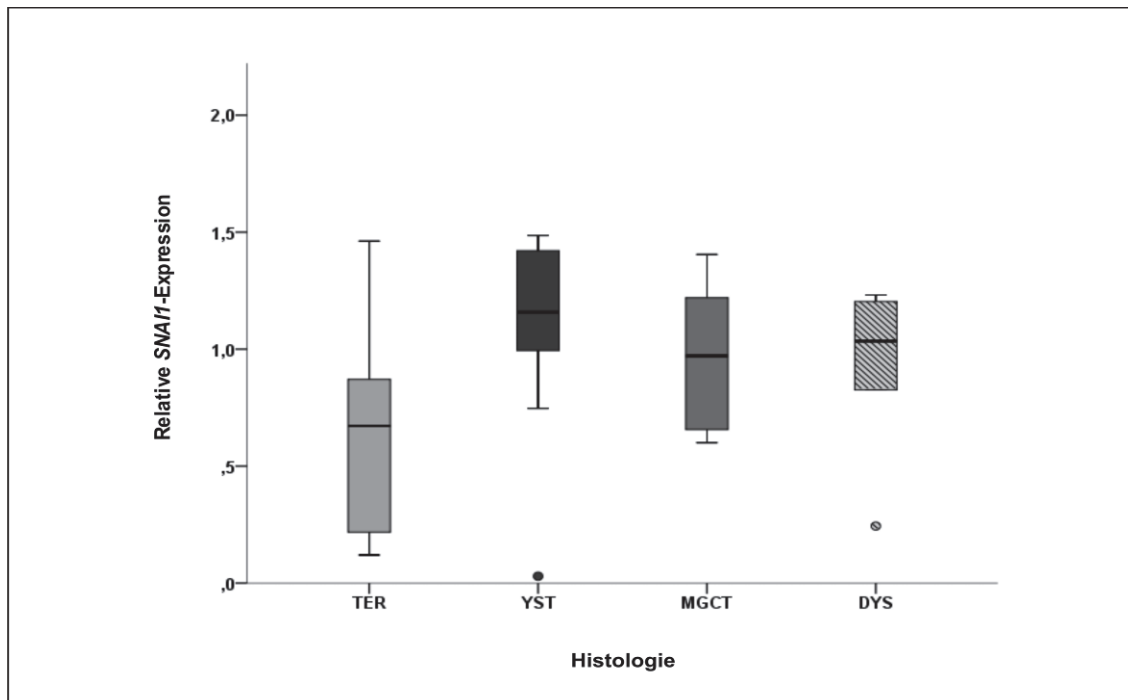


Abbildung 4.24: Relative *SNAI1*-Expression in KZT.

Mittels quantitativer Real-Time PCR wurden Teratome (TER; $n = 10$), Dottersacktumoren (YST; $n = 13$), gemischte maligne KZT (MGCT; $n = 5$) und Dysgerminome (DYS; $n = 6$) analysiert. Die Normalisierung erfolgte gegen *POLR2A* und *GUSB*. Ausreißer werden durch Kreise dargestellt (Werte und Fälle siehe Text).

In der *SNAI1*-Real-Time PCR wurden Teratome ($n = 10$), Dottersacktumoren ($n = 13$), gemischte maligne KZT ($n = 5$) und Dysgerminome ($n = 6$) analysiert. Die Gruppe der Teratome umfasste dabei reife ($n = 5$) und unreife ($n = 5$) Teratome. Die logarithmisch transformierten Werte wurden gegen *POLR2A* und *GUSB* normalisiert und zwecks Darstellung mit 10 multipliziert. Dabei zeigten sich keine signifikanten Expressionsunterschiede zwischen den Subentitäten (siehe Abbildung 4.24). Auffällig zeigten sich jedoch die beiden *SNAI1* niedrig exprimierenden Fälle #9 (YST) und #U212 (DYS). Bei den weiteren, hier nicht dargestellten, Ausreißern handelt es sich

um die Fälle #82 (YST), #4 (YST) und #133 (TER).

4.5.4 Expressionsprofil des *DVL1*-Gens

Die Aktivierung des cytosolischen Proteins Dishevelled (DVL) durch Wnt-Moleküle sowie die Rekrutierung an die Membranrezeptoren gehört zu den frühesten Ereignissen in der Wnt-Kaskade und trägt entscheidend zur Aktivierung des Signalweges bei (Axelrod *et al.*, 1998). *DVL1* wurde als Repräsentant der *DVL*-Gen-Familie ausgewählt. Diese Familie umfasst drei funktionell redundante, konservierte Mitglieder, die in nahezu allen Zelltypen exprimiert werden (Hamblet *et al.*, 2002; Etheridge *et al.*, 2008).

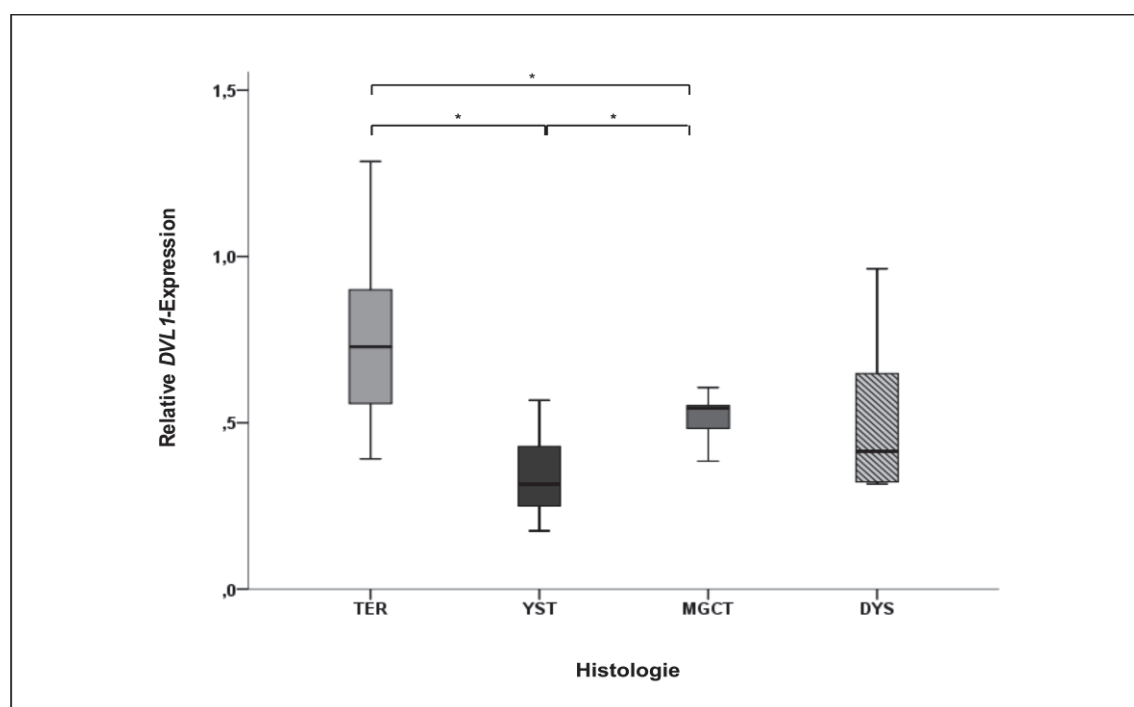


Abbildung 4.25: Relative *DVL1*-Expression in KZT.

Mittels quantitativer Real-Time PCR wurden Teratome (TER; n = 10), Dottersacktumoren (YST; n = 13), gemischte maligne KZT (MGCT; n = 5) und Dysgerminome (DYS; n = 6) analysiert. Die Normalisierung erfolgte gegen *POLR2A* und *GUSB*. Sterne markieren signifikante Expressionsunterschiede zwischen den Tumorentitäten (Werte und Fälle siehe Text).

In der *DVL1*-Real-Time PCR wurden Teratome (n = 10), Dottersacktumoren (n = 13), gemischte maligne KZT (n = 5) und Dysgerminome (n = 6) analysiert. Die Gruppe der Teratome umfasste dabei reife (n = 5) und unreife (n = 5) Teratome. Die logarithmisch transformierten Werte wurden gegen *POLR2A* und *GUSB* normalisiert. Dabei zeigte sich für Teratome die höchste *DVL1*-Expression (siehe Abbildung 4.25). Die Gruppe der Dottersacktumoren wies hingegen die geringste Expression auf. Signifikante Expressionsunterschiede konnten zwischen Teratomen und gemischten malignen KZT (p = 0,037), Teratomen und Dottersacktumoren (p = 0,000) sowie zwischen Dottersacktumoren und gemischten malignen KZT (p = 0,027) ausgemacht werden.

4.5.5 Expressionsprofil des Zelladhäsionsmoleküls EpCAM

Das epitheliale Zelladhäsionsmolekül EpCAM ist in der Lage, die Level seines löslichen Adaptermoleküls β -Catenin und somit die Aktivität des Wnt-Signalweges zu erhöhen (Winter *et al.*, 2007). In einer Vielzahl humaner epithelialer Gewebe, Karzinome sowie Progenitor- und Stammzellen wurde EpCAM als tumorassoziiertes Antigen identifiziert (siehe Abschnitt 1.3.3). Da Daten bezüglich der EpCAM-Expression in pädiatrischen KZT bisher nicht erhoben wurden, wurden im Rahmen dieser Arbeit Expressionsprofile sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene erstellt.

4.5.5.1 Expression auf mRNA-Ebene

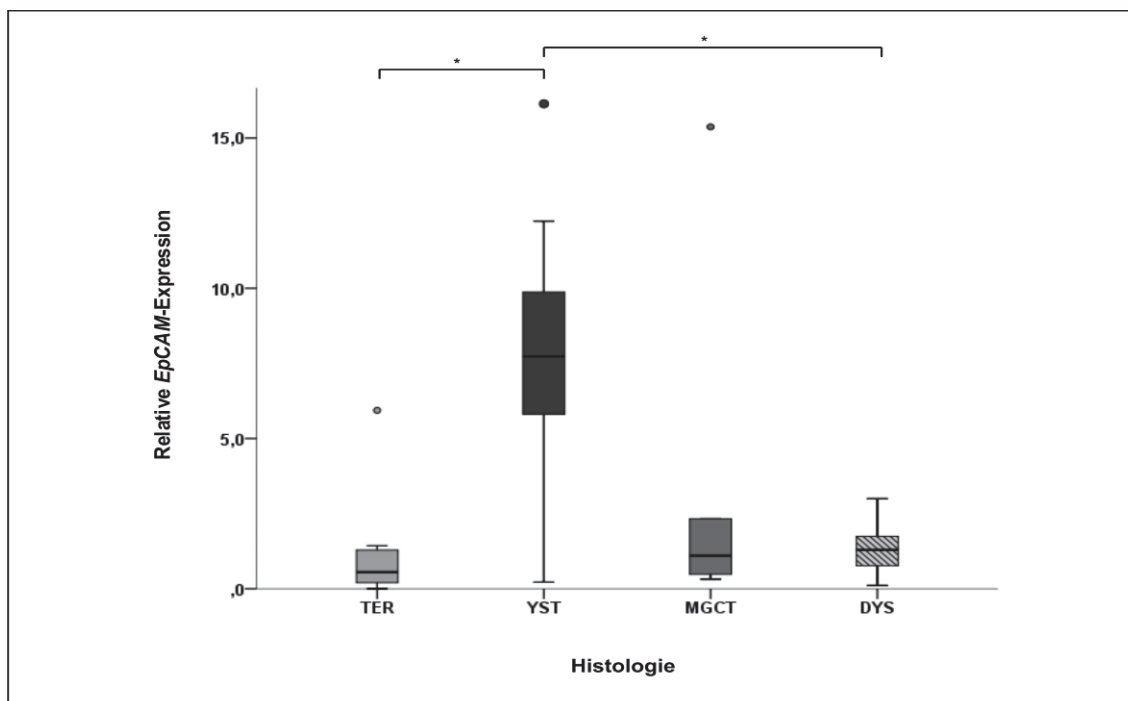


Abbildung 4.26: Relative EpCAM-Expression in KZT.

Mittels quantitativer Real-Time PCR wurden Teratome (TER; n = 10), Dottersacktumoren (YST; n = 13), gemischte maligne KZT (MGCT; n = 5) und Dysgerminome (DYS; n = 6) analysiert. Die Normalisierung erfolgte gegen *POLR2A* und *GUSB*. Sterne markieren signifikante Expressionsunterschiede zwischen den Tumorentitäten, Ausreißer werden durch Kreise dargestellt (Werte und Fälle siehe Text).

In der *EpCAM*-Real-Time PCR wurden Teratome (n = 10), Dottersacktumoren (n = 13), gemischte maligne KZT (n = 5) und Dysgerminome (n = 6) analysiert. Die Gruppe der Teratome umfasste dabei reife (n = 5) und unreife (n = 5) Teratome. Die logarithmisch transformierten Werte wurden gegen *POLR2A* und *GUSB* normalisiert. Die höchste *EpCAM*-Expression konnte für Dottersacktumoren nachgewiesen werden. (siehe Abbildung 4.26). Sowohl in Teratomen als auch in Dysgerminomen zeigte sich *EpCAM* signifikant niedriger exprimiert (TER und YST, p = 0,001; DYS und YST, p = 0,003). Ausnahmen bildeten die Ausreißer #78 (TER) und #122 (MGCT), die eine

abweichend hohe mRNA-Expression aufzeigten. Bei dem Ausreißer in der Gruppe der Dottersacktumoren handelt es sich um Fall #82.

4.5.5.2 Expression auf Protein-Ebene

Zur zellulären Lokalisation des Proteins sowie zur Korrelation der EpCAM mRNA- und Proteinexpression, wurden in Ergänzung zur quantitativen Real-Time PCR immunhistochemische Analysen an ausgewählten Paraffingewebeschnitten durchgeführt. Analysiert wurden insgesamt 13 Tumoren, darunter reife bzw. unreife Teratome (#23, #89, #55, #76, #78), Dottersacktumoren (#119, #14, #82, #4) und gemischte maligne KZT (#54, #19, #6, #90). Abbildung 4.27 zeigt repräsentative Ergebnisse der Färbungen.

Kolonkarzinomschnitte wurden als Positivkontrolle herangezogen. In dem proliferierenden, gesunden Gewebe konnte eine starke zytoplasmatische und membranöse Färbung von EpCAM ausgemacht werden (siehe Abbildung 4.27, A).

Im Teratomanteil des gemischten malignen KZT (#14, siehe Abbildung 4.27, B) war eine mäßig starke, epitheliale Färbung zu beobachten. Im Fall des Tumors #23 zeigte sich das Plattenepithel basal schwach gefärbt, während Glia- und Mesenchymgewebe, im Gegensatz zur β -Catenin-Färbung, vollständig ungefärbt vorlagen. Das Zylinderepithel war hingegen ubiquitär stark gefärbt (#23, Ergebnisse nicht dargestellt).

Das unreife Teratom wies eine wenig fokale, auf einzelne epitheliale Komponenten beschränkte Färbung auf (#89, siehe Abbildung 4.27, C und D). Im Gegensatz zu β -Catenin zeigten sich die unreifen Teratom-Anteile des Gewebes von Patient #76 vollständig ungefärbt (Ergebnisse nicht dargestellt). Es konnte jedoch eine Anfärbung des intestinalen Epithels sowie des Plattenepithels beobachtet werden. In dem analysierten Gewebeschnitt befanden sich keine Dottersacktumor-Anteile. Für das Gewebe des Tumors #55 konnte neben dem kräftig positiv gefärbten Nebenhoden keine Färbung in den unreifen Teratom-Anteilen detektiert werden (Ergebnisse nicht dargestellt). Entsprechend zeigte sich auch der unreife Teratomanteil bzw. die Testikuläre Intratubuläre Neoplasie (TIN) des Falles #90 negativ, während die malignen Embryonales Karzinom- und Dottersacktumor-Anteile stark positiv gefärbt vorlagen (Ergebnisse nicht dargestellt).

Während der Teratom-Anteil des Tumors #14 nur mäßig stark gefärbt vorlag (s.o.), wurde EpCAM im Dottersacktumor-Anteil der gemischten malignen KZT stark exprimiert und wies eine fokale, epitheliale und insgesamt kräftig positive Färbung auf (siehe Abbildung 4.27, E und F). Das Gewebe des Tumors #82 wies, der mRNA-Expression entsprechend, ebenfalls ubiquitär eine hohe EpCAM-Expression auf (Ergebnisse nicht dargestellt). Ergänzt wird dieser Befund durch die fokal betonte, streng membranöse Färbung im Gewebe des Tumors #119 (Ergebnisse nicht

dargestellt), welche sich vergleichsweise höher darstellte als in der internen Positivkontrolle, der Kolonmukosa.

In Ermangelung geeigneten Materials konnten keine reinen Dysgerminome untersucht werden. Der gemischte maligne KZT #19 wies jedoch weder im Choriokarzinom- noch im Dysgerminom-Anteil des Tumor eine nachweisbare EpCAM-Expression auf (siehe Abbildung 4.27, G und H). Gleiches konnte hinsichtlich der β -Catenin-Färbung beobachtet werden (siehe Abbildung 4.3).

Da das Material für die immunhistochemischen Untersuchungen und die Real-Time-Analysen nicht aus demselben Gewebe entnommen werden konnte, wurde keine Korrelation der EpCAM Gen- und Proteinexpression vorgenommen. Die in der Real-Time PCR beobachtete Hochregulierung von *EpCAM* in Dottersacktumoren entspricht jedoch der stark positiven Expression des Proteins in der Immunhistochemie. Gleichsam spiegelt sich die signifikant niedrigere *EpCAM*-Expression in Teratomen (reife wie unreife Teratome) in der negativen oder nur geringen immunhistochemischen Anfärbbarkeit wider.

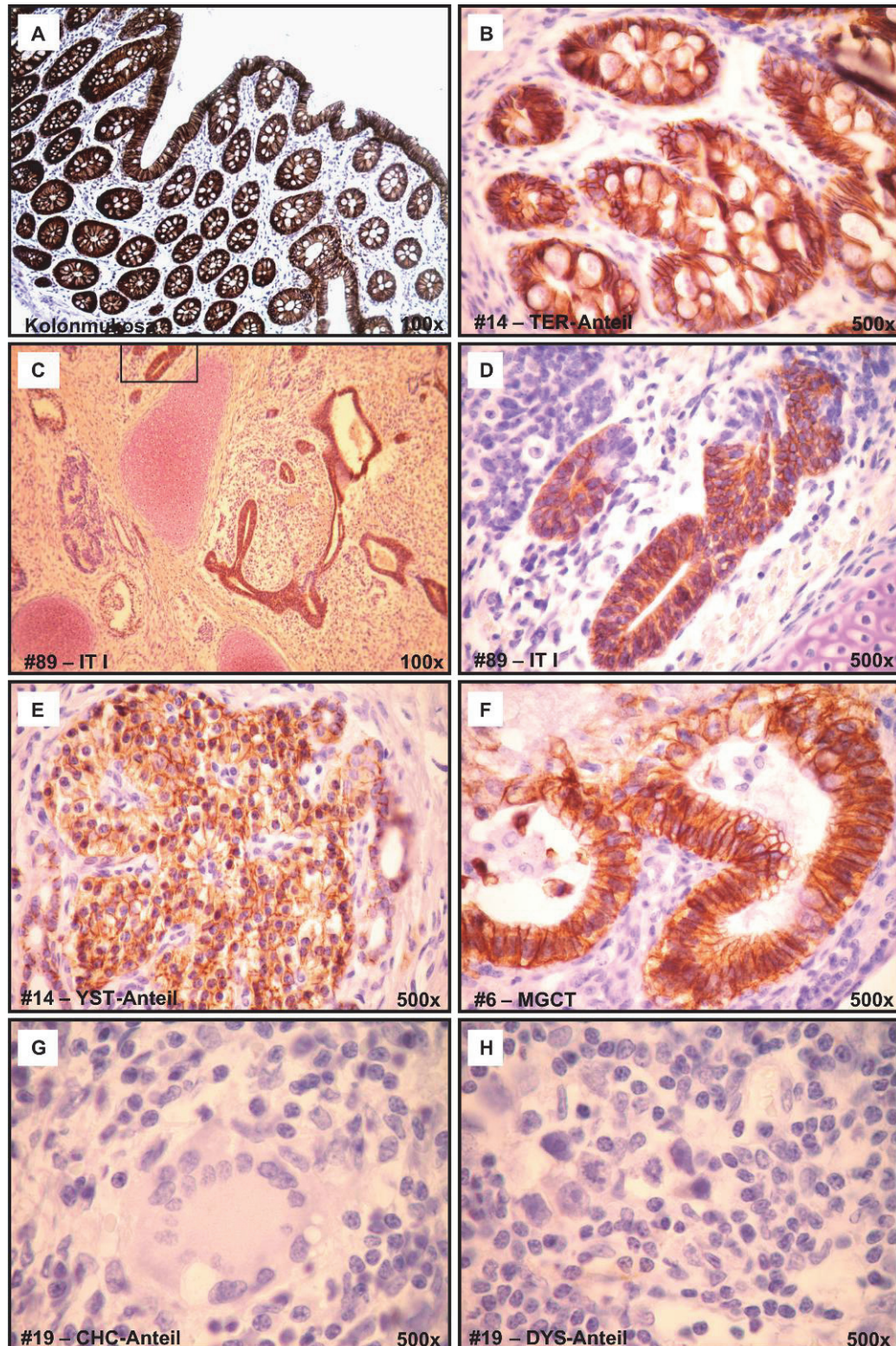


Abbildung 4.27: EpCAM-Expression in KZT.

Mittels immunhistochemischer Färbungen wurden Paraffinschnitte von Teratomen (TER; n = 5), Dottersacktumoren (YST; n = 4) und gemischten malignen KZT (MGCT; n = 4) analysiert. Dargestellt sind repräsentative Ergebnisse der Färbungen an (A) gesunder Kolonmukosa, (B) dem Teratomanteil eines gemischten malignen KZT, (C und D) einem unreifen Teratom, (E und F) dem Dottersacktumorteil eines gemischten malignen KZT sowie (G) dem Choriokarzinom- bzw. (H) Dysgerminomanteil eines gemischten malignen KZT. Originale Vergrößerungen siehe Abbildung.

4.6 Mitglieder der SFRP-Familie

SFRP-Gene (*SFRP1–5*) wurden als extrazelluläre Tumorsuppressoren identifiziert, die sowohl den kanonischen als auch den nicht-kanonischen Wnt-Signalweg inhibieren können (siehe Abschnitt 1.2.3). Aufgrund ihrer außerordentlichen Relevanz in zahlreichen soliden Krebserkrankungen, in denen ihre Expression reduziert vorliegt (Dahl *et al.*, 2007), wird diese Familie der, mit Ausnahme von *SFRP3*, epigenetisch kontrollierten Regulatoren in einem gesonderten Abschnitt betrachtet. Da über die Rolle von sFRPs in KZT nur wenige Daten vorlagen (Hoei-Hansen *et al.*, 2004; Dahl *et al.*, 2007), wurden zunächst die mRNA-Expressionsprofile der einzelnen Gene in den verschiedenen Tumorentitäten bestimmt.

4.6.1 Expressionsprofil des *SFRP1*-Gens

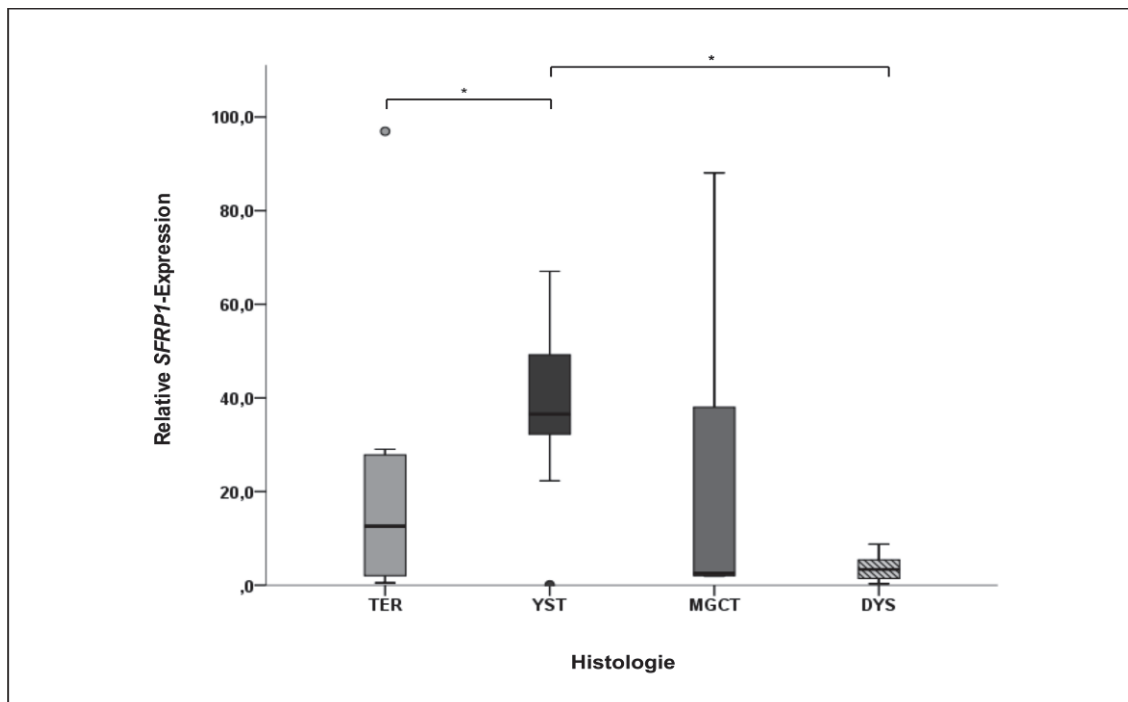


Abbildung 4.28: Relative *SFRP1*-Expression in KZT.

Mittels quantitativer Real-Time PCR wurden Teratome (TER; n = 10), Dottersacktumoren (YST; n = 13), gemischte maligne KZT (MGCT; n = 5) und Dysgerminome (DYS; n = 6) analysiert. Die Normalisierung erfolgte gegen *POLR2A* und *GUSB*. Sterne markieren signifikante Expressionsunterschiede zwischen den Tumorentitäten, Ausreißer werden durch Kreise dargestellt (Werte und Fälle siehe Text).

In der *SFRP1*-Real-Time PCR wurden Teratome (n = 10), Dottersacktumoren (n = 13), gemischte maligne KZT (n = 5) und Dysgerminome (n = 6) analysiert. Die Gruppe der Teratome umfasste dabei reife (n = 5) und unreife (n = 5) Teratome. Die logarithmisch transformierten Werte wurden gegen *POLR2A* und *GUSB* normalisiert. Dabei zeigten sich für die Dysgerminome eine deutlich verringerte *SFRP1*-Expression, während für

die Dottersacktumoren eine im Vergleich zu den anderen Entitäten erhöhte Expression deutlich wurde (siehe Abbildung 4.28). Signifikante Expressionsunterschiede konnten zwischen Teratomen und Dottersacktumoren ($p = 0,018$) sowie zwischen Dottersacktumoren und Dysgerminomen ($p = 0,004$) beobachtet werden. Bei den Ausreißern in Abbildung 4.28 handelt es sich um die Fälle #1 (TER) und #9 (YST).

4.6.2 Expressionsprofil des *SFRP4*-Gens

In der *SFRP4*-Real-Time PCR wurden Teratome ($n = 10$), Dottersacktumoren ($n = 13$), gemischte maligne KZT ($n = 5$) und Dysgerminome ($n = 6$) analysiert. Die Gruppe der Teratome umfasste dabei reife ($n = 5$) und unreife ($n = 5$) Teratome. Die logarithmisch transformierten Werte wurden gegen *POLR2A* und *GUSB* normalisiert. Dabei zeigten sich keine signifikanten Expressionsunterschiede zwischen den Subentitäten (siehe Abbildung 4.29). Unabhängig von einer statistischen Signifikanz war dennoch eine erhebliche Variabilität der Daten im Falle der Teratome, Dottersacktumoren und gemischten malignen KZT zu beobachten; bei einem Median im unteren Quartil verteilten sich 50% der Daten im oberen Bereich, mit Extremwerten zwischen 45 und 80. Dysgerminome wiesen im Vergleich dazu eine gleichmäßig verringerte *SFRP4*-Expression auf.

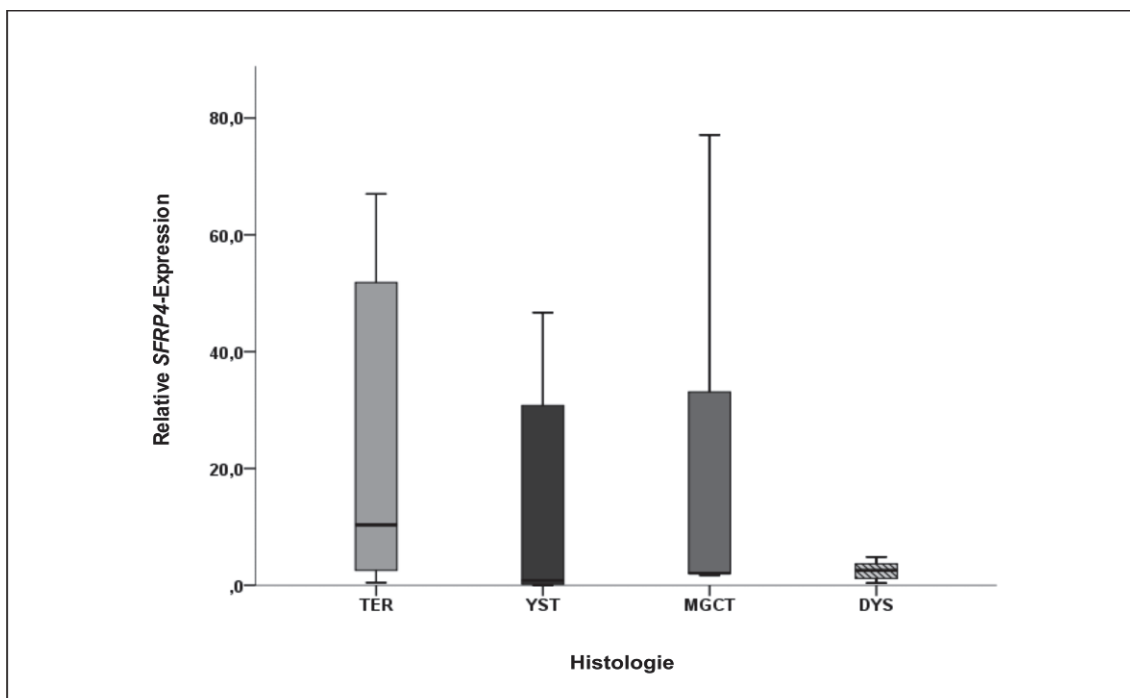


Abbildung 4.29: Relative *SFRP4*-Expression in KZT.

Mittels quantitativer Real-Time PCR wurden Teratome (TER; $n = 10$), Dottersacktumoren (YST; $n = 13$), gemischte maligne KZT (MGCT; $n = 5$) und Dysgerminome (DYS; $n = 6$) analysiert. Die Normalisierung erfolgte gegen *POLR2A* und *GUSB*.

4.6.3 Expressionsprofil des *SFRP5*-Gens

In der *SFRP5*-Real-Time PCR wurden Teratome (n = 8), Dottersacktumoren (n = 11), gemischte maligne KZT (n = 7) und Dysgerminome (n = 6) analysiert. Die Gruppe der Teratome umfasste dabei reife (n = 5) und unreife (n = 3) Teratome. Die logarithmisch transformierten Werte wurden gegen *18SrRNA* normalisiert und zwecks Darstellung mit 10^5 multipliziert. Es zeigte sich dabei eine signifikant erhöhte mRNA-Expression der Dottersacktumoren gegenüber der Gruppe der Dysgerminome ($p = 0,012$) (siehe Abbildung 4.30). Ebenfalls signifikant erhöht zeigte sich die *SFRP5*-Expression der Dottersacktumoren im Vergleich zu den gemischten malignen KZT ($p = 0,006$). Bei dem Ausreißer in Abbildung 4.30 handelt es sich um den Fall #3 (YST).

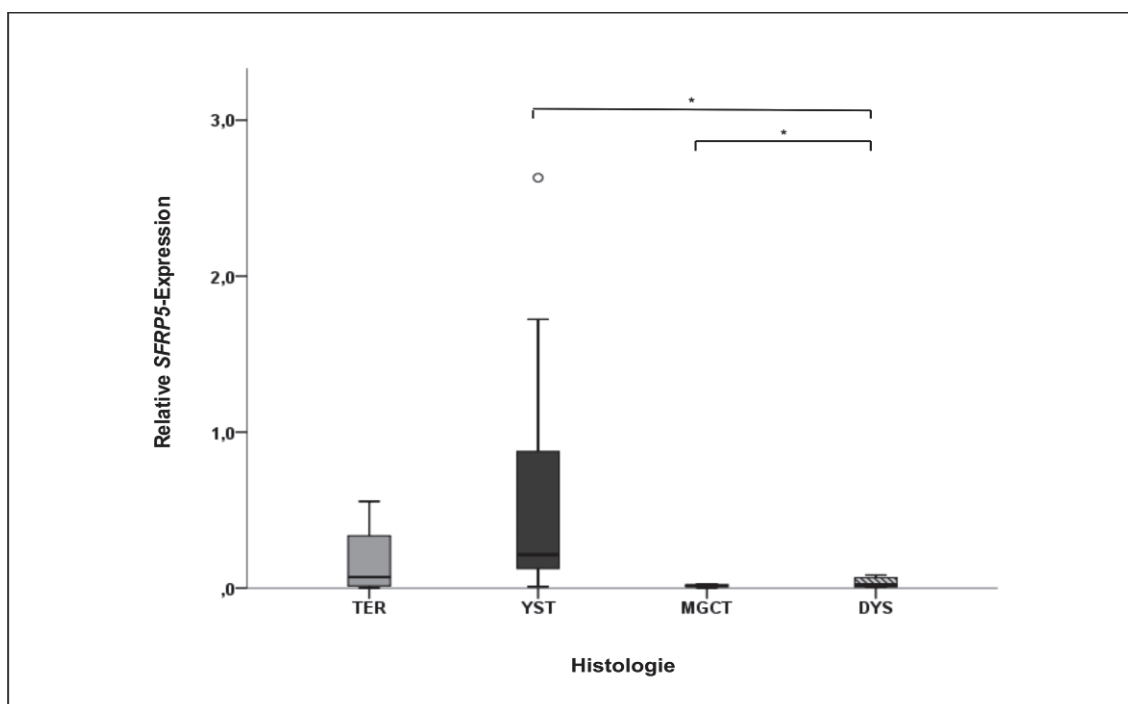


Abbildung 4.30: Relative *SFRP5*-Expression in KZT.

Mittels quantitativer Real-Time PCR wurden Teratome (TER; n = 8), Dottersacktumoren (YST; n = 11), gemischte maligne KZT (MGCT; n = 7) und Dysgerminome (DYS; n = 6) analysiert. Die Normalisierung erfolgte gegen *18SrRNA*. Sterne markieren signifikante Expressionsunterschiede zwischen den Tumorentitäten, Ausreißer werden durch Kreise dargestellt (Werte und Fälle siehe Text).

4.6.4 Expressionsprofil des extrazellulären Wnt-Antagonisten *SFRP2*

4.6.4.1 Expression auf mRNA-Ebene

In der *SFRP2*-Real-Time PCR wurden Teratome (n = 10), Dottersacktumoren (n = 13), gemischte maligne KZT (n = 5) und Dysgerminome (n = 6) analysiert. Die Gruppe der Teratome umfasste dabei reife (n = 5) und unreife (n = 5) Teratome. Die logarithmisch transformierten Werte wurden gegen *POLR2A* und *GUSB* normalisiert. Dabei zeigte sich eine für Dottersacktumoren im Vergleich zu den anderen Entitäten deutlich verringerte oder nicht vorhandene *SFRP2*-Expression (siehe Abbildung 4.31, vgl. auch Abbildung 4.34). Bei einem Vergleich der *SFRP2*-Expression in Dysgerminomen und Dottersacktumoren war ferner eine signifikant höhere Expression dieses Inhibitors in Dysgerminomen zu beobachten ($p = 0,004$). Dieses Verhältnis stellte sich für die Gene *SFRP1*, *SFRP4* und *SFRP5* umgekehrt dar (siehe Abbildung 4.28, Abbildung 4.29 und Abbildung 4.30). Eine insgesamt erhöhte *SFRP2*-Expression konnte in Teratomen beobachtet werden, mit einem signifikanten Expressionsunterschied zu Dottersacktumoren ($p = 0,002$). Bei den Ausreißern in Abbildung 4.31 handelt es sich um die Fälle #155 (TER), #133 (TER), #4 (YST) und #6 (MGCT).

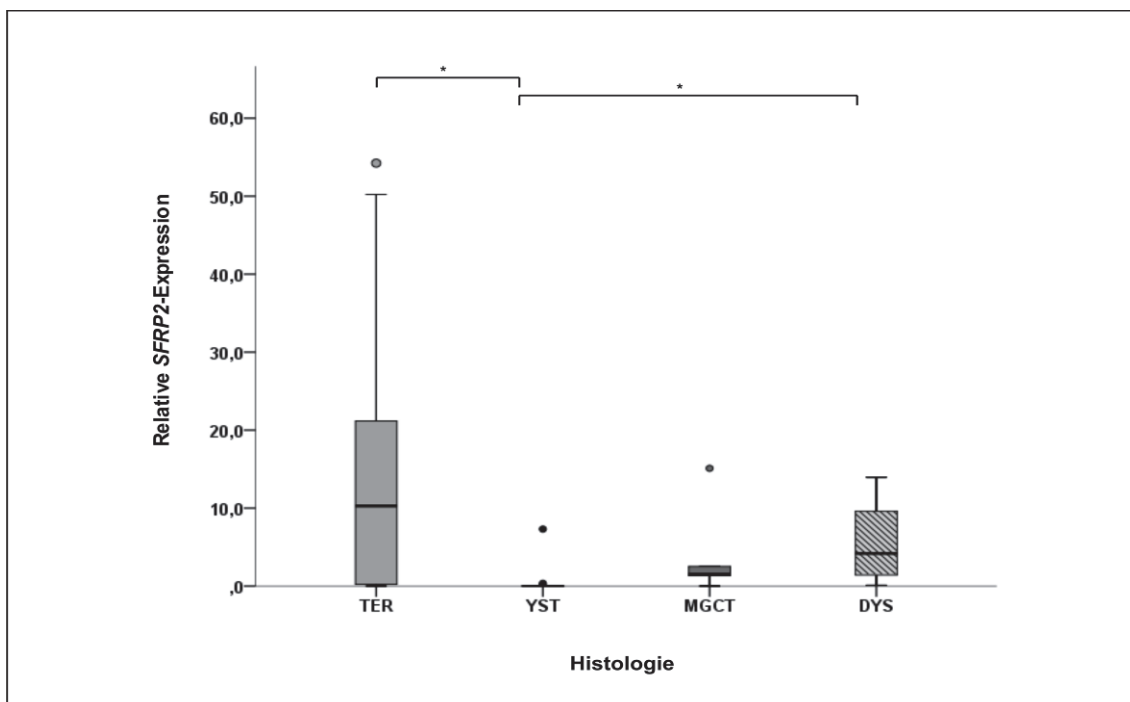


Abbildung 4.31: Relative *SFRP2*-Expression in KZT.

Mittels quantitativer Real-Time PCR wurden Teratome (TER; n = 10), Dottersacktumoren (YST; n = 13), gemischte maligne KZT (MGCT; n = 5) und Dysgerminome (DYS; n = 6) analysiert. Die Normalisierung erfolgte gegen *POLR2A* und *GUSB*. Sterne markieren signifikante Expressionsunterschiede zwischen den Tumorentitäten, Ausreißer werden durch Kreise dargestellt (Werte und Fälle siehe Text).

4.6.4.2 Expression auf Protein-Ebene

Da die Suppression des extrazellulären Wnt-Antagonisten SFRP2 ein Schlüsselereignis für die Entstehung zahlreicher Tumoren darstellt (Esteve und Bovolenta, 2010) und im Rahmen dieser Arbeit auch für Dottersacktumoren gezeigt werden konnte (siehe Abschnitt 4.6.4.1), wurde das Expressionsprofil auf Proteinebene validiert. Dazu wurden immunhistochemische Analysen an ausgewählten Paraffingewebeschnitten durchgeführt. Analysiert wurden insgesamt 10 Tumoren, darunter reife bzw. unreife Teratome (#89, #55, #78), Dottersacktumoren (#119, #14, #4) und gemischte maligne KZT (#54, #19, #6, #90). Abbildung 4.32 zeigt repräsentative Ergebnisse der Färbungen.

Bronchusgewebe wurde als Positivkontrolle herangezogen. In dem gesunden Gewebe konnte eine starke membranöse und zytoplasmatische Expression von SFRP2 an Zilienzellen nachgewiesen werden (siehe Abbildung 4.32, A). Im unreifen Teratom (#89, siehe Abbildung 4.32, B) zeigte sich eine starke epitheliale Färbung in verschiedenen Gewebetypen. Diese umfassten sowohl mesenchymale Komponenten als auch die epithelialen, oft drüsigen Strukturen in den Tumoren. In gemischten malignen KZT zeigte das Expressionsmuster ebenfalls eine Betonung in epithelialen Geweben. Diese beschränkte sich jedoch überwiegend auf die Teratom- und Dysgerminomanteile (Ergebnisse nicht dargestellt). Im Gewebe des Tumors #6 (siehe Abbildung 4.32, C und D) zeigten sich die Anteile des Dottersacktumorgewebes sowie des Embryonalen Karzinoms ungefärbt, während der Teratomanteil eine schwache, fokale Expression von SFRP2 aufwies. In reinen Dottersacktumoren konnte eine SFRP2-Expression in keinem der Fälle nachgewiesen werden (siehe Abbildung 4.32, E und F).

Eine Korrelation der SFRP2-Gen- und Proteinexpression wurde nicht vorgenommen, die Ergebnisse der Proteinanalysen lassen sich jedoch mit den Ergebnissen der Real-Time-Analysen vergleichen. SFRP2 wird in Dottersacktumoren weder auf mRNA- noch auf Proteinebene exprimiert, während die kräftige immunhistochemische Anfärbbarkeit in Teratomen mit einer signifikant höheren *SFRP2*-mRNA-Expression in diesen Tumoren einhergeht.

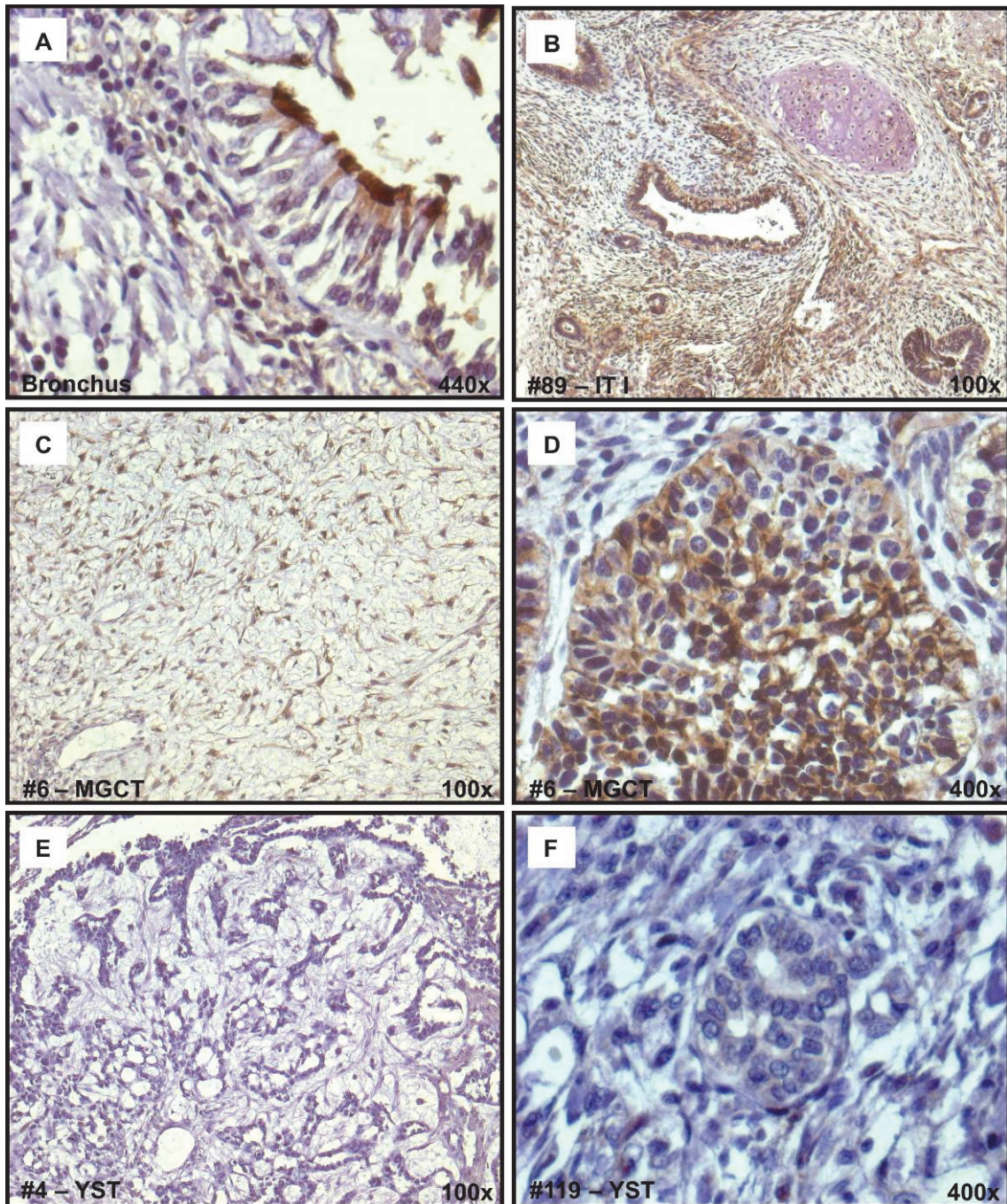


Abbildung 4.32: SFRP2-Expression in KZT.

Mittels immunohistochemischer Färbungen wurden Paraffinschnitte von Teratomen (TER; n = 3), Dottersacktumoren (YST; n = 3) und gemischten malignen KZT (MGCT; n = 4) analysiert. Dargestellt sind repräsentative Ergebnisse der Färbungen an (A) gesundem Bronchusgewebe, (B) einem unreifen Teratom, (C und D) einem gemischten malignen KZT sowie (E und F) an Dottersacktumoren. Originale Vergrößerungen siehe Abbildung.

4.7 Charakterisierung von *SFRP2* in KZT und Zelllinien

4.7.1 Methylierungs- und Expressionsprofil von *SFRP2* in KZT

Eine epigenetische Regulation von *SFRP2* wurde vielfach beschrieben. Zwischen der Hypermethylierung des Promotorbereichs und einer verringerten Gen-Expression dieses Inhibitors in Tumorzellen besteht ein direkter Zusammenhang (Suzuki *et al.*, 2002, Fukui *et al.*, 2005). Aufgrund der in Dottersacktumoren stark verminderten *SFRP2*-Expression sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene (siehe Abschnitt 4.6.4) wurde der epigenetische Status der *SFRP2*-Promotorregion unter Verwendung der methylierungsspezifischen PCR festgestellt.

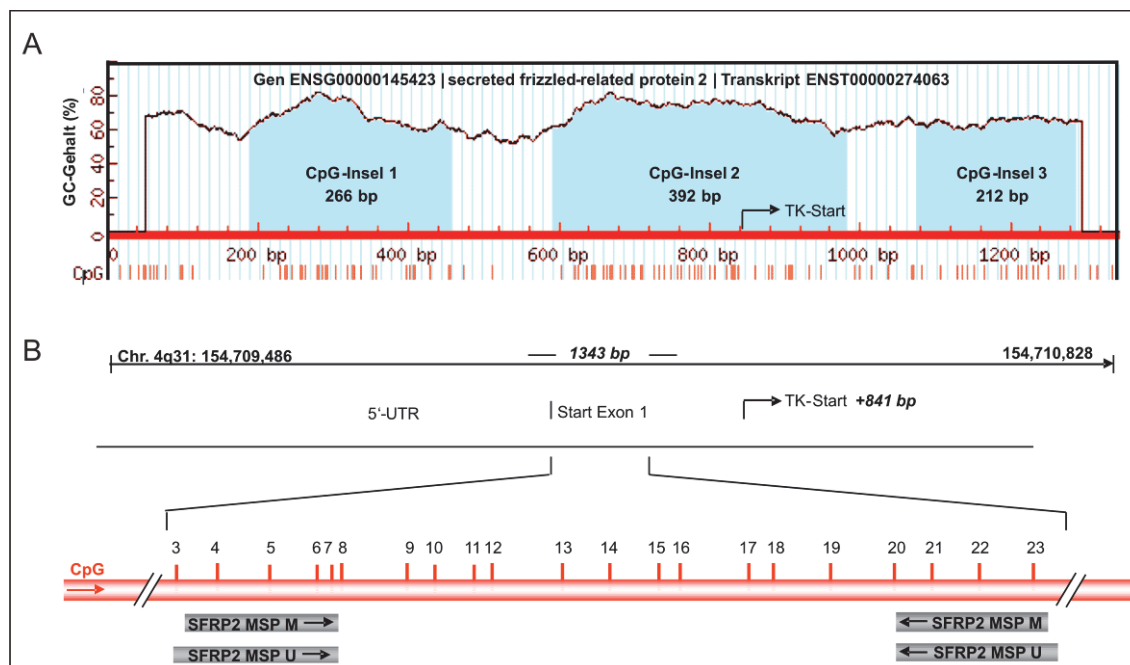


Abbildung 4.33: CpG-Inseln innerhalb des *SFRP2*-Promotorbereichs.

(A) Schematisch dargestellt (verändert nach: MethPrimer, <http://www.urogene.org/methprimer/index1.html>) ist der *SFRP2*-Promotorbereich (ENSG00000145423, Transkript ENST00000274063) mit den drei CpG-Inseln sowie den analysierten CpGs innerhalb der CpG-Insel 2 (392 bp; Kriterien: GC-Gehalt > 50%, Inselgröße > 100 bp) des Promotors (siehe auch Veeck *et al.*, 2008b). Der untersuchte Bereich auf Chromosom 4q31 in der 5'UTR sowie Exon 1 umfasste insgesamt 35 CpGs. (B) Exemplarisch dargestellt sind die CpGs 3–23. Vertikale, rote Striche repräsentieren die einzelnen CpGs; horizontale, graue Rechtecke stellen schematisch die Lage der für die MSP (siehe 2.8.3) verwendeten Primerpaare dar. TK-Start, Transkriptionsstart.

Die *SFRP2*-Promotorregion auf Chromosom 4q31 umfasst drei CpG-Inseln, die sich in der 5'-UTR des Gens (ENSG00000145423, Transkript ENST00000274063) und Exon 1, einschließlich des Transkriptionsstarts, befinden. Aufgrund der Sequenzintegrität des ersten Exons und dessen Relevanz für eine effiziente RNA-Transkription wurde, wie zuvor beschrieben (Veeck *et al.*, 2008b), CpG-Insel 2 (392 bp) für die weiteren Analysen gewählt. Abbildung 4.33 stellt den Promotorbereich mit den CpG-Inseln (A)

sowie die untersuchten CpG-Dinukleotide dar (B).

Der Bereich der CpG-Insel 2 umfasst insgesamt 35 CpGs (in Abbildung 4.33 nur CpG 3–23 dargestellt). In der methylierungsspezifischen PCR wurden die CpGs 3–7 (M-MSP) bzw. 2–7 (U-MSP) und 20–23 (M- und U-MSP) analysiert. Die Untersuchungen umfassten reife ($n = 4$) und unreife Teratome ($n = 5$), Dottersacktumoren ($n = 11$), gemischte maligne KZT ($n = 6$) und Dysgerminome ($n = 5$).

In Abbildung 4.34, A, sind exemplarisch die Ergebnisse für Teratome (reife und unreife Teratome), Dottersacktumoren, gemischte maligne KZT und Dysgerminome dargestellt. Eine Übersicht über alle analysierten Tumoren und ihre Ergebnisse kann der schematischen Darstellung der Abbildung 8.1 im Anhang entnommen werden. Eine Methylierung der Promotorregion wurde für reife (1/4) und unreife (0/5) Teratome, Dottersacktumoren (10/11), gemischte maligne KZT (3/6) und Dysgerminome (2/5) nachgewiesen. Der Status der Methylierung wurde auch in den Fällen festgestellt, in denen neben einer Bande des unmethylierten Produktes ein, gegebenenfalls auch schwächer, methyliertes Produkt auftrat (Bezeichnung als M/U).

In Abbildung 4.34, B, wird die *SFRP2*-Methylierung im Zusammenhang mit der *SFRP2*-Expression dargestellt. Es wird, entsprechend der BoxPlot-Darstellung in Abbildung 4.31, die relative *SFRP2*-Expression der in der quantitativen Real-Time PCR analysierten Fälle und, falls vorhanden, der Methylierungsstatus aufgeführt. Ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der *SFRP2*-Methylierung und der *SFRP2*-Expression konnte nicht nachgewiesen werden ($n = 27$; Korrelation nach Pearson, $p = 0,264$; Signifikanz, $p = 0,184$). Bei gemeinsamer Betrachtung aller histologischer Gruppen wurde jedoch, von Ausnahmen abgesehen, ein Unterschied in der mRNA-Expression der methylierten bzw. nicht-methylierten Proben deutlich. Bei vorliegender Methylierung wurde eine deutlich verringerte *SFRP2*-Expression beobachtet.

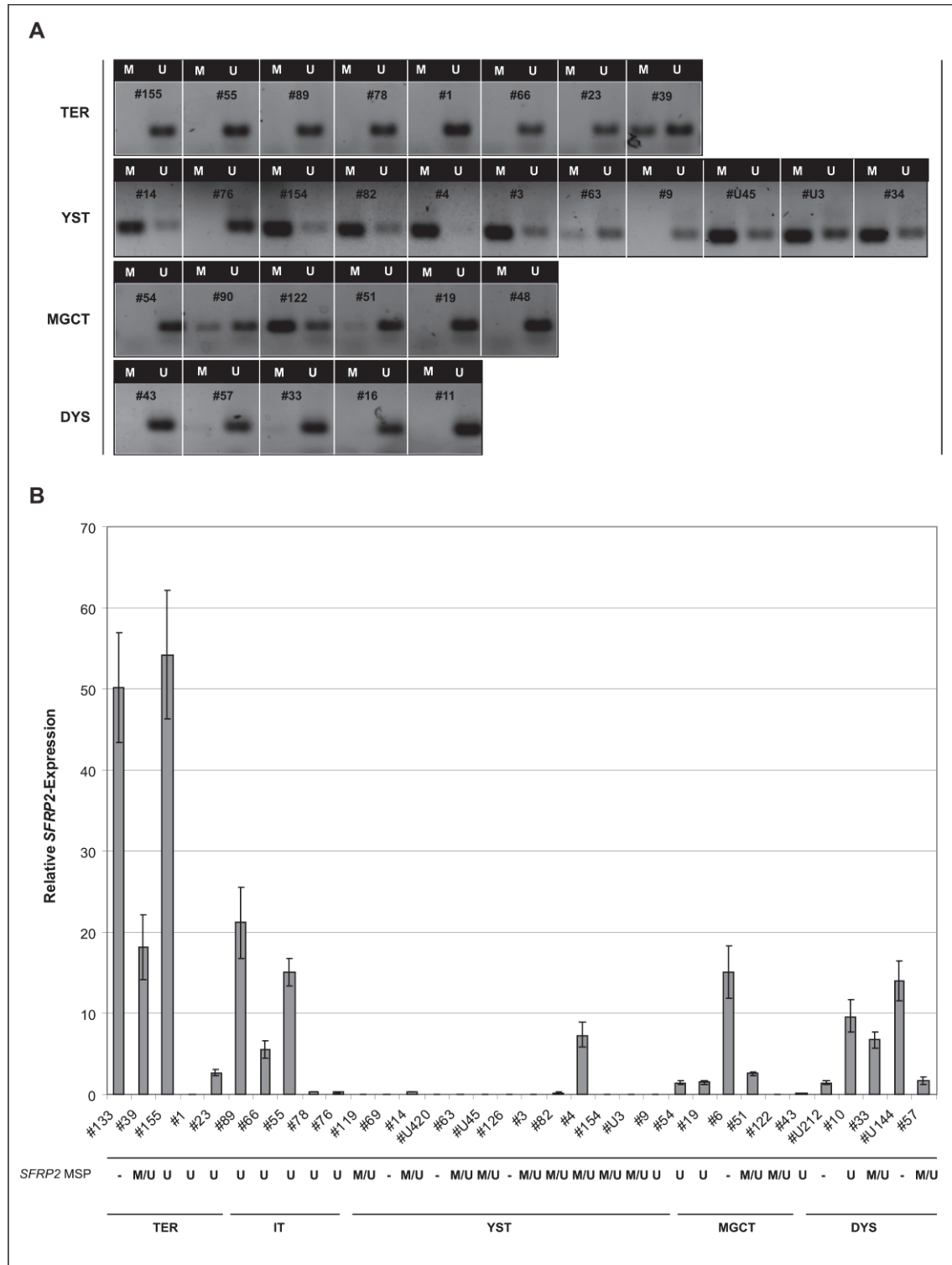


Abbildung 4.34: Methylierung und Expression von *SFRP2* in KZT.

(A) Mittels methylierungsspezifischer PCR wurden Teratome (TER; n = 4; IT, n = 5), Dottersacktumoren (YST; n = 11), gemischte maligne KZT (MGCT; n = 6) und Dysgerminome (DYS; n = 5) analysiert. Die Spalten repräsentieren die M-MSP (M) bzw. U-MSP (U) am *SFRP2*-Promotor für den jeweiligen Fall (siehe auch Abbildung 8.1 des Anhangs). (B) Mittels quantitativer Real-Time PCR wurden Teratome (n = 10), Dottersacktumoren (n = 13), gemischte maligne KZT (n = 5) und Dysgerminome (n = 6) analysiert (siehe auch Abbildung 4.31). *SFRP2*-mRNA-Expression und Ergebnisse der methylierungsspezifischen PCR werden untereinander dargestellt. Die Tumoren sind mit ihrer jeweiligen Datenbank-Identnummer kodiert (#). Zu (A) M, M-MSP; U, U-MSP; Zu (B) M, methyliert; U, nicht-methyliert; -, nicht analysiert.

4.7.2 Demethylierung und Reexpression von *SFRP2* in der MCF-7-Zelllinie

Funtionelle Analysen sollten einen möglichen, direkten Zusammenhang zwischen der Promotormethylierung und der Genexpression von *SFRP2* in KZT aufdecken. Hierzu wurden die Demethylierungs- und Acetylierungsversuche mit 5-Aza und TSA zur Versuchsetablierung zunächst an der Wnt-positiven Mammakarzinomzelllinie MCF-7 (siehe Abschnitt 2.3) durchgeführt. In Vorversuchen konnte für diese eine *SFRP2*-Promotormethylierung, einhergehend mit einer fehlenden *SFRP2*-Expression, nachgewiesen werden (Ergebnisse nicht dargestellt; siehe auch Veeck *et al.*, 2008b).

In Abbildung 4.35, A, ist der Methylierungsstatus des Promotors der Zellen nach 96 h ohne Behandlung, mit DMSO als Mockkontrolle sowie nach Behandlung mit 5-Aza (1, 1,75 und 2,5 μM) und 5-Aza (1, 1,75 und 2,5 μM) in Kombination mit TSA (24 h, 300 nM) dargestellt. Unbehandelte Zellen wiesen ebenso wie die DMSO-Mockkontrolle einen ausschließlich methylierten *SFRP2*-Promotor auf. Nach Zugabe von 5-Aza konnte ein konzentrationsabhängig einsetzender Demethylierungseffekt, resultierend in einem unmethylierten PCR-Produkt, beobachtet werden. Dieser Effekt setzte sich bei Zugabe von TSA verstärkt fort. Unter Einwirkung der jeweils höchsten 5-Aza-Konzentration (2,5 μM) zeigt sich die Bande des unmethylierten PCR-Produktes jedoch schwächer (5-Aza) bzw. nicht mehr nachweisbar (5-Aza und TSA). Aufgrund eines beobachteten, unzureichenden Vitalitätszustands der Zellen unter Zugabe einer Kombination beider Reagenzien in genannter Konzentration kann von einem toxischen Effekt auf die Zellen ausgegangen werden.

In Abbildung 4.35, B, ist der Expressionsstatus der Zellen für *SFRP2* bzw. das Housekeeping-Gen *β -Actin* in Abhängigkeit der aufgeführten Behandlung mittels RT-PCR dargestellt. Eine *SFRP2*-Expression konnte weder in unbehandelten Zellen noch in DMSO- bzw. 5-Aza-behandelten Zellen nachgewiesen werden. Bei Zugabe des Histon-Deacetylase-Inhibitors TSA konnte jedoch mit zunehmender 5-Aza-Konzentration eine ebenfalls zunehmende *SFRP2*-Reexpression beobachtet werden.

Der gleiche Effekt ließ sich in der quantitativen Real-Time PCR in Abbildung 4.35, C und D, zeigen. Eine konzentrationsabhängige Reexpression von *SFRP2* konnte auch nach alleiniger Zugabe von 5-Aza beobachtet werden, fiel bei gleichzeitiger Zugabe von TSA jedoch deutlich stärker aus.

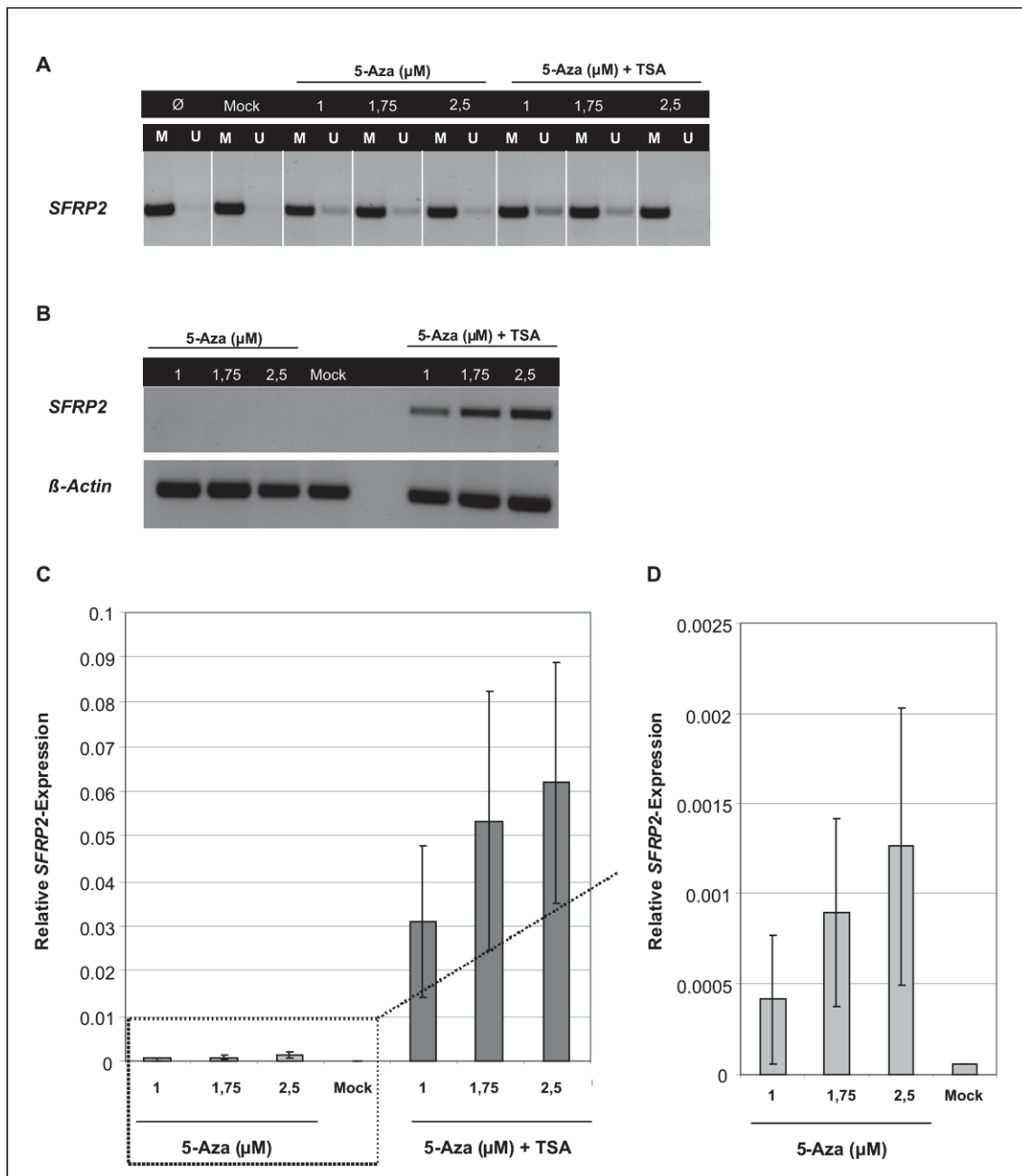


Abbildung 4.35: Methylierung, Expression und Reexpression von *SFRP2* in MCF-7-Zellen.

(A) Dargestellt ist der Methylierungszustand des *SFRP2*-Promotors der Zellen (siehe auch Abbildung 4.33) nach 96h ohne Behandlung (\emptyset), mit DMSO (Mock), 5-Aza (1, 1,75 und 2,5 μM) bzw. 5-Aza (1, 1,75 und 2,5 μM) in Kombination mit 24h TSA (300 nM) sowie (B) die relative *SFRP2* mRNA-Expression der Ansätze, ermittelt durch RT-PCR bzw. (C und D) qPCR.

4.7.3 *SFRP2* in KZT-Zelllinien

Um Rückschlüsse auf den reprimierenden Effekt der *SFRP2*-Promotormethylierung in KZT-Patienten ziehen zu können, wurden die Versuche zur Methylierung und Expression bzw. Demethylierung und Reexpression von *SFRP2* neben der Zelllinie MCF-7 auf die KZT-Zelllinien JAR, NCCIT, TE76.T und 2102EP ausgeweitet.

4.7.3.1 Methylierung und Expression

Zunächst wurde der *SFRP2*-Promotor-Methylierungsstatus der Zellen mittels methylierungsspezifischer PCR analysiert (siehe Abbildung 4.36, A).

Während der *SFRP2*-Promotor von JAR- und MCF-7-Zellen methyliert vorlag, zeigte der Promotorbereich von NCCIT- und TE76.T-Zellen keine Methylierung. 2102EP-Zellen wiesen zusätzlich zum unmethylierten PCR-Produkt eine schwache Bande für das methylierte Produkt auf.

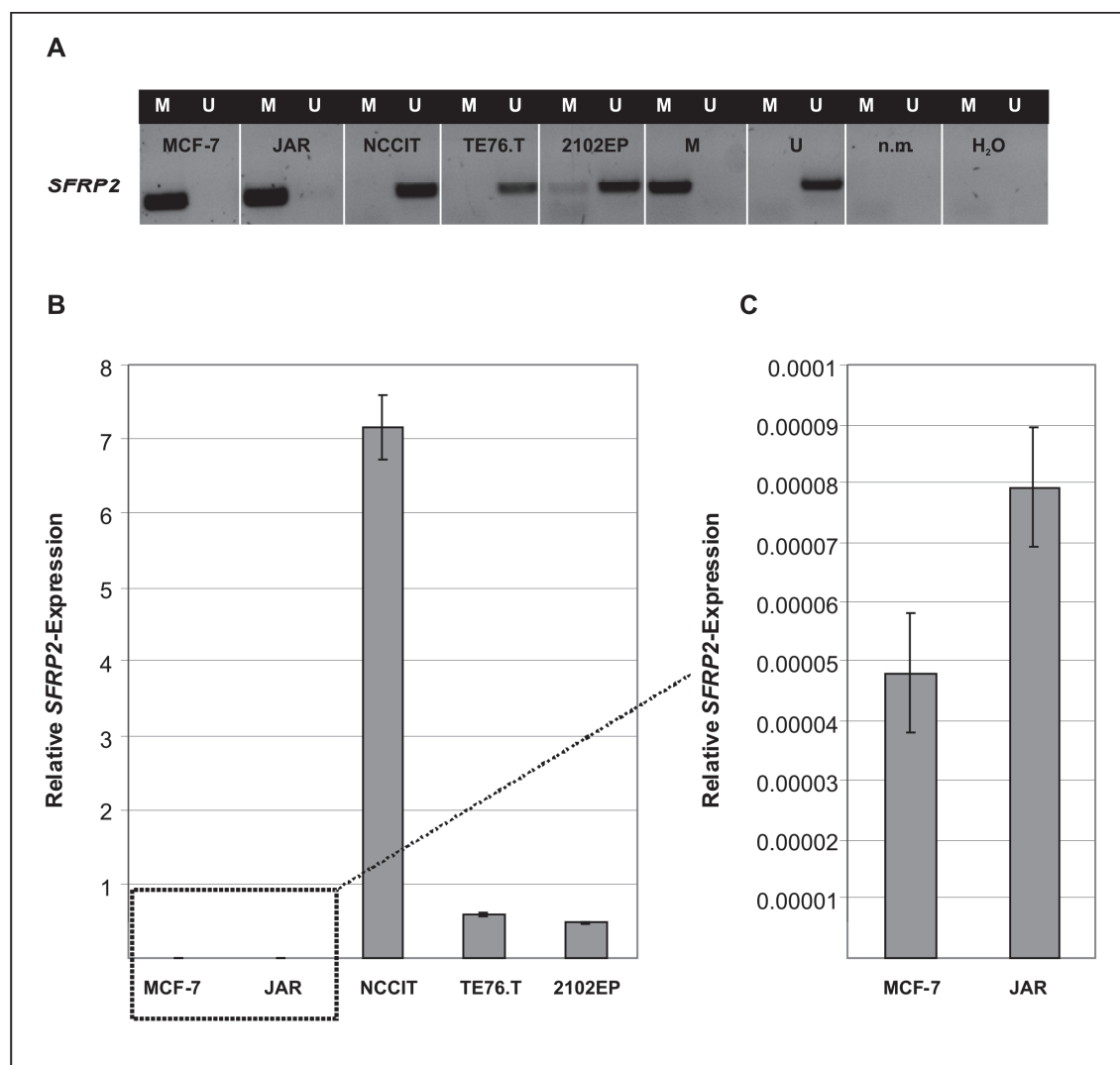


Abbildung 4.36: Methylierung und Expression von *SFRP2* in MCF-7- und KZT-Zellen.

Dargestellt ist (A) der Methylierungszustand des *SFRP2*-Promotors (siehe auch Abbildung 4.33) sowie (B und C) die relative *SFRP2*-mRNA-Expression der Mammakarzinom-Zelllinie MCF-7 und der KZT-Zelllinien JAR, NCCIT, TE76 und 2102EP. M, M-MSP bzw. Kontrolle; U, U-MSP bzw. Kontrolle; n.m., nicht-modifizierte Kontroll-DNA.

Mittels quantitativer Real-Time PCR wurde anschließend das *SFRP2*-Expressionsprofil der Zellen erstellt (siehe Abbildung 4.36, B). Verglichen mit NCCIT, TE76.T und 2102EP wurde *SFRP2* in MCF-7 und JAR, den methyliert vorliegenden

Zellen um den Faktor 10^{-5} verringert, exprimiert. Die unmethyliert vorliegende, pluripotente EC-Zelllinie NCCIT wies die höchste *SFRP2*-mRNA-Expression auf.

4.7.3.2 Demethylierung und Reexpression

Um auch in den KZT-Zelllinien JAR, NCCIT, TE76.T und 2102EP einen direkten Zusammenhang zwischen *SFRP2*-Methylierungsstatus und -Expression nachzuweisen, wurden Demethylierungsversuche mit 5-Aza und TSA an den Zellen durchgeführt.

Hierzu wurden die Zellen 96 h mit 5-Aza allein und/oder 24 h mit TSA behandelt. Da NCCIT-Zellen einen unmethylierten Promotorbereich aufwiesen (siehe Abbildung 4.36, A), wurde diese Zelllinie als Negativkontrolle mitgeführt. Wie zuvor bereits für MCF-7-Zellen gezeigt werden konnte, war lediglich für die Choriokarzinom-Zelllinie JAR ein Effekt zu erwarten. In Vorversuchen konnte ein toxischer Effekt der bei MCF-7-Zellen erfolgreich angewandten 5-Aza Konzentrationen (1,75 bzw. 2,5 μM) auf die hochproliferativen KZT-Zelllinien beobachtet werden, sodass die Versuche nur mit je 1 μM 5-Aza durchgeführt wurden. Ferner konnte sowohl ein toxischer Effekt für die Kombination beider Reagenzien auf alle Zelllinien als auch ein toxischer Effekt von 5-Aza auf die 2102EP-Zellen allein nachgewiesen werden. Für die Zelllinien JAR, NCCIT und 2102EP wurde daher eine TSA-Konzentration von 100 nM gewählt, während die Versuche an 2102EP-Zellen ohne 5-Aza durchgeführt werden mussten. Bei TE76.T-Zellen trat die Toxizität bereits bei geringen 5-Aza- bzw. TSA-Konzentrationen auf, sodass diese Zelllinie in den weiteren Versuchen nicht mitgeführt wurde. In Abbildung 4.37, A, ist der relative Expressionsstatus der Zellen für *SFRP2* und das Housekeeping-Gen *β -Actin* in Abhängigkeit der aufgeführten Behandlung dargestellt.

Eine *SFRP2*-Reexpression konnte für MCF-7-Zellen, wie in Abbildung 4.35 bereits gezeigt, lediglich für eine Kombination beider Reagenzien beobachtet werden, nicht für 5-Aza allein. Für JAR-Zellen reichte hingegen die alleinige Zugabe von 5-Aza aus, um eine Reexpression von *SFRP2* zu induzieren. Unbehandelte, DMSO- und TSA-behandelte Zellen zeigten in beiden Fällen keine *SFRP2*-Reexpression. Auf die unmethyliert vorliegende, *SFRP2* exprimierende Zelllinie NCCIT hatte eine 5-Aza- bzw. TSA-Behandlung, wie zu erwarten, keinen Einfluss. TSA als Histon-Deacetylase-Inhibitor hatte im Fall von 2102EP-Zellen allein keinen Einfluss auf die *SFRP2*-Expression der nur schwach methyliert, überwiegend unmethyliert vorliegenden Zellen. *β -Actin* wurde unabhängig von der Vorbehandlung stets gleichmäßig exprimiert.

Die Versuche zur Reexpression wurden mittels quantitativer Real-Time PCR validiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.37, B–E, dargestellt. Entsprechend Abbildung 4.35 bzw. Abbildung 4.37, A, wiesen MCF-7-Zellen die höchste *SFRP2*-Expression nach

Zugabe von 5-Aza und TSA auf. Eine Expression konnte auch für 5-Aza bzw. TSA allein beobachtet werden, war jedoch deutlich geringer (B). In JAR-Zellen war 5-Aza allein ausreichend, um *SFRP2* im Vergleich zu den unbehandelten Zellen zu reexprimieren (C). NCCIT-Zellen exprimierten *SFRP2* stärker gegenüber den anderen Zellen, zeigten jedoch verringerte Expressionslevel nach der Behandlung mit 5-Aza, TSA bzw. DMSO (D). Dies war möglicherweise auf die toxischen Effekte des jeweiligen Reagenz zurückzuführen. 2102EP-Zellen zeigten nahezu gleiche *SFRP2*-Expressionslevel in Mock-Zellen bzw. in unbehandelten Zellen, wiesen jedoch eine verringerte Expression nach TSA-Behandlung auf (E). Auch hier ist der toxische Einfluss, der bereits in der Kombination von 5-Aza und TSA deutlich wurde, zugrunde zu legen.

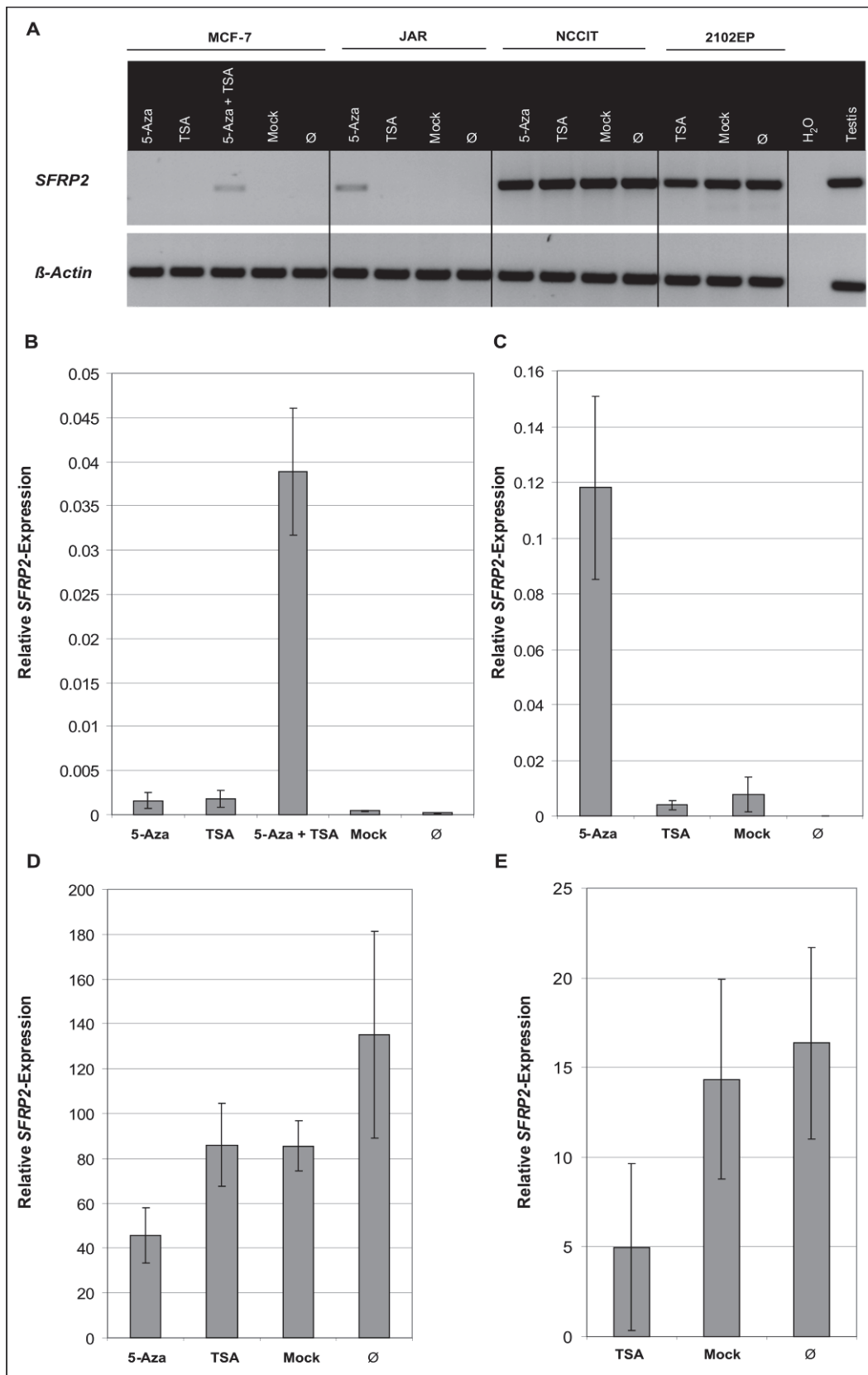


Abbildung 4.37: Reexpression von SFRP2 in MCF-7- und KZT-Zellen.

Dargestellt ist die relative SFRP2 mRNA-Expression der Zellen nach 96h mit 5-Aza (1 μ M) bzw. 5-Aza (1 μ M) und/oder 24h TSA (MCF-7, 300 nM; JAR, NCCIT und 2102EP, 100 nM), mit DMSO (Mock) sowie ohne Behandlung (\emptyset), ermittelt durch (A) RT-PCR bzw. qPCR (B, MCF-7; C, JAR; D, NCCIT, E; 2102EP).

4.8 Charakterisierung weiterer extrazellulärer Wnt-Regulatoren

Da die Ergebnisse der Expressionsversuche und funktionellen Analysen an extrazellulären Wnt-Antagonisten (s.o.) eine Beteiligung an der aberranten Wnt-Aktivierung in KZT annehmen ließen, wurden Expressionsprofile der ebenfalls extrazellulären Wnt-Regulatoren *DKK1* und *WIF1* erstellt.

4.8.1 Expressionsprofil des *DKK1*-Gens

Als epigenetisch kontrollierter, extrazellulärer Negativregulator und Zielgen des Wnt-Signalweges ist *DKK1* in der Lage, Apoptose zu induzieren und dadurch die Zellproliferation zu inhibieren (Hirata *et al.*, 2010). Kolonkarzinome weisen einen Verlust der Expression dieses Gens auf, was mit einer Aktivierung des Wnt-Signalweges einhergeht (Gonzalez-Sancho *et al.*, 2005). Daher wurde das *DKK1*-mRNA-Expressionsprofil in KZT erstellt.

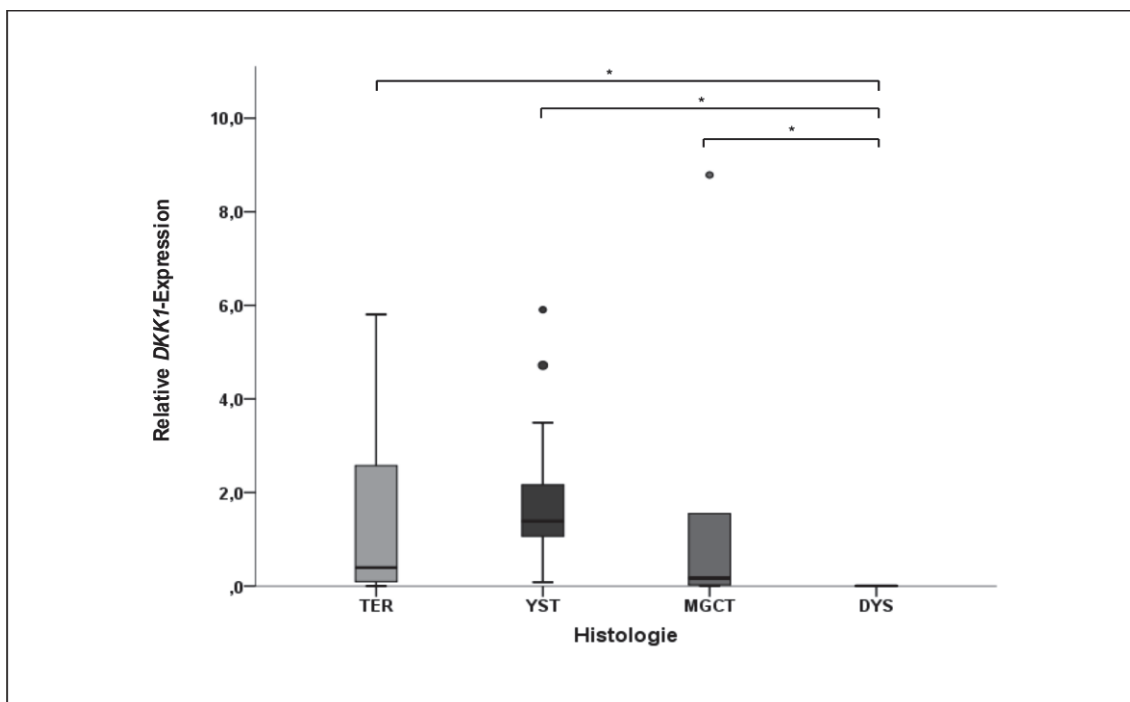


Abbildung 4.38: Relative *DKK1*-Expression in KZT.

Mittels quantitativer Real-Time PCR wurden Teratome (TER; n = 10), Dottersacktumoren (YST; n = 13), gemischte maligne KZT (MGCT; n = 9) und Dysgerminome (DYS; n = 6) analysiert. Die Normalisierung erfolgte gegen *18SrRNA*. Sterne markieren signifikante Expressionsunterschiede zwischen den Tumorentitäten, Ausreißer werden durch Kreise dargestellt (Werte und Fälle siehe Text).

In der *DKK1*-Real-Time PCR wurden Teratome (n = 10), Dottersacktumoren (n = 13), gemischte maligne KZT (n = 9) und Dysgerminome (n = 6) analysiert. Die Gruppe der Teratome umfasste dabei reife (n = 6) und unreife (n = 4) Teratome. Die logarithmisch

transformierten Werte wurden gegen *POLR2A* und *GUSB* normalisiert. Dabei zeigte sich in der Gruppe der Dysgerminome eine gegenüber den anderen Entitäten deutlich verringerte bzw. nicht vorhandene *DKK1*-Expression (siehe Abbildung 4.38). Signifikante Expressionsunterschiede konnten zwischen Teratomen und Dysgerminomen ($p = 0,009$), Dottersacktumoren und Dysgerminomen ($p = 0,001$) sowie zwischen gemischten malignen KZT und Dysgerminomen ($p = 0,008$) ausgemacht werden. Bei den Ausreißern in der Abbildung handelt es sich um die Fälle #U420 (YST), #126 (YST), #90 (MGCT; hier nicht dargestellt) und #6 (MGCT).

4.8.2 Methylierungsprofil der *DKK1*-Promotorregion

Bei *DKK1* (ENSG00000107984, Transkript ENST00000373970) handelt es sich um ein Kandidatengen für eine durch Hypermethylierung vermittelte Inaktivierung, da sich unmittelbar vor dem Transkriptionsstart in der 5'UTR sowie Exon 1 eine 137-bp große CpG-Insel befindet. In Kolonkarzinomen konnte daher, neben *APC*, auch für die transkriptionelle Stilllegung von *DKK1* eine Hypermethylierung des Promotors verantwortlich gemacht werden (Aguilera *et al.*, 2006).

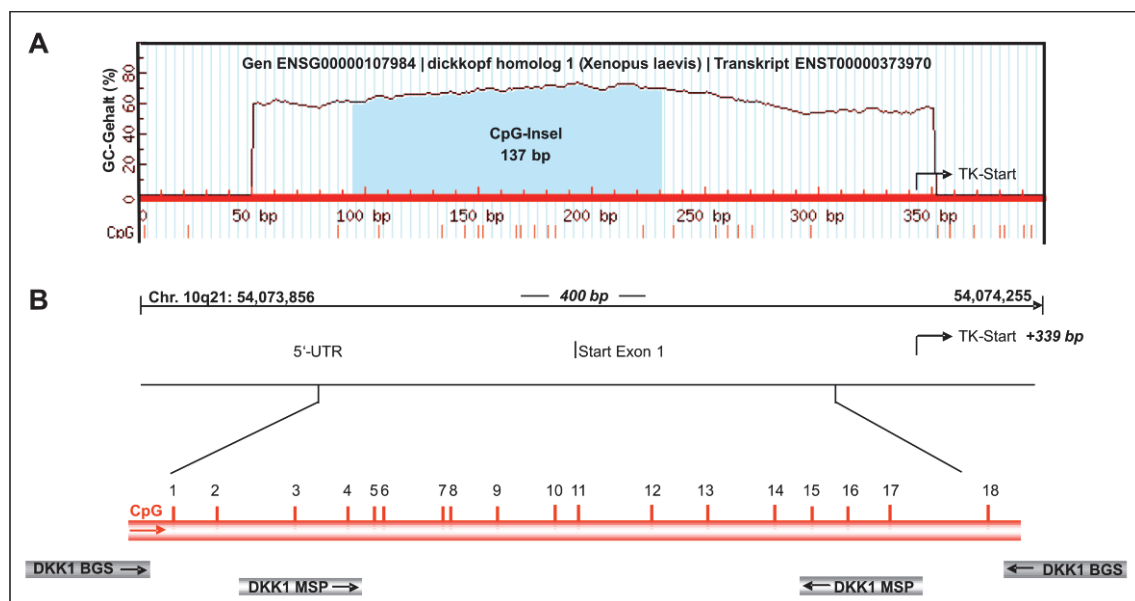


Abbildung 4.39: CpG-Insel innerhalb des *DKK1*-Promotorbereichs.

(A) Schematisch dargestellt (verändert nach: MethPrimer, <http://www.urogene.org/methprimer/index1.html>) ist der *DKK1*-Promotorbereich (ENSG00000107984, Transkript ENST00000373970) mit den analysierten CpGs innerhalb der CpG-Insel (137 bp; Kriterien: GC-Gehalt > 50%, Inselgröße > 100 bp, beobachtet/erwartet > 0,60) des Promotors. (B) Der untersuchte Bereich auf Chromosom 10q21 in der 5'UTR sowie Exon 1 umfasst insgesamt 18 CpGs. Vertikale, rote Striche repräsentieren die einzelnen CpGs; horizontale, graue Rechtecke stellen schematisch die Lage der für die MSP (siehe Abschnitt 2.8.3) bzw. BGS (siehe Abschnitt 2.8.4) verwendeten Primerpaare dar. TK-Start, Transkriptionsstart.

Um zu ermitteln, inwieweit diese epigenetische Veränderung einen Einfluss auf die Transkription des Gens in KZT besitzt, wurde die *DKK1*-Promotorregion unter Verwendung der methylierungsspezifischen PCR bzw. Bisulfitesequenzierung

untersucht. Abbildung 4.39 stellt die *DKK1*-Promotorregion graphisch dar (A). Der GC-Gehalt dieser Region auf Chromosom 10q21 liegt bei >50%, die untersuchte Region umfasst insgesamt 18 CpG-Dinukleotide (CpGs) (B), von denen die CpGs 3 und 4 sowie 15–17 in der methylierungsspezifischen PCR analysiert wurden, während in der Bisulfidsequenzierung der Methylierungsstatus aller CpGs bestimmt werden konnte.

4.8.2.1 Methylierungsstatus

Um den Status der *DKK1*-Promotormethylierung in KZT unterschiedlicher Tumorentität sowie in KZT- und MCF-7-Zellen zu vergleichen, wurden die CpGs 3 und 4 sowie 15–17 mittels methylierungsspezifischer PCR analysiert. Durchgeführt wurde diese an reifen (n = 6) und unreifen (n = 8) Teratomen, Dottersacktumoren (n = 15), gemischten malignen KZT (n = 10) und Dysgerminomen (n = 8).

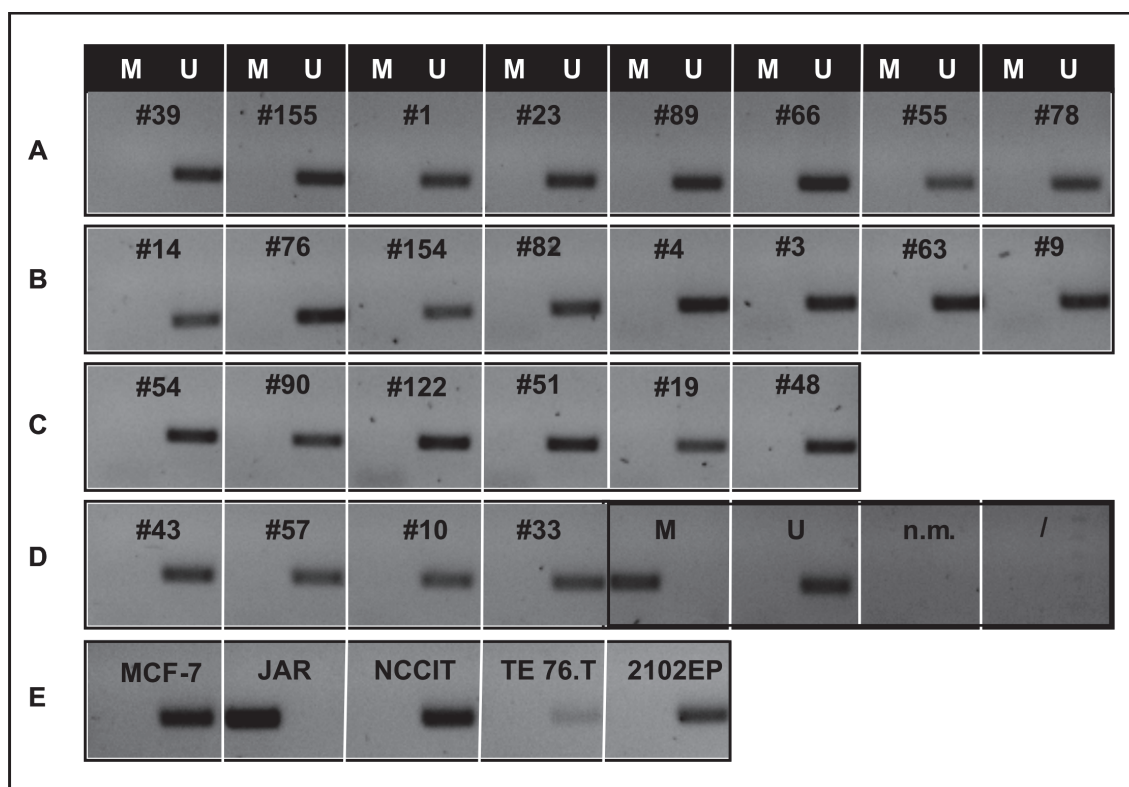


Abbildung 4.40: Methylierungsstatus des *DKK1*-Promotors in KZT.

Mittels methylierungsspezifischer PCR wurden Teratome (TER; n = 6; IT, n = 8), Dottersacktumoren (YST; n = 15), gemischte maligne KZT (MGCT; n = 10) und Dysgerminome (DYS; n = 8) analysiert. Die Spalten repräsentieren die M-MSP (M) bzw. U-MSP (U) für die jeweilige Probe. Exemplarisch dargestellt sind die Ergebnisse für (A) reife und unreife Teratome, (B) Dottersacktumoren, (C) gemischte maligne KZT, (D) Dysgerminome und PCR-Kontrollen sowie für (E) MCF-7 und KZT-Zelllinien. Die Spalten repräsentieren die M-MSP (M) bzw. U-MSP (U) für die jeweilige Probe. Die Tumoren sind mit ihrer jeweiligen Datenbank-Identnummer kodiert (#). PCR-Kontrollen: M, Positivkontrolle, universal-methylierte DNA; U, Positivkontrolle, nicht-methylierte DNA; n.m., nicht-modifizierte DNA; /, Negativkontrolle.

In Abbildung 4.40 sind exemplarisch die Ergebnisse für reife und unreife Teratome (A), Dottersacktumoren (B), gemischte maligne KZT (C), Dysgerminome und PCR-

Kontrollen (D) sowie für KZT-Zelllinien (E) dargestellt. Eine Methylierung der Promotorregion konnte für keine Tumorentität nachgewiesen werden. Den Patientenproben entsprechend wurde auch in den Wnt-positiven MCF-7-Zellen lediglich für die U-MSP ein PCR-Produkt erzeugt. Für die KZT-Zellen zeigten die CHC-Zellen JAR als einzige eine Methylierung der Promotorregion. Fall #76 wird unter Dottersacktumoren aufgeführt. Er ist jedoch aufgrund des geringen Dottersacktumor-Anteils den reifen Teratomen bzw. unreifen Teratomen zuzuordnen.

4.8.2.2 Methylierungsgrad

Die Bisulfitsequenzierung der *DKK1*-Promotorregion wurde aus Zeit- und Kostengründen nur stichprobenartig an den Fällen #4 (YST) und #63 (YST) durchgeführt und diente der Validierung der Ergebnisse der methylierungsspezifischen PCR. Dabei konnte im Gegensatz zur PCR der Methylierungsstatus aller 18 CpGs der CpG-Insel analysiert werden.

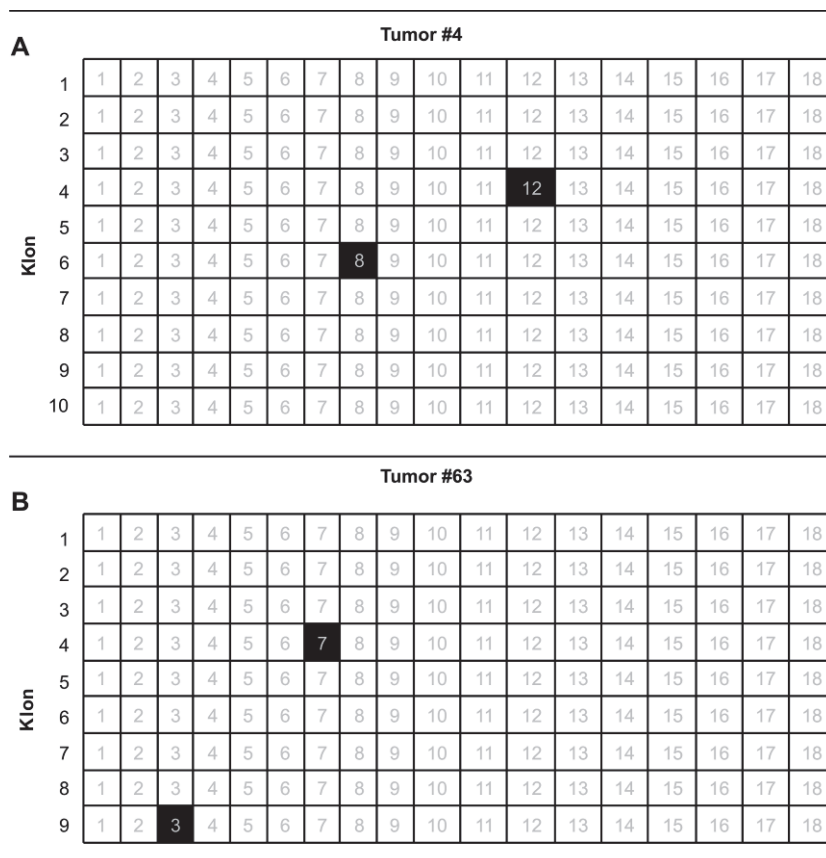


Abbildung 4.41: Methylierungsgrad des *DKK1*-Promotors der Fälle #4 und #63.

Die Dot-Diagramme stellen exemplarisch den mittels Bisulfitsequenzierung ermittelten Methylierungsstatus (**A**) der 10 Klone des Falles #4 bzw. (**B**) der 9 Klone des Falles #63 dar. Jede Reihe repräsentiert einen sequenzierten Klon, jede Spalte repräsentiert ein CpG. Die Zahlen innerhalb der Quadrate kennzeichnen das entsprechende CpG (siehe auch Abbildung 4.12). Schwarze Quadrate stellen den methylierten, weiße Quadrate den nicht-methylierten Status des jeweiligen CpGs dar.

In Abbildung 4.15 sind die Ergebnisse der analysierten Klone der Fälle #4 (A) und #63 (B) in einem Dot-Diagramm dargestellt. Schwarze Quadrate stellen den methylierten, weiße Quadrate den nicht-methylierten Status des jeweiligen CpGs dar. Der Methylierungsgrad der Promotorregion lag bei 1,1% bzw. 1,2%. Die in der methylierungsspezifischen PCR analysierten CpGs (3, 4, 15–17) lagen dabei mit Ausnahme von Klon 9 des Falls #63 unmethyliert vor.

4.8.3 Expressionsprofil des *WIF1*-Gens

Deregulierte Expressionslevel in KZT konnten im Rahmen der Arbeit für die extrazellulären Antagonisten der DKK- und SFRP-Familie gezeigt werden (siehe Abschnitte 4.6 und 4.8.1). *WIF1*, welches sich sowohl in seiner Struktur als auch in den Zielmolekülen von diesen unterscheidet (siehe Abschnitt 1.2.3), liegt in zahlreichen soliden Krebserkrankungen inaktiviert vor (Wissmann *et al.*, 2003). Die Analyse der *WIF1*-mRNA-Level war das abschließende Ziel der Untersuchungen.

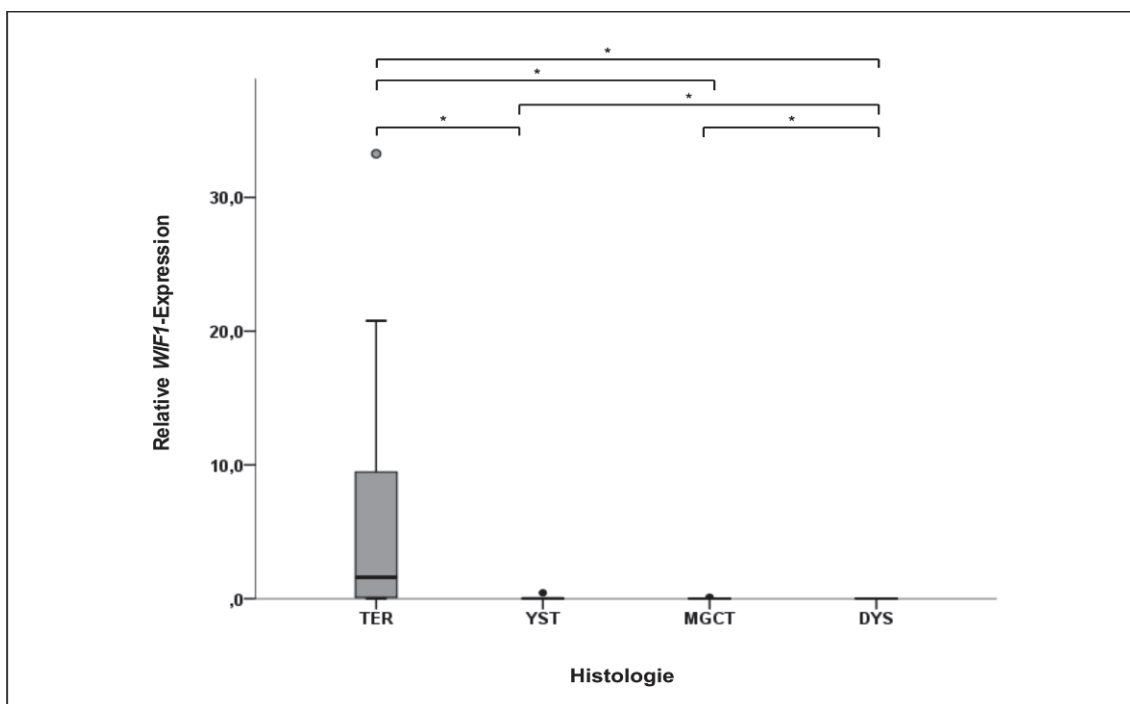


Abbildung 4.42: Relative *WIF1*-Expression in KZT.

Mittels quantitativer Real-Time PCR wurden Teratome (TER; n = 10), Dottersacktumoren (YST; n = 11), gemischte maligne KZT (MGCT; n = 6) und Dysgerminome (DYS; n = 6) analysiert. Die Normalisierung erfolgte gegen *POLR2A* und *GUSB*. Sterne markieren signifikante Expressionsunterschiede zwischen den Tumorentitäten, Ausreißer werden durch Kreise dargestellt (Werte und Fälle siehe Text).

In der *WIF1*-Real-Time PCR wurden Teratome (n = 10), Dottersacktumoren (n = 11), gemischte maligne KZT (n = 6) und Dysgerminome (n = 6) analysiert. Die Gruppe der Teratome umfasste dabei reife (n = 6) und unreife (n = 4) Teratome. Die logarithmisch transformierten Werte wurden gegen *POLR2A* und *GUSB* normalisiert. Dabei zeigte

sich, vergleichbar mit *DACT3* (siehe Abbildung 4.23), bei *WIF1* stark exprimierenden Teratomen eine gleichzeitig signifikant verminderte, kaum nachweisbare *WIF1*-Expression in Dottersacktumoren ($p = 0,001$), gemischten malignen KZT ($p = 0,005$) und Dysgerminomen ($p = 0,001$) (siehe Abbildung 4.42). Signifikante Expressionsunterschiede konnten ebenfalls zwischen gemischten malignen KZT und Dysgerminomen ($p = 0,025$) sowie zwischen Dottersacktumoren und Dysgerminomen ($p = 0,004$) ausgemacht werden. Bei den Ausreißern in der Abbildung handelt es sich um die Fälle #76 (TER), #U3 (YST) und #6 (MGCT).

5 DISKUSSION

Die Entwicklung und Progression maligner Tumoren ist mit Veränderungen in Signalwegen assoziiert, die in grundlegende Prozesse wie Proliferation und Differenzierung eingreifen. Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges in Keimzelltumoren, an denen wesentliche Schritte der Tumorprogression modellhaft nachvollzogen werden können. Um diese klinisch fassbaren Schritte molekularbiologisch zu charakterisieren, wurden zentrale intra- und extrazelluläre Regulatoren des Wnt/ β -Catenin-Signalweges auf genetische und epigenetische Aberrationen sowie Veränderungen ihrer Expressionsmuster untersucht. Zu diesem Zweck wurde Material von insgesamt 50 Patienten unterschiedlicher Tumorsubentitäten analysiert.

5.1 Konstitutive Wnt-Aktivierung in Keimzelltumoren

5.1.1 Subtypen-spezifische Expression von β -Catenin

Eine erhöhte Expression des β -Catenin-Gens (*CTNNB1*) geht mit einer Stabilisierung des zytosolischen Proteins sowie mit dessen vermehrter nukleärer Akkumulation einher und stellt eine regelhafte Veränderung des konstitutiv aktivierten kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalweges dar (siehe Abschnitt 1.2.1). Grundlegend für weitere Experimente wurde das Expressionsprofil dieses Schlüsselregulators sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene analysiert. Eine differentielle *CTNNB1*-Expression in den unterschiedlichen Tumorsubentitäten wurde ebenfalls auf Proteinebene deutlich. Die signifikant erhöhte Expression des Gens in Dottersacktumoren ging mit einer nukleären Translokation des Proteins einher (siehe Abschnitt 4.2.1).

Die Ergebnisse lassen sich mit einer Studie, die zudem Grundlage dieser Arbeit war, vergleichen. An Keimzelltumoren des Kindes- und Jugendalters ermöglichte eine signifikant unterschiedliche Expression von β -Catenin eine Diskriminierung von Dottersacktumoren und Dysgerminomen. Mittels Gewebe-Microarray konnte in allen Dottersacktumoren altersunabhängig eine hohe β -Catenin-Expression nachgewiesen werden, die in 50–70% der Fälle mit einer nukleären Akkumulation einherging. Den vorgelegten Ergebnissen entsprechend wurde letztere weder in Germinomen, noch in Embryonalen Karzinomen oder Choriokarzinomen beobachtet (Fritsch *et al.*, 2006). Die Autoren beschreiben auch für nahezu alle unreifen Teratome, wie ebenfalls für mehr als die Hälfte der reifen Teratome, eine gesteigerte Proteinexpression sowie eine nukleäre Translokation von β -Catenin (siehe Abbildung 1.11). Eine nukleäre Lokalisation von β -Catenin wurde im Rahmen dieser Arbeit in Teratomen aller Reifegrade jedoch – von einer Ausnahme abgesehen – nicht bestätigt. Die Ergebnisse

stehen damit im Widerspruch zu dieser Publikation. Möglicherweise kann das jedoch auf die geringen Fallzahlen in den immunhistochemischen Untersuchungen zurückgeführt werden. Die Analyse weiterer Tumoren wäre notwendig, um dies abschließend zu klären. Die konkordanten Expressionsdaten auf mRNA- und Proteinebene belegen jedoch die Plausibilität der vorgelegten Daten und können eine nukleäre Expression von β -Catenin in Teratomen nicht ausschließen lassen.

Eine aberrante Expression von β -Catenin scheint nicht spezifisch für Keimzelltumoren des Kindesalters zu sein. Dies zeigt eine Studie an testikulären Keimzelltumoren des Erwachsenenalters, in der eine β -Catenin-Expression in nahezu allen nicht-seminomatösen Tumoren, nicht aber in Seminomen bzw. Dysgerminomen nachzuweisen ist. Eine nukleäre Translokation konnte dabei jedoch lediglich in der Minderheit der Nicht-Seminome beobachtet werden (Honecker *et al.*, 2004a). Entsprechend konnte eine weitere an adulten Keimzelltumoren durchgeführte Studie in Embryonalen Karzinomen sowie in der EC-Zelllinie NT2/D1 eine starke membranöse und zytoplasmatische, jedoch keine nukleäre Lokalisation von β -Catenin detektieren. Seminome zeigten lediglich eine auf die Zellmembranen beschränkte β -Catenin-Expression (Korkola *et al.*, 2006).

Die Resultate der Studien unterstützen die wesentlichen Ergebnisse der hier vorgestellten Arbeit. Von einer Aktivierung des Wnt-Signalweges ist daher sowohl in Dottersacktumoren als auch in Teratomen, nicht aber in Dysgerminomen auszugehen.

Wnt-Aktivierung beruht nicht auf Veränderungen im β -Catenin-Gen

Die Ursache für eine konstitutive Aktivierung kann in Veränderungen verschiedener Wnt-Regulatoren liegen, die überwiegend über eine Hemmung der β -Catenin-Degradation in den Wnt-Signalweg eingreifen. Mutationen im β -Catenin-Gen (*CTNNB1*) selbst werden dabei häufig nachgewiesen (Koch *et al.*, 1999; Buendia, 2000). In der Literatur sind *CTNNB1*-Mutationen in Keimzelltumoren bisher nur ansatzweise beschrieben. Die Heteroduplex-Analyse einer Fallstudie wies mit einer zusätzlichen Bande für das Germinom eines 15-Jahre alten Jungen, nicht jedoch für das Teratom einer erwachsenen Frau, auf eine Veränderung in *CTNNB1* hin. Die der aberranten Bande tatsächlich zugrunde liegenden Veränderungen wurden jedoch nicht weiter untersucht (Pecina-Slaus *et al.*, 2007).

Die in dieser Arbeit in verschiedenen histologischen Subentitäten durchgeführten Mutationsanalysen an Exon 3 von *CTNNB1* wiesen keine Mutationen in dem Bereich auf (siehe Abschnitt 4.2.2). Dieses Ergebnis ist einerseits konsistent mit anderen Arbeiten. So können zahlreiche Studien an humanen Tumoren eine β -Catenin-Akkumulation vergleichsweise selten auf Mutationen in *CTNNB1* selbst zurückführen (Sugimachi *et al.*, 2001; Haydon *et al.*, 2002; Bellei *et al.*, 2004). Gleichzeitig gehen andere Studien jedoch davon aus, dass bis zu 50% der Kolonkarzinome ohne inaktivierende APC-Mutationen Mutationen im Exon 3 von *CTNNB1* aufweisen (Ilyas

et al., 1997; Morin *et al.*, 1997; Iwao *et al.*, 1998; Sparks *et al.*, 1998; Salahshor *et al.*, 1999). Zudem finden sich typische *CTNNB1*-Mutationen auch in anderen embryonalen Tumoren des Kindesalters, wie beispielsweise den Medullo- und Hepatoblastomen (Koch *et al.*, 2001). Die tatsächliche Frequenz der *CTNNB1*-Mutationen in Tumoren mit Wnt-Aktivierung bleibt damit bis heute weitestgehend unklar; in Keimzelltumoren scheinen sie jedoch nicht regelhaft aufzutreten.

Mutationen in *CTNNB1* können auch außerhalb der regulatorischen Domäne von Exon 3 auftreten (Ilyas *et al.*, 1997; Lovig *et al.*, 2002), die funktionellen Konsequenzen dieser Mutationen sind jedoch noch nicht umfassend charakterisiert. Davon ausgehend, dass aktivierende Mutationen vorherrschend Exon 3 des *CTNNB1*-Gens betreffen, scheinen Veränderungen in *CTNNB1* selbst nicht für die aberrante Aktivierung des Signalweges in Keimzelltumoren verantwortlich zu sein.

5.1.2 β -Catenin induziert Zielgenexpression

Die mit der nukleären Translokation von β -Catenin einhergehende Transaktivierung spezifischer Wnt-Zielgene, die elementare Prozesse steuern (Ziegler *et al.*, 2005; Turashvili *et al.*, 2006) und oftmals eine grundlegende Bedeutung für die Tumorgenese spielen (Goss und Groden, 2000; Moon *et al.*, 2002), stellt ein wichtiges Merkmal eines aktivierten Wnt-Signalweges dar. Zu den prominentesten Zielgenen des Wnt-Signalweges gehören die Proto-Onkogene *c-MYC* und *CCND1* (siehe Abschnitt 1.2.2), die während des Zellzyklus den Übergang von der G1- in die S-Phase steuern und dadurch die Proliferation der Zellen induzieren.

In einer Studie an humanen EC-Zellen der NCCIT-Zelllinie, die mit aktiven Wnt-Proteinen stimuliert wurden, konnten rund 50 Gene identifiziert werden, die bereits unmittelbar nach Zugabe der Wnt-Moleküle hochreguliert vorlagen. Diese umfassten neben den bereits bekannten Wnt-Zielgenen *CCND1* und *c-MYC* auch zahlreiche neue Gene (Willert *et al.*, 2002). Im Gegensatz zu einer erhöhten *CCND2*-Expression in adulten, testikulären Keimzelltumoren (Houldsworth *et al.*, 1997), wurde eine *CCND1*-Überexpression in pädiatrischen Keimzelltumoren bisher noch nicht beschrieben.

Eine erhöhte Expression der Zielgene *CCND1* und *c-MYC* kann in dieser Arbeit insbesondere in Teratomen nachgewiesen werden. Diese wird, im Fall von *CCND1*, von einer hohen *CCND1*-Expression in Dottersacktumoren begleitet (siehe Abschnitt 4.2.3). Damit entspricht das Expressionsprofil grundsätzlich dem der *CTNNB1*-Expression, sodass von einer Wnt-Aktivierung in Teratomen und Dottersacktumoren ausgegangen werden kann. Die hohen *CCND1*-Level tragen vermutlich zum zunehmend undifferenzierten, und damit malignen, Status der Tumoren bei. Vergleichbare Muster haben sich bereits in anderen embryonalen Tumoren, speziell in Neuroblastomen, zeigen lassen (Molenaar *et al.*, 2008). Dabei scheint eine

Überexpression von β -Catenin bereits im Zytoplasma die Cyclin D1-Expression zu triggern und eine maligne Transformation von Tumoren zu fördern (Utsunomiya *et al.*, 2001). Allgemein scheint die Überexpression bzw. die Amplifikation von *CCND1* ein frühes Ereignis in der Tumorgenese darzustellen und mit einem erhöhten Risiko der Tumorprogression und der Metastasierung zu korrelieren (Gansauge *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2004).

Das onkogene Potential von *c-MYC*

Neben unterschiedlichen hämatopoetischen Erkrankungen, bei denen es im Rahmen von chromosomalen Translokationen zu einer permanenten Aktivierung von *c-MYC* kommen kann, ist eine Überexpression des Gens auch in verschiedenen soliden Tumoren nachweisbar (Popescu und Zimonjic, 2002). Hierzu zählen neben den kolorektalen Karzinomen (He *et al.*, 1998) auch embryonale Tumoren. So ist in Medulloblastomen des Kindesalters die erhöhte Expression und Amplifikation von *c-MYC*, ebenso wie eine geringfügige (*'low-level'*) Veränderung der Kopienzahl, mit einer ungünstigen Prognose der Patienten assoziiert. Medulloblastome können dabei eine Aktivierung des Wnt-Signalweges zeigen (Scheurlen *et al.*, 1998; Grotzer *et al.*, 2001; Rutkowski *et al.*, 2007; Zitterbart *et al.*, 2010). Auch im Fall von *n-MYC*, bei dem es sich um ein Homolog von *c-MYC* in Neuroblastomen handelt, ist eine Amplifikation des Gens mit einer ungünstigen Prognose assoziiert (Cohn und Tweddle, 2004).

Eine Hochregulierung von *c-MYC*, wie in Teratomen beobachtet, liefert damit einerseits einen Hinweis auf einen aktivierten Wnt-Signalweg. Andererseits kann diese Überexpression gleichzeitig weitere *Downstream*-Effekte hervorrufen, die der Onkogenese entgegenwirken. So induziert die Expression von *c-MYC* neben proliferativen auch apoptotische Vorgänge (Askew *et al.*, 1991; Evan *et al.*, 1992; Shi *et al.*, 1992; Harrington *et al.*, 1994; Dang, 1999). Dies scheint insbesondere im Zusammenhang mit zellulärem Stress (u.a. ausgelöst durch Wachstumsfaktormangel, Strahlung, unzureichende Sauerstoffversorgung (Hypoxie) oder Chemotherapie) der Fall zu sein (Evan *et al.*, 1992; Maclean *et al.*, 2003; Albiñ *et al.*, 2006). Frühe Studien identifizierten den Tumorsuppressor *p53* als direktes Zielgen von *c-MYC* (Reisman *et al.*, 1993; Roy *et al.*, 1994) und gehen davon aus, dass die *c-MYC*-induzierte Apoptose insbesondere auf *p53* zurückzuführen ist (Hermeking und Eick, 1994). Möglicherweise liefert die *c-MYC*-Expression damit einen Hinweis auf eine Art „rettenden“ Mechanismus zur Verhinderung einer onkogenen Aktivierung in Teratomen.

Im Gegensatz zu Teratomen exprimieren Dottersacktumoren *c-MYC* jedoch auf einem deutlich niedrigeren Niveau. Dies stellt zunächst ein unerwartetes Ergebnis dar, lässt sich jedoch durch folgenden Mechanismus erklären. In Abhängigkeit des Zelltyps (normale Zelle versus Tumorzelle), kann eine Hoch- bzw. Runterregulierung von *c-MYC* in unterschiedlichen biologischen Funktionen *in vivo* resultieren (Soucek und Evan, 2010). Während nun niedrige Level von *c-MYC* in somatischen Zellen die

Zellproliferation induzieren, führen deregulierte niedrige Level zur Tumorgenese in zahlreichen Geweben. Um Tumorsuppressormechanismen wie die Apoptose oder den ARF/p53-Signalweg zu aktivieren, werden jedoch substantiell hohe Level an c-MYC benötigt. So gehen Murphy *et al.* davon aus, dass ein auf niedrigem Level dereguliertes *Myc* einen wesentlich effizienteren Initiator der Onkogenese darstellt als überexprimiertes *Myc* (Murphy *et al.*, 2008). Initial hohe *Myc*-Level scheinen den Beginn der Tumorgenese hingegen noch zu erschweren (Murphy *et al.*, 2008; Tran *et al.*, 2008).

Alternative Mechanismen der Transkriptionsregulation

Anhand der subtypenspezifischen Zielgen-Expression kann zwar von einer Wnt-Aktivierung in Teratomen und Dottersacktumoren ausgegangen werden – es sollte dabei jedoch nicht unbeachtet bleiben, dass eine Transkriptionsregulation von Genen in der Regel vielfältigen Mechanismen unterliegt und eine Expression oder Suppression der Zielgene nicht ausschließlich auf eine Aktivierung des Wnt-Signalweges zurückzuführen sein muss. So kann *CCND1* beispielsweise auch durch Genamplifikation (Bartkova *et al.*, 1994a; Bartkova *et al.*, 1994b) oder chromosomale Translokation hochreguliert werden (Arber *et al.*, 1996). Der *CCND1*-Promotor besitzt zudem zahlreiche weitere Bindestellen für Transkriptionsfaktoren (wie sSTATS, CRE, NF- κ B oder TCF), sodass auch verschiedene Onkogene die Fähigkeit besitzen, die *CCND1*-Promotoraktivität zu induzieren – aktiviertes Ras kann die Transkription von *CCND1* durch das CRE-Bindeprotein (CREB) sowie die NF- κ B-Bindestellen erhöhen (Joyce *et al.*, 1999; Tetsu und McCormick, 1999). Durch die Entdeckung einer hochkonservierten Bindestelle des Transkriptionsfaktors GATA3 unmittelbar vor dem Transkriptionsstart von *CCND1* konnte in Neuroblastomen GATA3 als mitverantwortlich für die Überexpression von *CCND1* gemacht werden (Molenaar *et al.*, 2010). Da insgesamt mehr als 50 Regulatoren beschrieben wurden, die über den *CCND1*-Promotor agieren (Wang *et al.*, 2004), kann eine Regulation von *CCND1* auch anderen Signalwegen unterliegen. Seine vier TCF-Bindestellen machen Cyclin D1 jedoch zu einem bevorzugten Ziel des Wnt-Signalwegs. In Kolonkarzinomzellen wird seine Promotoraktivität in einer dosisabhängigen Weise als Reaktion auf β -Catenin verstärkt (Tetsu und McCormick, 1999).

Um differentiell verringerte Genexpressionslevel in Keimzelltumoren zu erklären, ist ebenso eine (zusätzliche) Regulation durch miRNAs denkbar. MiRNAs regulieren die Expression von Genen über eine translationale Repression und Destabilisierung der mRNA (Esquela-Kerscher und Slack, 2006). Letztere kann über Veränderungen der mRNA-Expression detektiert werden (Lim *et al.*, 2005; Calin und Croce, 2006). Eine Regulation der Zielgene *CCND1* und *c-MYC* durch miRNAs ist bekannt. So konnten 2008 die *CCND1*-mRNA sowie die *WNT3A*-mRNA als Ziele des miR-15a-miR-16-1-Clusters entdeckt werden (Bonci *et al.*, 2008; Aqeilan *et al.*, 2010). Die *c-MYC*-mRNA scheint hingegen ein spezifisches Ziel sowohl des hsa-mir-34b- als auch des hsa-miR-9-1-Clusters zu sein (Leucci *et al.*, 2008; Onnis *et al.*, 2010).

Über die Rolle von miRNAs in Keimzelltumoren war lange Zeit wenig bekannt. Nachdem zunächst 156 miRNAs in adulten gonadalen Keimzelltumoren analysiert wurden und eine spezifische Hochregulierung des hsa-miR-371-373-Clusters detektiert werden konnte (Gillis *et al.*, 2007), hat eine aktuelle Arbeit ein noch umfassenderes miRNA-Profil in malignen Keimzelltumoren erstellt (Palmer *et al.*, 2010). Durch eine signifikante Hochregulierung der Cluster miR-371-373 sowie miR-302 konnten mRNAs identifiziert werden, deren Repression eine Rolle in biologisch signifikanten Signalwegen spielt.

Fazit

In den typischen histologischen Subentitäten der Keimzelltumoren des Kindesalters, Teratomen und Dottersacktumoren, konnte eine Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges nachgewiesen werden. Diese geht mit einer Subtypen-spezifischen Expression des Schlüsselproteins β -Catenin einher und resultiert in der aberranten Expression spezifischer Wnt-Zielgene. Dysgerminome als typische Vertreter der germinomatösen Keimzellumoren bei Erwachsenen zeigen hingegen keine Aktivierung des Signalweges.

5.2 Deregulation von Wnt-Komponenten fördert Tumorprogression

Die klinische Progression vom Teratom zum Dottersacktumor korreliert genetisch mit einer Zunahme chromosomaler Veränderungen (Schneider *et al.*, 2002; Veltman *et al.*, 2005; Harms *et al.*, 2006). Während Teratome einen balanzierten diploiden Karyotyp zeigen, sind Dottersacktumoren häufig aneuploid und zeigen rekurrente chromosomale Imbalancen der Chromosomen 1, 6q und 20 (siehe Abschnitte 1.1.4 und 1.1.5). Genomische Instabilität ist ein Kennzeichen zahlreicher Tumorerkrankungen und kann allgemein für eine Initiation oder Progression der Tumorgenese verantwortlich gemacht werden (Jallepalli und Lengauer, 2001).

5.2.1 Assoziation der Wnt-Aktivierung mit chromosomaler Instabilität

In der kolorektalen Karzinogenese sind zwei alternative Hauptformen genomischer Instabilität bekannt. Chromosomale Instabilität (CIN) ist in 65–70% der Kolonkarzinome vorhanden und tritt in Tumorzellen in Form von zahlreichen strukturellen oder numerischen chromosomalen Veränderungen in Erscheinung. Diese gehen häufig mit Aneuploidie oder Polyploidie einher (Miyazaki *et al.*, 1999). Mikrosatelliten-Instabilität (MSI) stellt die zweite Form genomischer Instabilität dar. Diese kann in 15% der sporadischen Kolonkarzinome beobachtet werden, während 85% der Tumoren als Mikrosatelliten-stabil (MSS) kategorisiert werden (Lengauer *et al.*, 1998; Jass *et al.*, 2002). Lange Zeit ging man davon aus, dass MSS-Tumoren

chromosomal-instabil (CIN+) und MSI-Tumoren chromosomal-stabil (CIN-) seien (Lengauer *et al.*, 1997) – die beiden Hauptformen demnach nicht miteinander einhergehen. Jüngere Arbeiten widersprechen dieser Theorie jedoch und weisen auf zwei zusätzliche Gruppen in Kolonkarzinomen hin, MSS CIN- und MSI CIN+ (Hawkins *et al.*, 2001; Giaretti *et al.*, 2003; Jones *et al.*, 2005; Dyrso *et al.*, 2011). Eine MSI geht in der Regel mit einer gestörten Mismatchreparatur einher und ist daher mit einem ungünstigen Ansprechen auf eine Chemotherapie assoziiert (Zaanan *et al.*, 2011).

Die Frage, ob genomische Instabilität den Grund oder die Konsequenz der Karzinogenese darstellt, wird bereits seit langer Zeit kontrovers diskutiert (Lengauer *et al.*, 1997; Rajagopalan *et al.*, 2003; Sieber *et al.*, 2003). So gehen Rajagopalan *et al.* davon aus, dass genomische Instabilität weder die treibende Kraft hinter der Karzinogenese noch das initiiierende Ereignis für das Wachstum von sporadischen Tumoren darstellt (Rajagopalan *et al.*, 2003). Hadjihannas und Behrens wiederum vermuten, dass es sich bei CIN letztlich um einen entscheidenden initiiierenden Faktor bei der Progression und Malignisierung von Tumoren handelt (Hadjihannas und Behrens, 2006). Grundsätzlich ist auch CIN mit einer schlechten Prognose der Patienten verbunden (Walther *et al.*, 2008). Auch in testikulären Keimzelltumoren des Erwachsenenalters haben aneuploide Ereignisse und CIN weitreichende Folgen und werden für die Transformation von Vorläufer-Läsionen (CIS, Carcinoma *in situ*) zu invasiven testikulären Seminomen und Nichtseminomen verantwortlich gemacht (di Pietro *et al.*, 2005). Da MSI hingegen lediglich in einem Drittel der Tumoren beobachtet werden kann, scheinen Aneuploidie und CIN für die Entwicklung von Keimzelltumoren eine bedeutendere Rolle zu spielen (von Eyben, 2004).

Die zugrundeliegenden molekularen Ursachen für genomische Instabilität sind noch nicht vollständig verstanden. Als hauptverantwortlich werden jedoch Defekte im mitotischen *Checkpoint* – einem Kontrollmechanismus, der die zeitliche Abfolge der Mitose reguliert – gemacht (Wassmann und Benezra, 2001). Gene, die für die Förderung genomischer Instabilität in Betracht kommen, können anhand ihrer Funktion in verschiedene Gruppen eingeteilt werden und liegen inaktiv vor oder zeigen eine Veränderung ihrer Expressionslevel (Grady, 2004). Über die Funktion der mitotischen *Checkpoint*-Kontrolle sowie die Expression entsprechender Regulatoren in Keimzelltumoren lagen lange keine Daten vor. In einer aktuellen Arbeit konnten Fung *et al.* in 75% der analysierten testikulären Keimzelltumoren bzw. Keimzelltumor-Zelllinien mitotische *Checkpoint*-Defekte als ein häufig auftretendes Ereignis identifizieren (Fung *et al.*, 2007). Diese gingen zudem mit einer signifikant verringerten Expression von MAD2 (mitotic arrest deficient 2), einem Schlüsselregulator der mitotischen Kontrolle, einher. Eine aberrante MAD2-Expression könnte daher zu der chromosomalen Instabilität in testikulären Keimzelltumoren des Erwachsenenalters beitragen.

Mit *Conductin* handelt es sich um ein im Rahmen dieser Arbeit analysiertes Gen, das in der Literatur bereits umfassend im Zusammenhang mit CIN beschrieben wurde

(Hadjihannas und Behrens, 2006; Hadjihannas *et al.*, 2006). Offenbar besteht eine Korrelation zwischen einer gesteigerten *Conductin*-Expression und einem erhöhten Auftreten chromosomaler Veränderungen, deren Ursache in der fehlenden Kontrolle des Mitose-*Checkpoints* begründet zu liegen scheint. So greift das Gen neben seiner Funktion als negativer *feed-back*-Regulator des Wnt-Signalweges ebenfalls in die Kontrolle des Mitose-*Checkpoints* ein. Da *Conductin* ein unmittelbares Zielgen des Wnt-Signalweges ist, kann eine Wnt-Aktivierung über eine erhöhte *Conductin*-Expression Einfluss auf die chromosomale Stabilität in den betreffenden Tumorzellen nehmen (Koch *et al.*, 2004). In der überwiegenden Anzahl kolorektaler Tumoren ist eine *Conductin*-Überexpression nachweisbar (Lustig *et al.*, 2002). Entsprechend wurde in dieser Arbeit eine signifikant erhöhte *Conductin*-Expression in Dottersacktumoren gegenüber Dysgerminomen deutlich (siehe Abschnitt 4.4). In seiner Funktion als Zielgen einer β -Catenin-induzierten Aktivierung lässt das zum einen auf eine Aktivierung des Signalweges schließen, die ebenfalls für Teratome geltend gemacht werden kann. Gleichzeitig lässt das Resultat, in Übereinstimmung mit den Daten der negativen *feed-back*-Regulatoren *WTX* und *DKK1* (siehe Abschnitt 5.2.3), vermuten, dass die Wnt-Aktivierung in Keimzelltumoren im Allgemeinen, in Teratomen im Speziellen, durch eine Hochregulierung dieser Komponenten „begrenzt“ wird. Für diese Hypothese einer „maximalen“ Wnt-Aktivierung in Dottersacktumoren, nicht aber in Teratomen, spricht ebenfalls die Tatsache, dass zentrale Inhibitoren des Wnt-Signalweges, wie *WIF1* und *DACT3* (siehe Abschnitt 5.2.2), in Teratomen, nicht aber in Dottersacktumoren, exprimiert werden.

Inwieweit der Wnt-Signalweg im Allgemeinen bzw. *Conductin* im Speziellen über die Induktion von CIN einen Beitrag zur Progression der Keimzelltumoren leistet, kann im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden. Die hier vorgelegten Daten illustrieren jedoch eine erstaunliche Parallelität in der Progression von Kolon-Adenomen zu -Karzinomen bzw. von Teratomen zu Dottersacktumoren. In beiden Fällen geht eine gesteigerte *Conductin*-Expression mit dem Zugewinn chromosomaler Imbalancen einher. Mit *Conductin* ist daher möglicherweise ein erster Wnt-Regulator in Keimzelltumoren des Kindesalters identifiziert worden, der in diesem Zusammenhang Erwähnung finden kann.

5.2.2 Malignisierendes Potential von Wnt-Antagonisten

Hinweise auf progressionsrelevante Ereignisse in Keimzelltumoren können durch die Untersuchung Wnt-assoziiertes, subtypenspezifischer Genexpressionsprofile von Wnt-Agonisten und Wnt-Antagonisten gewonnen werden. Eine subtypenspezifische Genregulation von Wnt-Komponenten wurde bereits bei adulten Keimzelltumoren beschrieben. Ein hinsichtlich der Expression verschiedener Wnt-Regulatoren durchgeführter Vergleich identifizierte differentielle Genexpressionslevel in Seminomen und Embryonalen Karzinomen im Vergleich zu Dottersacktumoren und Teratomen (Skotheim *et al.*, 2005). So wiesen letztere relativ erhöhte Genexpressionslevel der Wnt-Komponenten *FZD4*, *FZD7*, *AES*, *DKK1*, *TCF7L1*, *TCF7L2*, *ID2* und *SLC2A1* auf, während in Seminomen und Embryonalen Karzinomen lediglich *FRAT2* hochreguliert vorlag. Die Autoren hielten die Aktivierung des Wnt-Signalweges demnach für einen Schlüsselschritt bei der Transition von pluripotenten, undifferenzierten Embryonalen Karzinomen zu differenzierteren Nichtseminomen.

Eine Arbeit von Korkola *et al.* widmet sich im Gegensatz zu Skotheim *et al.* gezielt Veränderungen des humanen Chromosoms 12p (Skotheim *et al.*, 2005; Korkola *et al.*, 2006). Amplifikationen von 12p finden sich nicht nur in adulten Keimzelltumoren (Chaganti und Houldsworth, 2000), sondern auch in weiteren humanen Neoplasien, einschließlich Ösophagus- (Yen *et al.*, 2001) und Ovarialkarzinomen (Schraml *et al.*, 2003). Das Isochromosom 12p stellt den klassischen molekularen Marker des malignen Keimzelltumors Erwachsener dar, während bei den anderen Tumorentitäten, wie auch bei i(12p)-negativen Keimzelltumoren, in der Regel interstitielle Chromosomenabschnitte amplifiziert vorliegen. Eine umfassende Microarray-Analyse eines 200kb-Gen-Cluster auf 12p13.31 ließ differentielle Genexpressionsmuster von Embryonalen Karzinomen gegenüber Seminomen deutlich werden (Korkola *et al.*, 2006). Wie wenige Jahre zuvor bereits in Arbeiten von Sperger und Skotheim *et al.* beschrieben, waren dabei neben anderen entwicklungsrelevanten Signalwegen vor allem Gene des Wnt-Signalweges vertreten (Sperger *et al.*, 2003; Skotheim *et al.*, 2005). Während in Embryonalen Karzinomen gegenüber Seminomen *WNT5A*, *FZD7*, *TCF7L* und *Versican* relativ überexprimiert waren, zeigten Seminome eine Überexpression des Wnt-Liganden *WNT2B* sowie verschiedener bekannter Wnt-Downstream-Ziele.

Präpubertäre Keimzelltumoren weisen in der Regel keine zytogenetischen Veränderungen an Chromosom 12p auf (Bussey *et al.*, 1999; Schneider *et al.*, 2001a). Die Ergebnisse der vorgelegten Arbeit lassen daher nicht erwarten, dass genetische Veränderungen an Chromosom 12p für die bisher und nachfolgend beschriebenen differentiellen Aktivierungsmuster des Wnt-Signalweges verantwortlich sind. Andere, beispielsweise epigenetische, Veränderungen müssen hinzutreten, um eine subentitätsspezifische Aktivierung des Wnt-Signalweges zu erklären.

Unabhängig der Chromosom 12p-Veränderungen unterstützen die Daten der genannten Arbeiten die Befunde der vorliegenden Arbeit jedoch. In der gesteigerten Expression des Wnt-Agonisten *FZD2* (siehe Abschnitt 4.2.4) zeigt sich, hinsichtlich einer differentiellen Genexpression, ein möglicher kausaler Mechanismus für eine Aktivierung des Wnt-Signalweges. Eine hohe Expression dieses Membran-Rezeptors konnte u.a. auch in Mammakarzinomen beobachtet werden (Milovanovic *et al.*, 2004) und resultiert durch die Bindung von Wnt-Molekülen in der konstitutiven Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges (siehe Abschnitt 1.2.1). Anhand des *FZD2*-Expressionsprofils kann demnach auf eine Wnt-Aktivität in Nichtseminomen, nicht aber in Dysgerminomen geschlossen werden.

Subtypenspezifische Genregulation der Wnt-Antagonisten *DACT3* und *WIF1*

Weiterführend konnte im Rahmen dieser Arbeit eine subtypenspezifische Genregulation insbesondere von Wnt-Antagonisten detektiert werden. So weisen Teratome eine gegenüber Dottersacktumoren signifikant erhöhte Expression des intrazellulären Inhibitors *DACT3* sowie des extrazellulären Antagonisten *WIF1* auf (siehe Abschnitte 4.5.2 und 4.8.3)

Mitglieder der *DACT*-Familie modulieren den Wnt/ β -Catenin-Signalweg durch die Interaktion mit DVL (Cheyette *et al.*, 2002). So können *DACT1* und *DACT2* sowohl aktivierende als auch inhibierende Funktionen bei der Regulation des Signalweges übernehmen (Gloy *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2006). Über die Rolle von *DACT3* ist bis heute wenig bekannt. Der Antagonist wurde sowohl in Mäusen als auch im Menschen beschrieben (Fisher *et al.*, 2006), seine Signalfunktion war jedoch lange unerforscht. Im Jahr 2008 konnten Jiang *et al.* einen ersten Zusammenhang mit der Entwicklung von Tumoren herstellen und eine reprimierte Expression von *DACT3* in Kolonkarzinomen beschreiben (Jiang *et al.*, 2008a). Diese tritt unabhängig einer Promotormethylierung auf und wird, im Gegensatz zu *WIF1*, *SFRPs* und anderen epigenetisch regulierten Komponenten des Wnt-Signalweges, durch eine bivalente Histonmodifikation reguliert (siehe Abschnitt 1.3.1). Der bivalente Chromatinstatus ist lediglich auf Tumorzellen beschränkt und nicht in intestinale Gewebe nachweisbar. Die Autoren vermuten daher, dass dieser eine kanzerogene Transformation der Zellen fördert. Die Reexpression von *DACT3* ist schließlich mit einer Inhibition des Signalweges assoziiert und führt zu einer massiven Apoptose in Kolonkarzinomzellen (Jiang *et al.*, 2008a). In Ergänzung zu den Expressionsanalysen (siehe Abschnitt 4.5.2) wurden in dieser Arbeit keine weiteren Untersuchungen an *DACT3* durchgeführt. Daher kann an dieser Stelle über den der Repression in Dottersacktumoren zugrundeliegenden Mechanismus nur spekuliert werden. Aufgrund der vergleichbaren Pathogenese von Keimzelltumoren und Kolonkarzinomen liegt eine epigenetische Inaktivierung durch Histonmodifikationen, wie bei Jiang *et al.* beschrieben, nahe. Alternativ käme eine Repression durch miRNAs (miR-31) in Frage, wie sie aktuell für die *DACT3*-Transkription gezeigt wurde (Xi *et al.*, 2010).

Die Repression des Inhibitors *WIF1* stellt ebenfalls ein häufiges Ereignis in der Onkogenese dar. Sie konnte in zahlreichen soliden Tumoren beobachtet werden (Wissmann *et al.*, 2003). Dabei ist die Inaktivierung des Gens in der Regel auf eine aberrante Promotormethylierung zurückzuführen (Mazieres *et al.*, 2004; Taniguchi *et al.*, 2005; Urakami *et al.*, 2006b) (siehe Abschnitt 1.3.1). Diese konnte ebenfalls für Kolonkarzinome (He *et al.*, 2005), und aktuell für hepatozelluläre Karzinome (Huang *et al.*, 2011), beschrieben werden. Über die Rolle von *WIF1* in Keimzelltumoren lagen bislang keine publizierten Daten vor. In hepatozellulären Karzinomen ist der Verlust der *WIF1*-Expression mit einer verschlechterten Prognose der Patienten assoziiert und stellt einen unabhängigen prognostischen Marker dar (Huang *et al.*, 2011). Welche Rolle *WIF1* für die Pathogenese der Keimzelltumoren spielt, kann nicht ausschließlich aufgrund des Expressionsprofils bestimmt werden. Welcher Mechanismus für die Repression der *WIF1*-Expression verantwortlich gemacht werden kann, lässt sich ebenfalls nicht abschließend klären. Da die Reexpression von *WIF1* in aktuellen Arbeiten nach Behandlung mit demethylierenden Agenzien nicht vollständig wiederhergestellt werden konnte, wird davon ausgegangen, dass neben epigenetischen Mechanismen weitere Veränderungen an der Inhibition beteiligt sind. Denkbar ist dabei eine Inaktivierung durch den zusätzlichen Verlust des intakten Allels (LOH), im Sinne eines „*second-hit*“ (Urakami *et al.*, 2006b) (siehe auch Abschnitt 5.3.1).

Anhand der vorgelegten Daten sowie der aktuellen Literatur kann die Inaktivierung der Wnt-Antagonisten *DACT3* und *WIF1* als potentiell malignitätsfördernd in Keimzelltumoren angesehen werden. In diesem Zusammenhang soll an dieser Stelle bereits ein weiterer extrazellulärer Wnt-Inhibitor erwähnt werden. So wird auch bei der *SFRP2*-Inaktivierung in Dottersacktumoren (siehe Abschnitt 4.6.4) von einer tumor- und progressionsfördernden Funktion in Keimzelltumoren ausgegangen. Da dessen methylierungsbedingte Repression im Rahmen dieser Arbeit jedoch belegt werden konnte, wird er an anderer Stelle diskutiert (siehe Abschnitt 5.3.2).

Der Wnt-Signalweg im Netzwerk anderer Signalwege

Der Theorie einer Malignisierung von Keimzelltumoren durch die Inaktivierung von Wnt-Inhibitoren steht das Expressionsprofil des extrazellulären Wnt-Antagonisten *SFRP1* in Keimzelltumoren entgegen (siehe Abschnitt 4.6.1). Dieses steht weder in Einklang mit früheren Daten an Keimzelltumoren, die eine hohe *SFRP1*-Expression in Carcinoma *in situ* und Teratomen bzw. Seminomen zeigen (Hoei-Hansen *et al.*, 2004; Dahl *et al.*, 2007), noch mit der in zahlreichen anderen malignen Tumoren reprimiert vorliegenden Expression (Caldwell *et al.*, 2004; Dahl *et al.*, 2007; Esteve und Bovolenta, 2010).

Ein vergleichbar unerwartetes Ergebnis konnten Huang *et al.* in einer aktuellen Expressionsstudie an Kolonkarzinomen für *SFRP4* beobachten (Huang *et al.*, 2010). So zeigte sich die Expression dieses Tumorsuppressors in Kolonkarzinomen sowohl

auf mRNA- als auch auf Proteinebene signifikant erhöht. Die Autoren gehen dabei, wie auch die Autoren einer anderen Studie (Suzuki *et al.*, 2004) davon aus, dass SFRP4 keinen relevanten Inhibitor des Wnt-Signalweges in Kolonkarzinomen darstellt. Um weiterhin die Überexpression in diesen Tumoren zu erklären, ziehen sie für SFRP4 eine Rolle im Knotenpunkt von Wnt-Signalweg und anderen Signalwegen in Betracht. Möglicherweise lässt sich auch die (widersprüchliche) Expression von *SFRP1* in Keimzelltumoren mit einer Kreuzregulation des Wnt-Signalweges erklären. Daten hierzu liegen bis dato allerdings nicht vor.

Signalwege können aufgrund ihrer Interaktion mit anderen Signalwegen grundsätzlich nicht isoliert betrachtet werden. So konnten im Zusammenhang mit der komplexen Kreuzregulation des Wnt-Signalweges zahlreiche Ebenen der Signalintegration mit dem Hedgehog-, dem Notch- sowie dem TGF β /BMP-Signalweg beschrieben werden (Kalderon, 2002; Nusse, 2003; Hayward *et al.*, 2008; Guo und Wang, 2009). Neben ihrer Beteiligung an Prozessen der Embryonalentwicklung und der Gewebemöostase handelt es sich hierbei um Signalwege, die nicht nur individuell, sondern auch in Bezug auf ihre Kreuzvernetzung („*cross-talks*“) hochkonserviert sind. *Cross-talks* mit Regulatoren anderer Signalwege resultieren häufig in einer Aktivierung oder Inhibition derselben.

Einheitliche Genexpressionsprofile, ohne deutlich signifikante Unterschiede in den verschiedenen Keimzelltumor-Subentitäten, wurden im Rahmen dieser Arbeit u.a. für *GSK3 β* , *DVL1*, *SNAI1*, *AXIN1*, *HRAS* und *SFRP4* gezeigt. Die Expressionsprofile könnten demnach darauf schließen lassen, dass diese Wnt-Regulatoren nicht im Zusammenhang mit einer Wnt-Aktivierung stehen und keinen Einfluss auf die Pathogenese der Keimzelltumoren im Kindesalter haben. Alternativ können sie aber auch der zusätzlichen Regulation durch andere Mechanismen unterliegen. Dies soll am Beispiel von *GSK3 β* und *DVL* kurz erläutert werden. Der Wnt- und der Hedgehog-Signalweg verfügen auf molekularer Ebene über einige Proteine wie Fz- oder Smoothed-Rezeptoren, die strukturell vergleichbar sind und bemerkenswerte Parallelen in Aktions- und Regulationsmechanismen zeigen (Kalderon, 2002; Nusse, 2003). Beide Signalwege teilen zudem Regulatoren wie GSK und CK1 (Price und Kalderon, 2002). Eine durch *GSK3 β* -Inhibition hervorgerufene Wnt-Stimulation kann zu einer Aktivierung des TSC-mTOR-Signalweges führen (Inoki *et al.*, 2006), während für den Hedgehog-Signalweg eine inverse Korrelation zum Wnt-Signalweg nachgewiesen werden konnte (Yanai *et al.*, 2008). Die Signalintegration des Wnt- und des Notch-Signalweges geschieht hingegen auf mehreren Ebenen und resultiert in gegensätzlichen Antworten. Während die Wnt-Signaltransduktion die Expression spezifischer Notch-Liganden einerseits induziert, können sich beide Signalwege andererseits inhibieren (Arias und Hayward, 2006; Langdon *et al.*, 2006; Hurlbut *et al.*, 2007). Letzteres wird, zumindest teilweise, durch eine Notch-Liganden-induzierte β -Catenin-Degradation vermittelt (Hayward *et al.*, 2005). Notch konnte zudem ebenfalls als Bindepartner von *DVL* und *GSK3 β* identifiziert werden, was eine weitere Ebene

der Interaktion beschreibt (Axelrod *et al.*, 1996; Espinosa *et al.*, 2003). Eine Notch-abhängige, onkogene Wnt-Signaltransduktion wurde u.a. für Kolonkarzinome bei FAP-Patienten beschrieben. Durch eine β -Catenin-vermittelte transkriptionelle Aktivierung des Notch-Liganden Jagged1 konnte der Notch-Signalweg als *Downstream*-Effektor des Wnt-Signalweges in Kolonkarzinom-Zellen identifiziert werden (Rodilla *et al.*, 2009). Der *cross-talk* von Wnt und TGF β /BMP spielt sich vor allem im Zellkern ab, wo Smad und LEF/ β -Catenin (oder Smad und TCF/ β -Catenin) synergistisch eine Reihe von gemeinsamen Zielgenen regulieren (Willert *et al.*, 2002; Schwartz *et al.*, 2003). Ebenso sind beide in der Lage, die Liganden-Produktion untereinander zu determinieren. So kann TGF β verschiedene Mitglieder der Wnt-Familie sowie den Ko-Rezeptor LRP5 heraufregulieren – was in einer erhöhten Stabilität und nukleären Akkumulation von β -Catenin resultiert (Zhou *et al.*, 2004).

Fazit

Entsprechend der subentitätsspezifischen Wnt-Aktivierung konnten im Rahmen dieser Arbeit auch subentitätsspezifische Expressionsmuster von extra- und intrazellulären Wnt-Regulatoren beobachtet werden. Diese lassen einen Zusammenhang zwischen Deregulation und Tumorprogression deutlich werden. Zudem legen sie nahe, dass die Wnt-Aktivierung in diesen Entitäten weniger durch genetische Aberrationen, einschließlich Mutationen, bedingt wird, sondern vielmehr durch die Inaktivierung von extrazellulären Wnt-Antagonisten. Grundsätzlich ist über die komplexe Kreuzregulation des Wnt-Signalweges auch eine Beteiligung anderer Signalwege an den dargestellten Ergebnissen denkbar.

5.2.3 Negative *feed-back*-Regulation in Teratomen

Der kanonische Wnt/ β -Catenin-Signalweg wird durch zahlreiche selbstregulatorische Mechanismen reguliert, bei denen es sich entweder um *feed-forward*- oder *feed-back*-Mechanismen handelt (siehe Abschnitt 1.2.2). In dieser Arbeit konnte der *feed-back*-Mechanismus als eine mögliche Regulationskontrolle der Wnt-Aktivierung in Teratomen identifiziert werden.

DKK1 ist der Prototyp eines Wnt-Antagonisten, der den Wnt-Signalweg spezifisch durch seine Bindung an die Ko-Rezeptoren LRP5/6 inhibiert (Bafico *et al.*, 2001; Semenov *et al.*, 2001) (siehe Abschnitt 1.2.3). In den meisten normalen Geweben, mit Ausnahme der Plazenta, wird DKK1 auf einem niedrigen Level exprimiert. Im Zusammenhang mit Tumorerkrankungen sind jedoch zahlreiche, unterschiedlich hohe Level beschrieben worden (Forget *et al.*, 2007; Qian *et al.*, 2007). In Tumoren wird die *DKK1*-Expression häufig durch den Tumorsuppressor p53 hochreguliert (Wang *et al.*, 2000). Seine Funktion als Tumorsuppressor übt DKK1 vor allem durch anti-apoptotische Eigenschaften aus, die bereits während der Embryonalentwicklung im Zusammenhang mit einer Inhibition des Wnt-Signalweges beschrieben werden

konnten (Grotewold und Ruther, 2002). Unabhängig von einer p53-Induktion führt eine stabile Expression des Gens durch genotoxische Stimuli zu einer veränderten Bcl2/Bax-Expression, verkürzten Telomeren und einer erhöhten Sensitivität gegenüber pro-apoptischen Stimuli (Shou *et al.*, 2002).

In der vorgelegten Arbeit wird gezeigt, dass *DKK1* als Zielgen und epigenetisch kontrollierter Negativregulator des Wnt-Signalweges in Keimzelltumoren differentiell exprimiert, nicht jedoch epigenetisch reguliert wird (siehe Abschnitte 4.8 und 5.3). Das Ergebnis entspricht einer früheren Arbeit, in der in Dottersacktumoren und Teratomen erhöhte *DKK1*-Genexpressionslevel im Vergleich zu Seminomen beobachtet wurden (Skotheim *et al.*, 2005). In Nichtseminomen ist dies zum einen ein weiterer Hinweis für eine Wnt-Aktivierung. Zum anderen weist die relativ hohe Expression des Gens in Teratomen auf einen möglichen selbstregulatorischen *feed-back*-Mechanismus als Reaktion auf diese Aktivierung hin. Dieser *feed-back*-Mechanismus als Zeichen einer unkontrollierten Signalaktivierung konnte bereits in anderen embryonalen Tumoren wie den Nephro- und Hepatoblastomen beschrieben werden (Wirths *et al.*, 2003) und kann in einer „Eindämmung“ der Signalwirkung resultieren (Macdonald *et al.*, 2007). Möglicherweise geht dieser Mechanismus während der Progression zum Dottersacktumor (zumindest teilweise) verloren. Dafür könnten sowohl die differentiellen mRNA-Expressionslevel von β -Catenin als auch die nukleär detektierte Akkumulation des Proteins insbesondere in Dottersacktumoren sprechen. Denkbar ist zudem, dass die „Begrenzung“ der Wnt-Signalwirkung in Teratomen durch eine (Über-)expression von Wnt-Antagonisten (wie *DACT3* und *WIF1*, s.o.) zusätzlich beeinflusst wird.

Das in dieser Arbeit erhobene Expressionsprofil von *WTX*, auch Zielgen und Negativregulator des Wnt-Signalweges (siehe Abschnitt 1.3), lässt diesen Schluss ebenfalls vermuten. Sein Expressionsmuster, das dem von *CCND1*, *Conductin* und *DKK1* entspricht, weist auf eine Wnt-Aktivierung in Teratomen und Dottersacktumoren, nicht aber in Dysgerminomen hin. Die erhöhte Expression lässt sich erneut durch den negativen *feed-back*-Mechanismus erklären, der bei einer vorliegenden Aktivierung des Signalweges durch eine gesteigerte Transkription des Gens die Kaskade zu inhibieren sucht.

Diese Hypothese entspricht zudem der Beobachtung, dass eine Fehlregulation oder Inaktivierung von *WTX* in der Regel durch Mutationen dieses Gens bedingt wird – diese jedoch in Keimzelltumoren nicht nachweisbar sind (siehe Abschnitt 4.4.3). Dies wiederum entspricht publizierten Daten, die *WTX*-Mutationen als ein seltenes Ereignis in der Pathogenese von kolorektalen, gastrischen und auch hepatozellulären Karzinomen beschreiben (Yoo *et al.*, 2009). In Wilms-Tumoren können *WTX*-Mutationen jedoch in bis zu 30% der Fälle auftreten (Rivera *et al.*, 2007). Eine Mikrodissektion von Wilms-Tumoren konnte dabei zeigen, dass die Mutationen nicht uniform innerhalb eines Tumors auftreten (Wegert *et al.*, 2009). Dies legte den Schluss nahe, dass es sich bei der *WTX*-Inaktivierung weniger um ein frühes

Geschehen handelt, welches die Tumorgenese fördert, sondern vielmehr um ein spätes Ereignis, das in einem Zusammenhang mit der Progression des Tumors stehen kann (Kim *et al.*, 2011). Anhand der vorliegenden Daten kann eine Beteiligung von *WTX* an der Progression der Keimzelltumoren weitgehend ausgeschlossen werden.

5.3 Epigenetische Veränderungen korrelieren mit Tumorprogression

Die DNA-Methylierung stellt einen der wichtigsten epigenetischen Mechanismen dar. Aberrante Methylierungsmuster können die Feinregulation der Genexpression grundlegend beeinflussen und für eine Deregulierung zentraler Mechanismen der Tumorentstehung, wie Proliferation, Differenzierung und Zelltod, verantwortlich sein (Esteller, 2005). Eine globale DNA-Hypomethylierung sowie eine genspezifische Hypermethylierung stellen prominente Merkmale zahlreicher Tumorgenome dar (Ehrlich, 2002; Ushijima, 2005). Neben der Kontrolle der Genexpression, der Chromatinstruktur und der Genomstabilität geht die DNA-Methylierung daher ebenfalls mit der Initiation und der Progression von Tumoren einher (Jones und Baylin, 2002). Gene, die von einer aberranten Methylierung betroffen sind, sind häufig Mitglieder wichtiger zellulärer Signalwege, die Funktionen in der Zellzyklusregulation (u.a. *CDKN2A*, *CHFR*), der Proliferation (u.a. *CDKN2A*, *CXCL12*), der DNA-Reparatur (u.a. *MGMT*), der Apoptose (u.a. *DAPK*, caspase 8, *FAS*, *TRAILR1*), dem RAS-Signalweg (u.a. *RASSF1A*, *RASSF5*) oder der Invasion (u.a. Cadherine, *ADAMTS1*, *TIMP3*, *PTGER2*) übernehmen. Der Wnt-Signalweg ist dabei ebenfalls häufig betroffen (u.a. *APC*, *DKK1*, *SFRP*-Gene) (Hanahan und Weinberg, 2000; Kalari und Pfeifer, 2011).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei zentrale Wnt-Regulatoren auf epigenetische Veränderungen in Keimzelltumoren analysiert – *APC*, *SFRP2* und *DKK1*. Da eine epigenetische Regulation in Keimzelltumoren zwar für die Wnt-Antagonisten *APC* und *SFRP2*, nicht jedoch für *DKK1* gezeigt werden konnte, wurde letzterer in einem anderen Zusammenhang diskutiert (vergleiche Abschnitt 5.2.3).

5.3.1 Die Rolle des Tumorsuppressors APC in Keimzelltumoren

Die Entwicklung und Progression von Teratomen und gemischten malignen Keimzelltumoren mit Teratom- und Dottersacktumorangehalt ist mit der klinischen Evolution vom benignen adenomatösen Polypen zum invasiven, malignen und metastatischen Adenokarzinom im Kolon vergleichbar.

Während *APC* den Wnt-Signalweg im gesunden Kolon negativ reguliert (Bienz und Clevers, 2000; Clevers, 2006), stellen pathologische Veränderungen von *APC*, die mit einer aberranten Aktivierung des Wnt-Signalweges einhergehen, ein initiierendes

Ereignis sowohl für die Entstehung als auch für die Progression der Kolonkarzinome dar (Kinzler und Vogelstein, 1996; Fearon und Vogelstein, 1990; Horii *et al.*, 1992; Nakatsuru *et al.*, 1992; Ohgaki *et al.*, 2004). Nach der „two-hit“-Hypothese von Knudson kann *APC* durch verschiedene molekulargenetische Mechanismen inaktiviert werden. Diese Hypothese dominiert die Tumorgenetik seit vielen Jahren (Knudson, 2001). In dem Modell wird eine Kopie eines Tumorsuppressorgens durch eine nonsense- oder frameshift-Mutation inaktiviert, während die andere Kopie durch einen zweiten Hit, entweder eine ähnliche Mutation oder den Verlust des verbliebenen intakten Allels (LOH), ebenfalls inaktiviert wird.

Bi-allelische Mutationen, die die häufigste Veränderung in Kolonkarzinomen darstellen und die kolorektale Tumorgenese zu initiieren scheinen (siehe Abschnitt 1.3.2), konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden. Daraus resultierende, trunkierte Veränderungen des Proteins waren ebenfalls nicht vorhanden. Noch immer steht im Zusammenhang mit Mutationen des *APC*-Gens die Frage offen, ob diese vor dem Hintergrund einer genetischen Instabilität entstehen (Michor *et al.*, 2005) oder sie vielmehr verursachen (Fodde *et al.*, 2001) – letzteres hätte einen plausiblen Mechanismus für die Progression von Teratomen zu Dottersacktumoren darstellen können. Eine nukleäre Akkumulation von β -Catenin, die ohne begleitende somatische *APC*-Mutationen einhergeht, konnte bereits in anderen Studien beobachtet werden (Inukai *et al.*, 2004). Sofern der Tumorsuppressor eine Rolle bei der Pathogenese von Keimzelltumoren spielt, lässt dies andere Mechanismen einer Inaktivierung von *APC* vermuten.

In der Literatur liegen lediglich begrenzte Informationen bezüglich der Rolle von *APC* in Keimzelltumoren vor. In malignen testikulären Nichtseminomen von Erwachsenen wurde im Rahmen einer Methylierungsanalyse von Promotorregionen verschiedener Tumorsuppressor-Gene im Vergleich zu Seminomen eine Hypermethylierung des *APC*-Promotors beobachtet (Honorio *et al.*, 2003). In Übereinstimmung mit den Analysen an Keimzelltumoren Erwachsener beschreiben Kato *et al.* bei Dottersacktumoren des Kindesalters ebenfalls eine Hypermethylierung des *APC*-Promotors (Kato *et al.*, 2006). Diese korreliert jeweils mit einer verringerten *APC*-Expression, jedoch nicht mit einer nukleären Akkumulation von β -Catenin. Die Autoren halten daher eine Beteiligung von *APC* an der Pathogenese von Keimzelltumoren für möglich, gehen aber nicht von einer Aktivierung des Wnt-Signalweges in Dottersacktumoren aus.

Mittels Bisulfitsequenzierung konnte im Rahmen dieser Arbeit eine signifikante Hypermethylierung des *APC*-Promotors exklusiv in Dottersacktumoren gezeigt werden. Die methylierungsspezifische PCR wies zusätzlich auch in reifen und unreifen Teratomen eine Methylierung auf (siehe Abschnitt 4.3.4). Die Unterschiede lassen sich auf die dem experimentellen Design zugrunde liegende geringere Spezifität der methylierungsspezifischen PCR zurückführen. Es wird daher von einem geringeren Methylierungsgrad in den Teratomen ausgegangen. Beide Methoden zeigen

übereinstimmend das vollständige Fehlen einer Methylierung in Dysgerminomen.

Die dargestellten Muster sind vergleichbar mit Ergebnissen globaler Methylierungsanalysen an Keimzelltumoren (Honorio *et al.*, 2003; Kato *et al.*, 2003; Furukawa *et al.*, 2009). Sie sind in dieser Studie ergänzend zu den bereits publizierten Daten auch altersgrenzenüberschreitend zu beobachten. Der Epigenotyp scheint daher mehr mit dem Genotyp der Tumoren als mit der Histologie zu korrelieren. Weiterhin können die epigenetischen Veränderungen ebenfalls mit der Progression vom Teratom zum Dottersacktumor assoziiert werden.

Bemerkenswerterweise zeigte jedoch das Genexpressionsprofil von *APC* trotz einer signifikant erhöhten Methylierung in Dottersacktumoren keine Unterschiede zwischen den Tumorsubentitäten (siehe Abschnitt 4.3.5). Eine Korrelation zwischen Methylierung und Expression des Gens konnte daher nicht hergestellt werden. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu den Daten von Kato *et al.* sowie anderen Studien in kolorektalen Karzinomen, die für gewöhnlich auf eine enge Korrelation zwischen Promotormethylierung und Genexpression hinweisen (Kato *et al.*, 2003; Segditsas *et al.*, 2008). So scheint eine Promotormethylierung über Veränderungen der Chromatin-Konformation die Interferenz mit Transkriptionsfaktoren zu stören und damit die Expression des Gens zu inhibieren (Deng *et al.*, 2004). Die Daten der vorliegenden Arbeit lassen daher vermuten, dass die *APC*-Genexpression in Keimzelltumoren nicht (ausschließlich) durch den Methylierungsstatus des *APC1A*-Promotors reguliert wird.

Trotz geringer Fallzahlen zeigten die Heterozygotie-Analysen zur Ermittlung eines Allelverlustes ein den epigenetischen Veränderungen entsprechendes Muster (siehe Abschnitt 4.3.3). Ein Verlust der Heterozygotie (LOH) des *APC*-Locus auf Chromosom 5q22 war sowohl in Teratomen als auch in nahezu allen Dottersacktumoren vorhanden. Dysgerminome waren von einem solchen nicht betroffen. Rekurrente Aberrationen in Teratomen konnten bisher nicht beschrieben werden (Harms *et al.*, 2006). Somit stellen die hier vorgestellten Daten die erste Beschreibung von rekurrenten genetischen und epigenetischen Veränderungen in Teratomen vor der Pubertät dar. In Ergänzung weisen die Ergebnisse der *APC*-Methylierungs-, vor allem aber der *APC*-LOH-Analysen zudem auf die biologische Verwandtschaft zwischen Teratomen und Dottersacktumoren des Kindesalters hin und machen den Unterschied zu postpubertal auftretenden, germinomatösen Keimzelltumoren deutlich.

In einigen Fällen (#74, #119 und #63) gehen die epigenetischen Veränderungen von *APC* mit genetischen Veränderungen in Form eines Allelverlustes einher. Gemäß der "two-hit"-Hypothese von Knudson (s.o.) müssten diese daher zur Inaktivierung des Gens führen, was sich in einer relativ verringerten *APC*-Expression äußern würde. Während dies für Kolonkarzinome beschrieben werden konnte (Arnold *et al.*, 2004), kann es – bei allerdings insgesamt geringer Fallzahl – für Keimzelltumoren nicht bestätigt werden. Diese Beobachtung lässt sich möglicherweise durch die chromosomale Konstitution der Keimzelltumoren erklären. Da sich das "two-hit"-

Modell nur auf diploide Zellen anwenden lässt – die typische Tumorzelle des Keimzelltumors jedoch aneuploid (hyperdiploid) bzw. polyploid vorliegt – haben Segditsas *et al.* an APC ein erweitertes Modell der „*three-hit*“-Hypothese entworfen (Segditsas *et al.*, 2009). Es legt zugrunde, dass Kopienzahlveränderungen, die für gewöhnlich mit echtem LOH einhergehen (Sieber *et al.*, 2002; Gaasenbeek *et al.*, 2006), in aneuploiden Tumoren den dritten Hit darstellen. Die Autoren gehen ferner davon aus, dass einige dieser dritten Hits APC als direktes Ziel haben und die APC-mRNA- und Protein-Level beeinflussen. Da es sich bei Dottersacktumoren häufig um aneuploide Tumoren mit einer Chromosomenzahl > 46 handelt, scheint ein weiterer, dritter Hit notwendig zu sein, um APC zu inaktivieren. Inwieweit sich das „*three-hit*“-Modell auf Keimzelltumoren anwenden lässt, kann im Rahmen dieser Arbeit nicht abschließend geklärt werden.

Fazit

APC scheint nicht ursächlich für die Aktivierung des Wnt-Signalweges in Keimzelltumoren verantwortlich zu sein (Okpanyi *et al.*, 2010). Vielmehr könnten die genetischen, vor allem aber die epigenetischen Veränderungen von APC Teil eines „übergeordneten“ Mechanismus sein, der eine Aktivierung des Signalweges zum Ziel hat. Entsprechend der Beobachtung, dass nicht-seminomatöse Keimzelltumoren einen höheren Grad der Methylierung zeigen als Seminome (Honorio *et al.*, 2003; Kato *et al.*, 2003; Furukawa *et al.*, 2009), könnte es sich dabei um einen globalen Methylierungsphänotyp in Keimzelltumoren handeln.

5.3.2 Epigenetische Inhibition von *SFRP2* in Dottersacktumoren

Unterstützung erfährt die Hypothese des globalen Methylierungsphänotyps in Keimzelltumoren durch die an *SFRP2* erhobenen Daten. *SFRP2* stellt sich in Keimzelltumoren nicht nur als differentiell exprimiert, sondern, damit einhergehend, auch als differentiell epigenetisch reguliert dar (siehe Abschnitt 4.7). Darüber hinaus kann *SFRP2* möglicherweise als Marker für die Detektion pathologischer Veränderungen in Keimzelltumoren dienen.

Bezüglich der Rolle von SFRPs in Keimzelltumoren lagen bis dato nur sehr wenige Daten vor. So wurde 2004 eine kleine Gruppe von Hodentumoren, die unter anderem ein Embryonales Karzinom, drei Seminome, ein Teratom sowie fünf intratubuläre Carcinoma *in situ* (CIS) umfasste, auf die mRNA-Expression von *SFRP1* analysiert (Hoei-Hansen *et al.*, 2004). Dabei konnte eine starke Expression in allen CIS sowie in dem Teratom beobachtet werden, während keine bzw. eine lediglich schwache *SFRP1*-Expression in den Seminomen detektiert wurde. Eine weitere Studie hat in 59% der analysierten Seminome (n = 46) einen Verlust der *SFRP1*-Expression beschrieben (Dahl *et al.*, 2007).

Eine verringerte Expression von *SFRP*-Genen ist für gewöhnlich auf einen aberrant methylierten Promotor zurückzuführen und aktiviert den Wnt-Signalweg konstitutiv (Lee *et al.*, 2004; Suzuki *et al.*, 2004; Urakami *et al.*, 2006a; Dahl *et al.*, 2007; Nomoto *et al.*, 2007). Dabei korreliert die Promotorhypermethylierung der Wnt-Inhibitoren häufig mit einer ungünstigen Prognose der Patienten (Veeck *et al.*, 2006; Veeck *et al.*, 2008a). Eine epigenetische Regulation von *SFRP2*, die im direkten Zusammenhang mit einer verringerten Gen-Expression steht, konnte bislang in zahlreichen Tumorentitäten beschrieben werden, unter anderem in Lungen- und Kolonkarzinomen (Suzuki *et al.*, 2002; Fukui *et al.*, 2005; Bovolenta *et al.*, 2008). In letzteren tritt die Aktivierung des Signalweges vor dem Hintergrund einer exzessiven β -Catenin-Akkumulation im Zellkern ein (Suzuki *et al.*, 2004).

Im Rahmen dieser Arbeit bestätigen sich diese Zusammenhänge ebenfalls für Keimzelltumoren. Im Zuge der Genexpressionsanalysen an *SFRP1*, *SFRP2*, *SFRP4* und *SFRP5* wurde eine im Vergleich zu Teratomen und Dysgerminomen signifikant verringerte *SFRP2*-Expression in Dottersacktumoren beobachtet, die sich ebenfalls auf Proteinebene wiederfinden ließ (siehe Abschnitt 4.6). Eine Methylierung der *SFRP2*-Promotorregion konnte nachfolgend für nahezu alle analysierten Dottersacktumoren nachgewiesen werden. Dabei korrelierte der Methylierungsstatus mit der verringerten *SFRP2*-Expression. Ob diese epigenetisch bedingte Fehlregulation in Dottersacktumoren lediglich ein weiterer Hinweis auf eine bereits stattgefundene Aktivierung des Signalweges ist, oder ob sie diese Aktivierung vielmehr bedingt, kann an dieser Stelle nicht abschließend geklärt werden. Deutlich wird jedoch, dass die subtypenspezifischen Unterschiede bezüglich *SFRP2* im Einklang mit der Wnt-Aktivierung in Keimzelltumoren stehen.

Zelllinien im Allgemeinen können während der Kultivierung *de novo* genetische und epigenetische Veränderungen erfahren (Osborne *et al.*, 1987; Wistuba *et al.*, 1998). Wie für *SFRP2* bereits an Brustkrebstumoren und den entsprechenden Zelllinien beobachtet werden konnte (Veeck *et al.*, 2008b), zeigten jedoch auch Keimzelltumoren und Keimzelltumor-Zelllinien vergleichbare Ergebnisse (siehe Abschnitt 4.7.3). Während die Choriokarzinomzelllinie JAR, einem gemischten malignen Keimzelltumor mit Choriokarzinom-Anteil entsprechend, vor dem Hintergrund eines methylierten Promotorbereiches *SFRP2* nicht exprimierte, wies die Teratomzelllinie TE76.T eine vergleichsweise hohe Expression des Gens auf. Eine vergleichbare Expression zeigte, trotz Dottersacktumorangehalts, die schwach methylierte Zelllinie 2102EP. Da es sich bei dem dieser Zelllinie zugrunde liegenden Tumor jedoch um einen gemischten malignen Keimzelltumor handelte, der ebenfalls Anteile eines Teratokarzinoms sowie eines Embryonalen Karzinoms beinhaltet, kann ein direkter Vergleich mit einem reinen Dottersacktumor an dieser Stelle nicht erfolgen.

Eine Reexpression von inaktivierten Genen in Tumorzellen kann durch synergistische Effekte der Demethylierung und der Histon-Deacetylase-Inhibierung wiedererlangt

werden (Cameron *et al.*, 1999). Funktionelle Analysen in humanen Keimzelltumorzelllinien konnten die Hypermethylierung des Promotorbereiches in einen direkten Zusammenhang mit der fehlenden bzw. verringerten Expression dieses Inhibitors bringen. Nach Behandlung mit dem demethylierend wirkenden Reagenz 5-Aza konnte eine Reexpression von *SFRP2* in der ursprünglich methyliert vorliegenden Zelllinie JAR gezeigt werden (siehe Abschnitt 4.7.3.2). Vergleichend durchgeführte Analysen an der Mammakarzinom-Zelllinie MCF7 (vergleiche Abschnitt 4.7.2), die in ihrem Methylierungsstatus den JAR-Zellen entsprach, konnten den demethylierenden Effekt von 5-Aza anhand der nach Behandlung auftretenden unmethylierten MSP-Produkte direkt belegen. Der Histon-Deacetylase-Inhibitor TSA hatte allein keinen Einfluss auf die Reexpression von *SFRP2* in JAR. Es konnte damit gezeigt werden, dass es sich in Keimzelltumoren bei dem der *SFRP2*-Inaktivierung zugrunde liegenden epigenetischen Mechanismus um eine Inaktivierung durch Methylierung handelt.

Bei Berücksichtigung von Daten an Kolonkarzinomen scheint eine aberrante Promotormethylierung zu einem frühen Zeitpunkt der Karzinogenese aufzutreten (Chan *et al.*, 2002). Ferner konnte eine Hypermethylierung der DNA im Stuhl dieser Patienten detektiert werden, die diese epigenetische Veränderung zu einem Ziel nichtinvasiver Screeningverfahren in frühen kolorektalen Läsionen werden ließ (Belshaw *et al.*, 2004; Leung *et al.*, 2004). Zwei Studien konnten in diesem Zusammenhang eine differentielle Expression von *SFRP2* in Patienten mit und ohne Kolonkarzinomen zeigen (Müller *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2007), wobei bis zu 95% der Tumoren detektiert werden konnten. *SFRP2* scheint demzufolge einen hochsensitiven Biomarker für die Identifizierung pathologischer Veränderungen im Rahmen von Krebserkrankungen darzustellen. Es wird ferner diskutiert, dass die *SFRP2*-Methylierung das maligne Potential von Tumoren widerspiegelt und eventuell verantwortlich für die Progression vom kolorektalen Adenom zum Karzinom ist (Huang *et al.*, 2007). Anhand der zugrundeliegenden Ergebnisse können Parallelen zu der Progression vom Teratom zum Dottersacktumor gezogen werden. Der Nachweis von epigenetisch inaktiviertem *SFRP2* in malignen Dottersacktumoren, nicht aber in benignen Teratomen, unterstützt diese Hypothese.

Die dargestellten Ergebnisse bieten eine Grundlage für weitere funktionelle Analysen des Wnt-Antagonisten *in vitro* und auch *in vivo*. Sie erlauben die gezielte Untersuchung der pathogenetischen Rolle von *SFRP2* in Keimzelltumoren des Kindesalters. Möglicherweise könnte die Demethylierung von *SFRP2*, und damit die Inaktivierung des Signalweges, ein therapeutisches Ziel bei der Behandlung der Patienten darstellen. Monoklonale Antikörper und siRNA gegen Wnt-Inhibitoren wie Wnt1/2, WIF1 und auch SFRPs befinden sich zur Zeit in präklinischen Studien (Takahashi-Yanaga und Kahn, 2010). Des Weiteren hat die grundsätzliche Reversibilität epigenetischer Mutationen in humanen Tumoren im Laufe des vergangenen Jahrzehnts insbesondere zur Entwicklung von Wirkstoffen geführt, die

epigenetisch modifizierende Enzyme zum Ziel haben. Zu den prominentesten gehören dabei die Cytosin-Analoga 5-azacytidine (Azacytidine, Vidaza®) und 2'-deoxy-5-azacytidine (Decitabine, Dacogen®). Es handelt sich bei ihnen um Inhibitoren der DNA-Methyltransferasen (siehe Abschnitt 1.3.1), die bereits seit 2004 bzw. 2006 in der Mono- bzw. Kombinationstherapie myeloider Leukämien und myelodysplastischer Syndrome eingesetzt werden (Silverman *et al.*, 2002). Für die Behandlung ovarieller Karzinome befinden sich insbesondere Histon-Deacetylase-Hemmer wie Trichostatin A in der Entwicklung. Sie werden, wie Belinostat® (PXD101), entweder noch in vorklinischen Studien getestet oder sind bereits, wie SAHA (suberoylanilide hydroxamicacid), für die Therapie dieser Tumoren zugelassen (Vorinostat, Zolinza®) (Marks und Breslow, 2007; Mund und Lyko, 2010).

Fazit

Die an Keimzelltumoren erhobenen Daten bezüglich *SFRP2* stehen in Einklang mit Ergebnissen der Literatur zur Tumorprogression von kolorektalen Karzinomen. Die subtypenspezifischen genetischen und epigenetischen Unterschiede scheinen auch in Keimzelltumoren progressionsassoziierte und möglicherweise sogar progressionsrelevante Ereignisse darzustellen. Somit scheint es sich bei Keimzelltumoren des Kindesalters um eine weitere solide Tumorentität zu handeln, für deren Pathogenese und Malignisierung die Inaktivierung von *SFRP2* als relevanter Tumorsuppressor des Wnt-Signalweges eine Rolle spielt. Die funktionellen Analysen zeigen, dass die aberrante Inaktivierung von *SFRP2* nach Demethylierung aufgehoben werden kann. Somit ergibt sich möglicherweise ein therapeutischer Mechanismus, mit dem die aberrante Aktivierung des Wnt-Signalweges in Keimzelltumoren antagonisiert werden könnte.

5.4 EpCAM – potentieller Tumormarker in Keimzelltumoren

In weiten Teilen spiegelt die Keimzelltumorgenese die frühe Embryogenese wider (Teilum, 1976). So zeigen Embryonale Karzinomzellen (EC-Zellen), die undifferenzierten und pluripotenten Stammzellen der Teratokarzinome, zahlreiche Ähnlichkeiten zu Embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) (Andrews, 1998). Es lag daher bereits früh der Schluss nahe, dass entwicklungsrelevante Signalwege wie der Wnt- oder der Notch-Signalweg, die an der Aufrechterhaltung bzw. der Differenzierung humaner ES-Zellen beteiligt sind, auch bei der Tumorgenese von Keimzelltumoren eine Rolle spielen. Bei dem Vergleich von NTERA2, einer Teratokarzinomzelllinie, sowie der ES-Zelllinie H7 wurde nach Induktion mit Retinolsäure eine veränderte Regulation verschiedener Wnt-Gene (u.a. Mitglieder der Fz- sowie der SFRP-Familie) beobachtet, mit insgesamt lediglich geringen Unterschieden zwischen beiden Zelllinien. Vergleichbare Genexpressionsprofile weisen demnach auf eine nahe Verwandtschaft von EC- und ES-Zellen hin. Anhand von EC-Zelllinien konnte 2009

gezeigt werden, dass der Wnt-Signalweg nach induzierter Differenzierung der Zellen zunächst reprogrammiert und die kanonische Signalkaskade anschließend aktiviert wird (Snow *et al.*, 2009). Dabei wurde augenscheinlich, dass verschiedene Wnt-Komponenten (*WNT2B*, *FZD5*, *FZD6*, *FZD10*, *SFRP4*, *SFRP1* und weitere) veränderte Genexpressionslevel zeigten. Schließlich konnte *FZD7* als potentielles therapeutisches Ziel identifiziert werden, da dessen Repression das Wachstum der humanen EC-Zellen signifikant inhibierte.

Auch das epitheliale Zelladhäsionsmolekül EpCAM (CD326, 17-1A-Antigen) fungiert als Marker undifferenzierter humaner Embryonaler Stammzellen und spielt eine Rolle bei der Proliferation und der Differenzierung der Zellen (Ng *et al.*, 2009). Nachdem Daten über die Rolle dieses Moleküls, das gleichzeitig Zielgen des Wnt-Signalweges ist (siehe Abschnitt 1.3.3), in Keimzelltumoren selbst bis dato nicht bekannt waren, konnte EpCAM im Rahmen dieser Arbeit als potentieller Tumormarker in Keimzelltumoren identifiziert werden. In Dottersacktumoren wurde eine signifikant erhöhte Expression von *EpCAM* beobachtet, die in einer starken Expression des Proteins resultierte (vergleiche Abschnitt 4.5.5). Dieses Expressionsprofil lässt sich mit zahlreichen Studien vergleichen, die in den meisten humanen Tumoren, primäre und metastatische Gewebe eingeschlossen (Osta *et al.*, 2004; Spizzo *et al.*, 2011), eine EpCAM-Überexpression nachweisen und EpCAM damit als tumorassoziiertes Antigen darstellen (Went *et al.*, 2004; van der Gun *et al.*, 2010). Während EpCAM im Epithel gesunder Individuen auf einem moderaten Level exprimiert wird (Winter *et al.*, 2003b), zeigen die verschiedenen Tumorgewebe eine hohe bis sehr hohe Expression im Vergleich zum jeweils korrespondierenden Normalgewebe (Went *et al.*, 2004). Diese Überexpression geht gleichzeitig mit einer schlechten Prognose der Patienten einher (Gastl *et al.*, 2000; Ralhan *et al.*, 2010). Frühere Studien assoziierten eine hohe EpCAM-Expression mit einer tumorsupprimierenden Wirkung (Litvinov *et al.*, 1994; Basak *et al.*, 1998). Heute wird davon ausgegangen, dass die tumorfördernde Funktion von EpCAM, neben der Aktivierung von Zielgenen des Wnt-Signalweges, hauptsächlich in der Auflockerung der Zell-Zell-Adhäsion zu suchen ist. Diese resultiert in einer verbesserten Mortalität und Proliferation der Zellen, was wiederum die Karzinogenese und Metastasierung fördert (Winter *et al.*, 2003a). In Keimzelltumoren kann daher ebenfalls von einer tumor- und damit progressionsfördernden Funktion von EpCAM ausgegangen werden. Dafür spricht die Expression des Proteins in malignen Dottersacktumoren, nicht aber in benignen Teratomen. Diese könnte ferner annehmen lassen, dass EpCAM als positiver *feedback*-Regulator in der Lage ist, die Aktivität des Wnt-Signalweges in Dottersacktumoren weiter zu steigern. Anhand der vorgestellten Daten ist über die EpCAM-Expression eine weiterführende Unterscheidung der Keimzelltumorentitäten möglich.

Da die diagnostischen und prognostischen Charakteristika des Moleküls von zahlreichen unabhängigen Gruppen bestätigt werden konnten, resultierten sie

schließlich in mehreren Antikörper- bzw. Vakzin-basierten klinischen Studien (Baeuerle und Gires, 2007; siehe Abschnitt 1.3.3). Seit 2008 ist das Interesse an dem therapeutischen Einsatz von EpCAM-Inhibitoren verstärkt, da es als ein zusätzlicher Marker für Tumor-initiiierende Stammzellen identifiziert werden konnte (Visvader und Lindeman, 2008). Diese Zellen sind gegenüber konventionellen zytostatischen Therapieansätzen zumeist resistent. Der Beobachtung einer potentiellen Bedeutung als Stammzellmarker wird ebenfalls durch die immunhistochemische Expression des hämatopoetischen Stammzellmarkers CD34 Rechnung getragen. Bei CD34-negativen Seminomen, Embryonalen Karzinomen und Choriokarzinomen kann eine Expression des Markers lediglich in Dottersacktumoren nachgewiesen werden (Hamazaki und Okada, 2003). Seit 2009 schließlich wird EpCAM in der Therapie gegen malignen Ascites beim Ovarialkarzinom eingesetzt. Mit Removab® (Catumaxomab) handelt es sich dabei um einen bispezifischen, trifunktionalen Antikörper (Sebastian *et al.*, 2009) und den bisher einzig zugelassenen Antikörper für EpCAM weltweit.

5.5 Schlussfolgerung

Die vorgelegte Arbeit liefert die erste umfassende Analyse des Wnt/ β -Catenin-Signalweges in Keimzelltumoren des Kindesalters. Aus den erhobenen Daten ergibt sich eine weiterführende und genauere tumorbiologische Differenzierung der Subentitäten von Keimzelltumoren bei Kindern und Jugendlichen. Die Ergebnisse bieten damit zum einen ein besseres Verständnis der Progressionsschritte vom Teratom zum Dottersacktumor und liefern zum anderen die Grundlage für weiterführende Analysen, die schließlich in biologischen Therapieansätzen insbesondere bei therapieresistenten Tumoren resultieren könnten.

6 LITERATUR

- Aguilera, O., M.F. Fraga, E. Ballestar, M.F. Paz, M. Herranz, J. Espada, J.M. Garcia, A. Munoz, M. Esteller und J.M. Gonzalez-Sancho. (2006) Epigenetic inactivation of the Wnt antagonist DICKKOPF-1 (DKK-1) gene in human colorectal cancer. *Oncogene* **25**: 4116-21.
- Albihn, A., J. Loven, J. Ohlsson, L.M. Osorio und M. Henriksson. (2006) c-Myc-dependent etoposide-induced apoptosis involves activation of Bax and caspases, and PKCdelta signaling. *J Cell Biochem* **98**: 1597-614.
- Amarose, A.P., A.A. Kyriazis, E. Dorus und F. Azizi. (1977) Clinical, pathologic, and genetic findings in a case of 46,XY pure gonadal dysgenesis (Swyer's syndrome). *Am J Obstet Gynecol* **127**: 824-8.
- Amit, S., A. Hatzubai, Y. Birman, J.S. Andersen, E. Ben-Shushan, M. Mann, Y. Ben-Neriah und I. Alkalay. (2002) Axin-mediated CKI phosphorylation of beta-catenin at Ser 45: a molecular switch for the Wnt pathway. *Genes Dev* **16**: 1066-76.
- Anderson, R., T.K. Copeland, H. Scholer, J. Heasman und C. Wylie. (2000) The onset of germ cell migration in the mouse embryo. *Mech Dev* **91**: 61-8.
- Andrews, P.W. (1998) Teratocarcinomas and human embryology: pluripotent human EC cell lines. Review article. *APMIS* **106**: 158-67; discussion 167-8.
- Angers, S. und R.T. Moon. (2009) Proximal events in Wnt signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**: 468-77.
- Aqeilan, R.I., G.A. Calin und C.M. Croce. (2010) miR-15a and miR-16-1 in cancer: discovery, function and future perspectives. *Cell Death Differ* **17**: 215-20.
- Arber, N., H. Hibshoosh, S.F. Moss, T. Sutter, Y. Zhang, M. Begg, S. Wang, I.B. Weinstein und P.R. Holt. (1996) Increased expression of cyclin D1 is an early event in multistage colorectal carcinogenesis. *Gastroenterology* **110**: 669-74.
- Arias, A.M. und P. Hayward. (2006) Filtering transcriptional noise during development: concepts and mechanisms. *Nat Rev Genet* **7**: 34-44.
- Arnold, C.N., A. Goel, D. Niedzwiecki, J.M. Dowell, L. Wasserman, C. Compton, R.J. Mayer, M.M. Bertagnolli und C.R. Boland. (2004) APC promoter hypermethylation contributes to the loss of APC expression in colorectal cancers with allelic loss on 5q. *Cancer Biol Ther* **3**: 960-4.
- Askew, D.S., R.A. Ashmun, B.C. Simmons und J.L. Cleveland. (1991) Constitutive c-myc expression in an IL-3-dependent myeloid cell line suppresses cell cycle arrest and accelerates apoptosis. *Oncogene* **6**: 1915-22.
- Atkin, N.B. und M.C. Baker. (1982) Specific chromosome change, i(12p), in testicular tumours? *Lancet* **2**: 1349.
- Atkin, N.B. und M.C. Baker. (1983) i(12p): specific chromosomal marker in seminoma and malignant teratoma of the testis? *Cancer Genet Cytogenet* **10**: 199-204.
- Axelrod, J.D., K. Matsuno, S. Artavanis-Tsakonas und N. Perrimon. (1996) Interaction between Wingless and Notch signaling pathways mediated by Dishevelled. *Science* **271**: 1826-32.
- Axelrod, J.D., J.R. Miller, J.M. Shulman, R.T. Moon und N. Perrimon. (1998) Differential recruitment of Dishevelled provides signaling specificity in the planar cell polarity and Wingless signaling pathways. *Genes Dev* **12**: 2610-22.
- Baeuerle, P.A. und O. Gires. (2007) EpCAM (CD326) finding its role in cancer. *Br J Cancer* **96**: 417-23.
- Bafico, A., G. Liu, A. Yaniv, A. Gazit und S.A. Aaronson. (2001) Novel mechanism of Wnt signalling inhibition mediated by Dickkopf-1 interaction with LRP6/Arrow.

- Nat Cell Biol* **3**: 683-6.
- Bartkova, J., J. Lukas, H. Muller, D. Lutzhoft, M. Strauss und J. Bartek. (1994a) Cyclin D1 protein expression and function in human breast cancer. *Int J Cancer* **57**: 353-61.
- Bartkova, J., J. Lukas, M. Strauss und J. Bartek. (1994b) The PRAD-1/cyclin D1 oncogene product accumulates aberrantly in a subset of colorectal carcinomas. *Int J Cancer* **58**: 568-73.
- Basak, S., D. Speicher, S. Eck, W. Wunner, G. Maul, M.S. Simmons und D. Herlyn. (1998) Colorectal carcinoma invasion inhibition by CO17-1A/GA733 antigen and its murine homologue. *J Natl Cancer Inst* **90**: 691-7.
- Bellei, B., A. Pacchiarotti, M. Perez und T. Faraggiana. (2004) Frequent beta-catenin overexpression without exon 3 mutation in cutaneous lymphomas. *Mod Pathol* **17**: 1275-81.
- Belshaw, N.J., G.O. Elliott, E.A. Williams, D.M. Bradburn, S.J. Mills, J.C. Mathers und I.T. Johnson. (2004) Use of DNA from human stools to detect aberrant CpG island methylation of genes implicated in colorectal cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **13**: 1495-501.
- Besmer, P., K. Manova, R. Duttlinger, E.J. Huang, A. Packer, C. Gyssler und R.F. Bachvarova. (1993) The kit-ligand (steel factor) and its receptor c-kit/W: pleiotropic roles in gametogenesis and melanogenesis. *Dev Suppl*: 125-37.
- Bhanot, P., M. Brink, C.H. Samos, J.C. Hsieh, Y. Wang, J.P. Macke, D. Andrew, J. Nathans und R. Nusse. (1996) A new member of the frizzled family from *Drosophila* functions as a Wingless receptor. *Nature* **382**: 225-30.
- Bienz, M. und H. Clevers. (2000) Linking colorectal cancer to Wnt signaling. *Cell* **103**: 311-20.
- Binnerts, M.E., K.A. Kim, J.M. Bright, S.M. Patel, K. Tran, M. Zhou, J.M. Leung, Y. Liu, W.E. Lomas, 3rd, M. Dixon, S.A. Hazell, M. Wagle, W.S. Nie, N. Tomasevic, J. Williams, X. Zhan, M.D. Levy, W.D. Funk und A. Abo. (2007) R-Spondin1 regulates Wnt signaling by inhibiting internalization of LRP6. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 14700-5.
- Bjarnadottir, T.K., D.E. Gloriam, S.H. Hellstrand, H. Kristiansson, R. Fredriksson und H.B. Schioth. (2006) Comprehensive repertoire and phylogenetic analysis of the G protein-coupled receptors in human and mouse. *Genomics* **88**: 263-73.
- Bjorklund, P., G. Akerstrom und G. Westin. (2007) An LRP5 receptor with internal deletion in hyperparathyroid tumors with implications for deregulated WNT/beta-catenin signaling. *PLoS Med* **4**: e328.
- Blitzer, J.T. und R. Nusse. (2006) A critical role for endocytosis in Wnt signaling. *BMC Cell Biol* **7**: 28.
- Blume-Jensen, P., G. Jiang, R. Hyman, K.F. Lee, S. O'Gorman und T. Hunter. (2000) Kit/stem cell factor receptor-induced activation of phosphatidylinositol 3'-kinase is essential for male fertility. *Nat Genet* **24**: 157-62.
- Bodine, P.V., B. Stauffer, H. Ponce-de-Leon, R.A. Bhat, A. Mangine, L.M. Seestaller-Wehr, R.A. Moran, J. Billiard, S. Fukayama, B.S. Komm, K. Pitts, G. Krishnamurthy, A. Gopalsamy, M. Shi, J.C. Kern, T.J. Commons, R.P. Woodworth, M.A. Wilson, G.S. Welmaker, E.J. Trybulski und W.J. Moore. (2009) A small molecule inhibitor of the Wnt antagonist secreted frizzled-related protein-1 stimulates bone formation. *Bone* **44**: 1063-8.
- Bogenrieder, T. und M. Herlyn. (2003) Axis of evil: molecular mechanisms of cancer metastasis. *Oncogene* **22**: 6524-36.
- Bonci, D., V. Coppola, M. Musumeci, A. Addario, R. Giuffrida, L. Memeo, L. D'Urso, A. Pagliuca, M. Biffoni, C. Labbaye, M. Bartucci, G. Muto, C. Peschle und R. De Maria. (2008) The miR-15a-miR-16-1 cluster controls prostate cancer by

- targeting multiple oncogenic activities. *Nat Med* **14**: 1271-7.
- Bouchard, C., K. Thieke, A. Maier, R. Saffrich, J. Hanley-Hyde, W. Ansorge, S. Reed, P. Sicinski, J. Bartek und M. Eilers. (1999) Direct induction of cyclin D2 by Myc contributes to cell cycle progression and sequestration of p27. *EMBO J* **18**: 5321-33.
- Bovolenta, P., P. Esteve, J.M. Ruiz, E. Cisneros und J. Lopez-Rios. (2008) Beyond Wnt inhibition: new functions of secreted Frizzled-related proteins in development and disease. *J Cell Sci* **121**: 737-46.
- Brivanlou, A.H. und J.E. Darnell, Jr. (2002) Signal transduction and the control of gene expression. *Science* **295**: 813-8.
- Buendia, M.A. (2000) Genetics of hepatocellular carcinoma. *Semin Cancer Biol* **10**: 185-200.
- Burger, H., K. Nooter, A.W. Boersma, C.J. Kortland und G. Stoter. (1997) Lack of correlation between cisplatin-induced apoptosis, p53 status and expression of Bcl-2 family proteins in testicular germ cell tumour cell lines. *Int J Cancer* **73**: 592-9.
- Bussey, K.J., H.J. Lawce, E. Himoe, X.O. Shu, N.A. Heerema, E.J. Perlman, S.B. Olson und R.E. Magenis. (2001a) SNRPN methylation patterns in germ cell tumors as a reflection of primordial germ cell development. *Genes Chromosomes Cancer* **32**: 342-52.
- Bussey, K.J., H.J. Lawce, E. Himoe, X.O. Shu, R.F. Suijkerbuijk, S.B. Olson und R.E. Magenis. (2001b) Chromosomes 1 and 12 abnormalities in pediatric germ cell tumors by interphase fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* **125**: 112-8.
- Bussey, K.J., H.J. Lawce, S.B. Olson, D.C. Arthur, D.K. Kalousek, M. Krailo, R. Giller, S. Heifetz, R. Womer und R.E. Magenis. (1999) Chromosome abnormalities of eighty-one pediatric germ cell tumors: sex-, age-, site-, and histopathology-related differences--a Children's Cancer Group study. *Genes Chromosomes Cancer* **25**: 134-46.
- Cadigan, K.M. und R. Nusse. (1997) Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev* **11**: 3286-305.
- Calaminus, G., D.T. Schneider, L. Weissbach, S. Schönberger, V. Okpanyi, I. Leuschner, C. Poremba und U. Göbel. (2009) Survival after an antiangiogenetic therapy and surgery in a wide spread growing teratoma originating from a testicular mixed malignant germ cell tumor. *Klin Pädiatr* **221**: 136-40.
- Caldwell, G.M., C. Jones, K. Gensberg, S. Jan, R.G. Hardy, P. Byrd, S. Chughtai, Y. Wallis, G.M. Matthews und D.G. Morton. (2004) The Wnt antagonist sFRP1 in colorectal tumorigenesis. *Cancer Res* **64**: 883-8.
- Calin, G.A. und C.M. Croce. (2006) MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer* **6**: 857-66.
- Cameron, E.E., K.E. Bachman, S. Myohanen, J.G. Herman und S.B. Baylin. (1999) Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer. *Nat Genet* **21**: 103-7.
- Chaganti, R.S. und J. Houldsworth. (2000) Genetics and biology of adult human male germ cell tumors. *Cancer Res* **60**: 1475-82.
- Chamorro, M.N., D.R. Schwartz, A. Vonica, A.H. Brivanlou, K.R. Cho und H.E. Varmus. (2005) FGF-20 and DKK1 are transcriptional targets of beta-catenin and FGF-20 is implicated in cancer and development. *EMBO J* **24**: 73-84.
- Chan, A.O., R.R. Broaddus, P.S. Houlihan, J.P. Issa, S.R. Hamilton und A. Rashid. (2002) CpG island methylation in aberrant crypt foci of the colorectum. *Am J Pathol* **160**: 1823-30.

- Chan, S.L., Y. Cui, A. van Hasselt, H. Li, G. Srivastava, H. Jin, K.M. Ng, Y. Wang, K.Y. Lee, G.S. Tsao, S. Zhong, K.D. Robertson, S.Y. Rha, A.T. Chan und Q. Tao. (2007) The tumor suppressor Wnt inhibitory factor 1 is frequently methylated in nasopharyngeal and esophageal carcinomas. *Lab Invest* **87**: 644-50.
- Chen, C., N. Yin, B. Yin und Q. Lu. (2011) DNA methylation in thoracic neoplasms. *Cancer Lett* **301**: 7-16.
- Chen, Z., A.M. Venkatesan, C.M. Dehnhardt, O. Dos Santos, E. Delos Santos, S. Ayril-Kaloustian, L. Chen, Y. Geng, K.T. Arndt, J. Lucas, I. Chaudhary und T.S. Mansour. (2009) 2,4-Diamino-quinazolines as inhibitors of beta-catenin/Tcf-4 pathway: Potential treatment for colorectal cancer. *Bioorg Med Chem Lett* **19**: 4980-3.
- Cheyette, B.N., J.S. Waxman, J.R. Miller, K. Takemaru, L.C. Sheldahl, N. Khlebtsova, E.P. Fox, T. Earnest und R.T. Moon. (2002) Dapper, a Dishevelled-associated antagonist of beta-catenin and JNK signaling, is required for notochord formation. *Dev Cell* **2**: 449-61.
- Chien, A.J., W.H. Conrad und R.T. Moon. (2009) A Wnt survival guide: from flies to human disease. *J Invest Dermatol* **129**: 1614-27.
- Chomczynski, P. und N. Sacchi. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**: 156-9.
- Chong, J.M., A. Uren, J.S. Rubin und D.W. Speicher. (2002) Disulfide bond assignments of secreted Frizzled-related protein-1 provide insights about Frizzled homology and netrin modules. *J Biol Chem* **277**: 5134-44.
- Clevers, H. (2006) Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* **127**: 469-80.
- Cohn, S.L. und D.A. Tweddle. (2004) MYCN amplification remains prognostically strong 20 years after its "clinical debut". *Eur J Cancer* **40**: 2639-42.
- Dabdoub, A., M.J. Donohue, A. Brennan, V. Wolf, M. Montcouquiol, D.A. Sassoon, J.C. Hsieh, J.S. Rubin, P.C. Salinas und M.W. Kelley. (2003) Wnt signaling mediates reorientation of outer hair cell stereociliary bundles in the mammalian cochlea. *Development* **130**: 2375-84.
- Dahl, E., F. Wiesmann, M. Woenckhaus, R. Stoehr, P.J. Wild, J. Veeck, R. Knuchel, E. Klopocki, G. Sauter, R. Simon, W.F. Wieland, B. Walter, S. Denzinger, A. Hartmann und C.G. Hammerschmied. (2007) Frequent loss of SFRP1 expression in multiple human solid tumours: association with aberrant promoter methylation in renal cell carcinoma. *Oncogene* **26**: 5680-91.
- Damjanov, I., B. Horvat und Z. Gibas. (1993) Retinoic acid-induced differentiation of the developmentally pluripotent human germ cell tumor-derived cell line, NCCIT. *Lab Invest* **68**: 220-32.
- Dang, C.V. (1999) c-Myc target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism. *Mol Cell Biol* **19**: 1-11.
- Dann, C.E., J.C. Hsieh, A. Rattner, D. Sharma, J. Nathans und D.J. Leahy. (2001) Insights into Wnt binding and signalling from the structures of two Frizzled cysteine-rich domains. *Nature* **412**: 86-90.
- Davidoff, A.M. (2010) Pediatric oncology. *Semin Pediatr Surg* **19**: 225-33.
- DeBaun, M.R., M.J. Siegel und P.L. Choyke. (1998) Nephromegaly in infancy and early childhood: a risk factor for Wilms tumor in Beckwith-Wiedemann syndrome. *J Pediatr* **132**: 401-4.
- Debuire, B., A. Lemoine und R. Saffroy. (2002) CTNNB1 (Catenin, beta-1). In *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol.*, <http://AtlasGeneticsOncology.org/Genes/CTNNB1ID71.html>.

- Dehner, L.P. (1983) Gonadal and extragonadal germ cell neoplasia of childhood. *Hum Pathol* **14**: 493-511.
- Delozier-Blanchet, C.D., E. Engel und H. Walt. (1985) Isochromosome 12p in malignant testicular tumors. *Cancer Genet Cytogenet* **15**: 375-6.
- Deng, G., G.A. Song, E. Pong, M. Sleisenger und Y.S. Kim. (2004) Promoter methylation inhibits APC gene expression by causing changes in chromatin conformation and interfering with the binding of transcription factor CCAAT-binding factor. *Cancer Res* **64**: 2692-8.
- di Pietro, A., E.G. Vries, J.A. Gietema, D.C. Spierings und S. de Jong. (2005) Testicular germ cell tumours: the paradigm of chemo-sensitive solid tumours. *Int J Biochem Cell Biol* **37**: 2437-56.
- Diarra, D., M. Stolina, K. Polzer, J. Zwerina, M.S. Ominsky, D. Dwyer, A. Korb, J. Smolen, M. Hoffmann, C. Scheinecker, D. van der Heide, R. Landewe, D. Lacey, W.G. Richards und G. Schett. (2007) Dickkopf-1 is a master regulator of joint remodeling. *Nat Med* **13**: 156-63.
- Dissanayake, S.K., M. Wade, C.E. Johnson, M.P. O'Connell, P.D. Leotlela, A.D. French, K.V. Shah, K.J. Hewitt, D.T. Rosenthal, F.E. Indig, Y. Jiang, B.J. Nickoloff, D.D. Taub, J.M. Trent, R.T. Moon, M. Bittner und A.T. Weeraratna. (2007) The Wnt5A/protein kinase C pathway mediates motility in melanoma cells via the inhibition of metastasis suppressors and initiation of an epithelial to mesenchymal transition. *J Biol Chem* **282**: 17259-71.
- Dulaimi, E., J. Hillinck, I. Ibanez de Caceres, T. Al-Saleem und P. Cairns. (2004) Tumor suppressor gene promoter hypermethylation in serum of breast cancer patients. *Clin Cancer Res* **10**: 6189-93.
- Duval, A., J. Gayet, X.P. Zhou, B. Iacopetta, G. Thomas und R. Hamelin. (1999) Frequent frameshift mutations of the TCF-4 gene in colorectal cancers with microsatellite instability. *Cancer Res* **59**: 4213-5.
- Duval, A. und R. Hamelin. (2002) Mutations at coding repeat sequences in mismatch repair-deficient human cancers: toward a new concept of target genes for instability. *Cancer Res* **62**: 2447-54.
- Dyrso, T., J. Li, K. Wang, J. Lindebjerg, S. Kolvråa, L. Bolund, A. Jakobsen, G. Bruun-Petersen, S. Li und D.G. Cruger. (2011) Identification of chromosome aberrations in sporadic microsatellite stable and unstable colorectal cancers using array comparative genomic hybridization. *Cancer Genet* **204**: 84-95.
- Ehrlich, M. (2002) DNA methylation in cancer: too much, but also too little. *Oncogene* **21**: 5400-13.
- Eilers, M. (1999) Control of cell proliferation by Myc family genes. *Mol Cells* **9**: 1-6.
- Elliott, M., R. Bayly, T. Cole, I.K. Temple und E.R. Maher. (1994) Clinical features and natural history of Beckwith-Wiedemann syndrome: presentation of 74 new cases. *Clin Genet* **46**: 168-74.
- Espinosa, L., J. Ingles-Esteve, C. Aguilera und A. Bigas. (2003) Phosphorylation by glycogen synthase kinase-3 beta down-regulates Notch activity, a link for Notch and Wnt pathways. *J Biol Chem* **278**: 32227-35.
- Esquela-Kerscher, A. und F.J. Slack. (2006) Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* **6**: 259-69.
- Esteller, M. (2000) Epigenetic lesions causing genetic lesions in human cancer: promoter hypermethylation of DNA repair genes. *Eur J Cancer* **36**: 2294-300.
- Esteller, M. (2005) Aberrant DNA methylation as a cancer-inducing mechanism. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **45**: 629-56.
- Esteller, M. (2008) Epigenetics in cancer. *N Engl J Med* **358**: 1148-59.
- Esteller, M., A. Sparks, M. Toyota, M. Sanchez-Cespedes, G. Capella, M.A. Peinado,

- S. Gonzalez, G. Tarafa, D. Sidransky, S.J. Meltzer, S.B. Baylin und J.G. Herman. (2000) Analysis of adenomatous polyposis coli promoter hypermethylation in human cancer. *Cancer Res* **60**: 4366-71.
- Esteve, P. und P. Bovolenta. (2010) The advantages and disadvantages of sfrp1 and sfrp2 expression in pathological events. *Tohoku J Exp Med* **221**: 11-7.
- Etheridge, S.L., S. Ray, S. Li, N.S. Hamblet, N. Lijam, M. Tsang, J. Greer, N. Kardos, J. Wang, D.J. Sussman, P. Chen und A. Wynshaw-Boris. (2008) Murine dishevelled 3 functions in redundant pathways with dishevelled 1 and 2 in normal cardiac outflow tract, cochlea, and neural tube development. *PLoS Genet* **4**: e1000259.
- Evan, G.I., A.H. Wyllie, C.S. Gilbert, T.D. Littlewood, H. Land, M. Brooks, C.M. Waters, L.Z. Penn und D.C. Hancock. (1992) Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell* **69**: 119-28.
- Fearon, E.R. und B. Vogelstein. (1990) A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* **61**: 759-67.
- Fisher, D.A., S. Kivimae, J. Hoshino, R. Suriben, P.M. Martin, N. Baxter und B.N. Cheyette. (2006) Three Dact gene family members are expressed during embryonic development and in the adult brains of mice. *Dev Dyn* **235**: 2620-30.
- Fodde, R. (2002) The APC gene in colorectal cancer. *Eur J Cancer* **38**: 867-71.
- Fodde, R., J. Kuipers, C. Rosenberg, R. Smits, M. Kielman, C. Gaspar, J.H. van Es, C. Breukel, J. Wiegant, R.H. Giles und H. Clevers. (2001) Mutations in the APC tumour suppressor gene cause chromosomal instability. *Nat Cell Biol* **3**: 433-8.
- Forget, M.A., S. Turcotte, D. Beauseigle, J. Godin-Ethier, S. Pelletier, J. Martin, S. Tanguay und R. Lapointe. (2007) The Wnt pathway regulator DKK1 is preferentially expressed in hormone-resistant breast tumours and in some common cancer types. *Br J Cancer* **96**: 646-53.
- Fritsch, M.K., D.T. Schneider, A.E. Schuster, F.E. Murdoch und E.J. Perlman. (2006) Activation of Wnt/beta-catenin signaling in distinct histologic subtypes of human germ cell tumors. *Pediatr Dev Pathol* **9**: 115-31.
- Frommer, M., L.E. McDonald, D.S. Millar, C.M. Collis, F. Watt, G.W. Grigg, P.L. Molloy und C.L. Paul. (1992) A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 1827-31.
- Fukui, T., M. Kondo, G. Ito, O. Maeda, N. Sato, H. Yoshioka, K. Yokoi, Y. Ueda, K. Shimokata und Y. Sekido. (2005) Transcriptional silencing of secreted frizzled related protein 1 (SFRP 1) by promoter hypermethylation in non-small-cell lung cancer. *Oncogene* **24**: 6323-7.
- Fung, M.K., H.W. Cheung, H.L. Wong, H.F. Yuen, M.T. Ling, K.W. Chan, Y.C. Wong, A.L. Cheung und X. Wang. (2007) MAD2 expression and its significance in mitotic checkpoint control in testicular germ cell tumour. *Biochim Biophys Acta* **1773**: 821-32.
- Furukawa, S., M. Haruta, Y. Arai, S. Honda, J. Ohshima, W. Sugawara, Y. Kageyama, Y. Higashi, K. Nishida, Y. Tsunematsu, H. Nakadate, M. Ishii und Y. Kaneko. (2009) Yolk sac tumor but not seminoma or teratoma is associated with abnormal epigenetic reprogramming pathway and shows frequent hypermethylation of various tumor suppressor genes. *Cancer Sci* **100**: 698-708.
- Gaasenbeek, M., K. Howarth, A.J. Rowan, P.A. Gorman, A. Jones, T. Chaplin, Y. Liu, D. Bicknell, E.J. Davison, H. Fiegler, N.P. Carter, R.R. Roylance und I.P. Tomlinson. (2006) Combined array-comparative genomic hybridization and single-nucleotide polymorphism-loss of heterozygosity analysis reveals complex changes and multiple forms of chromosomal instability in colorectal cancers. *Cancer Res* **66**: 3471-9.

- Galm, O. und J.G. Herman. (2005) Methylation-specific polymerase chain reaction. *Methods Mol Med* **113**: 279-91.
- Gansauge, S., F. Gansauge, M. Ramadani, H. Stobbe, B. Rau, N. Harada und H.G. Beger. (1997) Overexpression of cyclin D1 in human pancreatic carcinoma is associated with poor prognosis. *Cancer Res* **57**: 1634-7.
- Gastl, G., G. Spizzo, P. Obrist, M. Dunser und G. Mikuz. (2000) Ep-CAM overexpression in breast cancer as a predictor of survival. *Lancet* **356**: 1981-2.
- Giaretti, W., T. Venesio, A. Scitutto, C. Prevosto, E. Geido und M. Risio. (2003) Near-diploid and near-triploid human sporadic colorectal adenocarcinomas differ for KRAS2 and TP53 mutational status. *Genes Chromosomes Cancer* **37**: 207-13.
- Gilbert, D., E. Rapley und J. Shipley. (2011) Testicular germ cell tumours: predisposition genes and the male germ cell niche. *Nat Rev Cancer* **11**: 278-88.
- Gillis, A.J., H.J. Stoop, R. Hersmus, J.W. Oosterhuis, Y. Sun, C. Chen, S. Guenther, J. Sherlock, I. Veltman, J. Baeten, P.J. van der Spek, P. de Alarcon und L.H. Looijenga. (2007) High-throughput microRNAome analysis in human germ cell tumours. *J Pathol* **213**: 319-28.
- Glinka, A., W. Wu, H. Delius, A.P. Monaghan, C. Blumenstock und C. Niehrs. (1998) Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction. *Nature* **391**: 357-62.
- Gloy, J., H. Hikasa und S.Y. Sokol. (2002) Frigo interacts with Dishevelled to transduce Wnt signals. *Nat Cell Biol* **4**: 351-7.
- Göbel, U. (2007) Teratome und andere Keimzelltumoren In *Therapie der Krankheiten im Kindes- und Jugendalter* (ed. D. Reinhardt). Springer.
- Göbel, U., G. Calaminus, J. Engert, P. Kaatsch, H. Gadner, J.P. Bokkerink, R.J. Hass, K. Waag, M.E. Blohm, S. Dippert, C. Teske und D. Harms. (1998) Teratomas in infancy and childhood. *Med Pediatr Oncol* **31**: 8-15.
- Göbel, U., D.T. Schneider, G. Calaminus, R.J. Haas, P. Schmidt und D. Harms. (2000) Germ-cell tumors in childhood and adolescence. GPOH MAKEI and the MAHO study groups. *Ann Oncol* **11**: 263-71.
- Gonzalez-Crussi, F. (1982) *Extragenital teratomas: Atlas of tumor pathology*. Armed Forces Inst of Pathology I, Washington DC.
- Gonzalez-Crussi, F., R.F. Winkler und D.L. Mirkin. (1978) Sacrococcygeal teratomas in infants and children: relationship of histology and prognosis in 40 cases. *Arch Pathol Lab Med* **102**: 420-5.
- Gonzalez-Sancho, J.M., O. Aguilera, J.M. Garcia, N. Pendas-Franco, C. Pena, S. Cal, A. Garcia de Herreros, F. Bonilla und A. Munoz. (2005) The Wnt antagonist DICKKOPF-1 gene is a downstream target of beta-catenin/TCF and is downregulated in human colon cancer. *Oncogene* **24**: 1098-103.
- Goss, K.H. und J. Groden. (2000) Biology of the adenomatous polyposis coli tumor suppressor. *J Clin Oncol* **18**: 1967-79.
- Gottlicher, M., S. Minucci, P. Zhu, O.H. Kramer, A. Schimpf, S. Giavara, J.P. Sleeman, F. Lo Coco, C. Nervi, P.G. Pelicci und T. Heinzel. (2001) Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *EMBO J* **20**: 6969-78.
- Grady, W.M. (2004) Genomic instability and colon cancer. *Cancer Metastasis Rev* **23**: 11-27.
- Gray, A., L. Guillou, J. Zufferey, F. Rey, A.M. Kurt, P. Jichlinski, H.J. Leisinger und J. Benhattar. (1998) Persistence of parvovirus B19 DNA in testis of patients with testicular germ cell tumours. *J Gen Virol* **79** (Pt 3): 573-9.
- Groden, J., A. Thliveris, W. Samowitz, M. Carlson, L. Gelbert, H. Albertsen, G. Joslyn, J. Stevens, L. Spirio, M. Robertson und et al. (1991) Identification and

- characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell* **66**: 589-600.
- Grotewold, L. und U. Ruther. (2002) The Wnt antagonist Dickkopf-1 is regulated by Bmp signaling and c-Jun and modulates programmed cell death. *EMBO J* **21**: 966-75.
- Grotzer, M.A., M.D. Hogarty, A.J. Janss, X. Liu, H. Zhao, A. Eggert, L.N. Sutton, L.B. Rorke, G.M. Brodeur und P.C. Phillips. (2001) MYC messenger RNA expression predicts survival outcome in childhood primitive neuroectodermal tumor/medulloblastoma. *Clin Cancer Res* **7**: 2425-33.
- Gunther, E.J., S.E. Moody, G.K. Belka, K.T. Hahn, N. Innocent, K.D. Dugan, R.D. Cardiff und L.A. Chodosh. (2003) Impact of p53 loss on reversal and recurrence of conditional Wnt-induced tumorigenesis. *Genes Dev* **17**: 488-501.
- Guo, X. und X.F. Wang. (2009) Signaling cross-talk between TGF-beta/BMP and other pathways. *Cell Res* **19**: 71-88.
- Haas, K., P. Staller, C. Geisen, J. Bartek, M. Eilers und T. Moroy. (1997) Mutual requirement of CDK4 and Myc in malignant transformation: evidence for cyclin D1/CDK4 and p16INK4A as upstream regulators of Myc. *Oncogene* **15**: 179-92.
- Hadjihannas, M.V. und J. Behrens. (2006) CIN By WNT: growth pathways, mitotic control and chromosomal instability in cancer. *Cell Cycle* **5**: 2077-81.
- Hadjihannas, M.V., M. Bruckner, B. Jerchow, W. Birchmeier, W. Dietmaier und J. Behrens. (2006) Aberrant Wnt/beta-catenin signaling can induce chromosomal instability in colon cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 10747-52.
- Hamazaki, S. und S. Okada. (2003) Expression of CD34 antigen in testicular mixed germ cell tumor. *Pathol Int* **53**: 853-7.
- Hamblet, N.S., N. Lijam, P. Ruiz-Lozano, J. Wang, Y. Yang, Z. Luo, L. Mei, K.R. Chien, D.J. Sussman und A. Wynshaw-Boris. (2002) Dishevelled 2 is essential for cardiac outflow tract development, somite segmentation and neural tube closure. *Development* **129**: 5827-38.
- Hanahan, D. und R.A. Weinberg. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* **100**: 57-70.
- Harms, D. und U. Jänig. (1986) Germ cell tumours of childhood. Report of 170 cases including 59 pure and partial yolk-sac tumours. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* **409**: 223-39.
- Harms, D., S. Zahn, U. Göbel und D.T. Schneider. (2006) Pathology and molecular biology of teratomas in childhood and adolescence. *Klin Pädiatr* **218**: 296-302.
- Harrington, E.A., M.R. Bennett, A. Fanidi und G.I. Evan. (1994) c-Myc-induced apoptosis in fibroblasts is inhibited by specific cytokines. *EMBO J* **13**: 3286-95.
- Hasle, H., A. Møller, J. Nielsen und J. Hansen. (1995) Cancer incidence in men with Klinefelter syndrome. *Br J Cancer* **71**: 416-20.
- Hawkins, N.J., I. Tomlinson, A. Meagher und R.L. Ward. (2001) Microsatellite-stable diploid carcinoma: a biologically distinct and aggressive subset of sporadic colorectal cancer. *Br J Cancer* **84**: 232-6.
- Hayatsu, H. (1996) The 5,6-double bond of pyrimidine nucleosides, a fragile site in nucleic acids. *J Biochem* **119**: 391-5.
- Haydon, R.C., A. Deyrup, A. Ishikawa, R. Heck, W. Jiang, L. Zhou, T. Feng, D. King, H. Cheng, B. Breyer, T. Peabody, M.A. Simon, A.G. Montag und T.C. He. (2002) Cytoplasmic and/or nuclear accumulation of the beta-catenin protein is a frequent event in human osteosarcoma. *Int J Cancer* **102**: 338-42.
- Hayward, P., K. Brennan, P. Sanders, T. Balayo, R. DasGupta, N. Perrimon und A. Martinez Arias. (2005) Notch modulates Wnt signalling by associating with Armadillo/beta-catenin and regulating its transcriptional activity. *Development* **132**: 1819-30.

- Hayward, P., T. Kalmar und A.M. Arias. (2008) Wnt/Notch signalling and information processing during development. *Development* **135**: 411-24.
- He, B., N. Reguart, L. You, J. Mazieres, Z. Xu, A.Y. Lee, I. Mikami, F. McCormick und D.M. Jablons. (2005) Blockade of Wnt-1 signaling induces apoptosis in human colorectal cancer cells containing downstream mutations. *Oncogene* **24**: 3054-8.
- He, T.C., A.B. Sparks, C. Rago, H. Hermeking, L. Zawel, L.T. da Costa, P.J. Morin, B. Vogelstein und K.W. Kinzler. (1998) Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* **281**: 1509-12.
- He, X., M. Semenov, K. Tamai und X. Zeng. (2004) LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/beta-catenin signaling: arrows point the way. *Development* **131**: 1663-77.
- Henegariu, O., G.H. Vance, D. Heiber, M. Pera und N.A. Heerema. (1998) Triple-color FISH analysis of 12p amplification in testicular germ-cell tumors using 12p band-specific painting probes. *J Mol Med* **76**: 648-55.
- Herlyn, D., M. Herlyn, Z. Steplewski und H. Koprowski. (1979) Monoclonal antibodies in cell-mediated cytotoxicity against human melanoma and colorectal carcinoma. *Eur J Immunol* **9**: 657-9.
- Herman, J.G., J.R. Graff, S. Myohanen, B.D. Nelkin und S.B. Baylin. (1996) Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 9821-6.
- Hermeking, H. und D. Eick. (1994) Mediation of c-Myc-induced apoptosis by p53. *Science* **265**: 2091-3.
- Hikasa, H., M. Shibata, I. Hiratani und M. Taira. (2002) The *Xenopus* receptor tyrosine kinase *Xror2* modulates morphogenetic movements of the axial mesoderm and neuroectoderm via Wnt signaling. *Development* **129**: 5227-39.
- Hirata, H., Y. Hinoda, K. Nakajima, K. Kawamoto, N. Kikuno, K. Ueno, S. Yamamura, M.S. Zaman, G. Khatri, Y. Chen, S. Saini, S. Majid, G. Deng, N. Ishii und R. Dahiya. (2010) Wnt antagonist DKK1 acts as a tumor suppressor gene that induces apoptosis and inhibits proliferation in human renal cell carcinoma. *Int J Cancer* **128**: 1793-803.
- Hobmayer, B., F. Rentzsch, K. Kuhn, C.M. Happel, C.C. von Laue, P. Snyder, U. Rothbacher und T.W. Holstein. (2000) WNT signalling molecules act in axis formation in the diploblastic metazoan *Hydra*. *Nature* **407**: 186-9.
- Hoei-Hansen, C.E., J.E. Nielsen, K. Almstrup, M.A. Hansen, N.E. Skakkebaek, E. Rajpert-DeMeyts und H. Leffers. (2004) Identification of genes differentially expressed in testes containing carcinoma in situ. *Mol Hum Reprod* **10**: 423-31.
- Honecker, F., A.M. Kersemaekers, M. Molier, P.C. Van Weeren, H. Stoop, R.R. De Krijger, K.P. Wolffenbuttel, W. Oosterhuis, C. Bokemeyer und L.H. Looijenga. (2004a) Involvement of E-cadherin and beta-catenin in germ cell tumours and in normal male fetal germ cell development. *J Pathol* **204**: 167-74.
- Honecker, F., H. Stoop, R.R. de Krijger, Y.F. Chris Lau, C. Bokemeyer und L.H. Looijenga. (2004b) Pathobiological implications of the expression of markers of testicular carcinoma in situ by fetal germ cells. *J Pathol* **203**: 849-57.
- Honorio, S., A. Agathangelou, N. Wernert, M. Rothe, E.R. Maher und F. Latif. (2003) Frequent epigenetic inactivation of the RASSF1A tumour suppressor gene in testicular tumours and distinct methylation profiles of seminoma and nonseminoma testicular germ cell tumours. *Oncogene* **22**: 461-6.
- Horii, A., S. Nakatsuru, Y. Miyoshi, S. Ichii, H. Nagase, H. Ando, A. Yanagisawa, E. Tsuchiya, Y. Kato und Y. Nakamura. (1992) Frequent somatic mutations of the APC gene in human pancreatic cancer. *Cancer Res* **52**: 6696-8.
- Houldsworth, J., V. Reuter, G.J. Bosl und R.S. Chaganti. (1997) Aberrant expression of

- cyclin D2 is an early event in human male germ cell tumorigenesis. *Cell Growth Differ* **8**: 293-9.
- Hu, J., A.E. Schuster, M.K. Fritsch, D.T. Schneider, S. Lauer und E.J. Perlman. (2001) Deletion mapping of 6q21-26 and frequency of 1p36 deletion in childhood endodermal sinus tumors by microsatellite analysis. *Oncogene* **20**: 8042-4.
- Huang, D., B. Yu, Y. Deng, W. Sheng, Z. Peng, W. Qin und X. Du. (2010) SFRP4 was overexpressed in colorectal carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* **136**: 395-401.
- Huang, H., B.M. Mahler-Araujo, A. Sankila, L. Chimelli, Y. Yonekawa, P. Kleihues und H. Ohgaki. (2000) APC mutations in sporadic medulloblastomas. *Am J Pathol* **156**: 433-7.
- Huang, J., N. Papadopoulos, A.J. McKinley, S.M. Farrington, L.J. Curtis, A.H. Wyllie, S. Zheng, J.K. Willson, S.D. Markowitz, P. Morin, K.W. Kinzler, B. Vogelstein und M.G. Dunlop. (1996) APC mutations in colorectal tumors with mismatch repair deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 9049-54.
- Huang, L., M.X. Li, L. Wang, B.K. Li, G.H. Chen, L.R. He, L. Xu und Y.F. Yuan. (2011) Prognostic value of Wnt inhibitory factor-1 expression in hepatocellular carcinoma that is independent of gene methylation. *Tumour Biol* **32**: 233-40.
- Huang, Z., L. Li und J. Wang. (2007) Hypermethylation of SFRP2 as a potential marker for stool-based detection of colorectal cancer and precancerous lesions. *Dig Dis Sci* **52**: 2287-91.
- Hurlbut, G.D., M.W. Kankel, R.J. Lake und S. Artavanis-Tsakonas. (2007) Crossing paths with Notch in the hyper-network. *Curr Opin Cell Biol* **19**: 166-75.
- Ilyas, M., I.P. Tomlinson, A. Rowan, M. Pignatelli und W.F. Bodmer. (1997) Beta-catenin mutations in cell lines established from human colorectal cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 10330-4.
- Imbeaud, S., E. Graudens, V. Boulanger, X. Barlet, P. Zaborski, E. Eveno, O. Mueller, A. Schroeder und C. Auffray. (2005) Towards standardization of RNA quality assessment using user-independent classifiers of microcapillary electrophoresis traces. *Nucleic Acids Res* **33**: e56.
- Inoki, K., H. Ouyang, T. Zhu, C. Lindvall, Y. Wang, X. Zhang, Q. Yang, C. Bennett, Y. Harada, K. Stankunas, C.Y. Wang, X. He, O.A. MacDougald, M. You, B.O. Williams und K.L. Guan. (2006) TSC2 integrates Wnt and energy signals via a coordinated phosphorylation by AMPK and GSK3 to regulate cell growth. *Cell* **126**: 955-68.
- Inukai, T., K. Furuuchi, K. Sugita, K. Uno, A. Ooi, F. Sasaki, J. Hamada, T. Moriuchi und S. Nakazawa. (2004) Nuclear accumulation of beta-catenin without an additional somatic mutation in coding region of the APC gene in hepatoblastoma from a familial adenomatous polyposis patient. *Oncol Rep* **11**: 121-6.
- Itasaki, N., C.M. Jones, S. Mercurio, A. Rowe, P.M. Domingos, J.C. Smith und R. Krumlauf. (2003) Wise, a context-dependent activator and inhibitor of Wnt signalling. *Development* **130**: 4295-305.
- Iwao, K., S. Nakamori, M. Kameyama, S. Imaoka, M. Kinoshita, T. Fukui, S. Ishiguro, Y. Nakamura und Y. Miyoshi. (1998) Activation of the beta-catenin gene by interstitial deletions involving exon 3 in primary colorectal carcinomas without adenomatous polyposis coli mutations. *Cancer Res* **58**: 1021-6.
- Jallepalli, P.V. und C. Lengauer. (2001) Chromosome segregation and cancer: cutting through the mystery. *Nat Rev Cancer* **1**: 109-17.
- Jass, J.R., V.L. Whitehall, J. Young und B.A. Leggett. (2002) Emerging concepts in colorectal neoplasia. *Gastroenterology* **123**: 862-76.
- Jiang, X., J. Tan, J. Li, S. Kivimae, X. Yang, L. Zhuang, P.L. Lee, M.T. Chan, L.W. Stanton, E.T. Liu, B.N. Cheyette und Q. Yu. (2008a) DACT3 is an epigenetic

- regulator of Wnt/beta-catenin signaling in colorectal cancer and is a therapeutic target of histone modifications. *Cancer Cell* **13**: 529-41.
- Jiang, Y., C. Prunier und P.H. Howe. (2008b) The inhibitory effects of Disabled-2 (Dab2) on Wnt signaling are mediated through Axin. *Oncogene* **27**: 1865-75.
- Jin, Z., G. Tamura, T. Tsuchiya, K. Sakata, M. Kashiwaba, M. Osakabe und T. Motoyama. (2001) Adenomatous polyposis coli (APC) gene promoter hypermethylation in primary breast cancers. *Br J Cancer* **85**: 69-73.
- Jones, A.M., E.J. Douglas, S.E. Halford, H. Fiegler, P.A. Gorman, R.R. Roylance, N.P. Carter und I.P. Tomlinson. (2005) Array-CGH analysis of microsatellite-stable, near-diploid bowel cancers and comparison with other types of colorectal carcinoma. *Oncogene* **24**: 118-29.
- Jones, P.A. und S.B. Baylin. (2002) The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* **3**: 415-28.
- Jones, S.E. und C. Jomary. (2002) Secreted Frizzled-related proteins: searching for relationships and patterns. *Bioessays* **24**: 811-20.
- Joyce, D., B. Bouzahzah, M. Fu, C. Albanese, M. D'Amico, J. Steer, J.U. Klein, R.J. Lee, J.E. Segall, J.K. Westwick, C.J. Der und R.G. Pestell. (1999) Integration of Rac-dependent regulation of cyclin D1 transcription through a nuclear factor-kappaB-dependent pathway. *J Biol Chem* **274**: 25245-9.
- Kahmann, S., P. Herter, C. Kuhnen, K.M. Müller, G. Muhr, D. Martin, M. Soddemann und O. Müller. (2002) A non-radioactive protein truncation test for the sensitive detection of all stop and frameshift mutations. *Hum Mutat* **19**: 165-72.
- Kalari, S. und G.P. Pfeifer. (2011) Identification of driver and passenger DNA methylation in cancer by epigenomic analysis. *Adv Genet* **70**: 277-308.
- Kalderon, D. (2002) Similarities between the Hedgehog and Wnt signaling pathways. *Trends Cell Biol* **12**: 523-31.
- Kalluri, R. und R.A. Weinberg. (2009) The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* **119**: 1420-8.
- Kato, N., H. Shibuya, M. Fukase, G. Tamura und T. Motoyama. (2006) Involvement of adenomatous polyposis coli (APC) gene in testicular yolk sac tumor of infants. *Hum Pathol* **37**: 48-53.
- Kato, N., G. Tamura, M. Fukase, H. Shibuya und T. Motoyama. (2003) Hypermethylation of the RUNX3 gene promoter in testicular yolk sac tumor of infants. *Am J Pathol* **163**: 387-91.
- Kawamoto, K., H. Hirata, N. Kikuno, Y. Tanaka, M. Nakagawa und R. Dahiya. (2008) DNA methylation and histone modifications cause silencing of Wnt antagonist gene in human renal cell carcinoma cell lines. *Int J Cancer* **123**: 535-42.
- Kawano, Y. und R. Kypta. (2003) Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. *J Cell Sci* **116**: 2627-34.
- Kaykas, A., J. Yang-Snyder, M. Heroux, K.V. Shah, M. Bouvier und R.T. Moon. (2004) Mutant Frizzled 4 associated with vitreoretinopathy traps wild-type Frizzled in the endoplasmic reticulum by oligomerization. *Nat Cell Biol* **6**: 52-8.
- Kazanskaya, O., A. Glinka, I. del Barco Barrantes, P. Stannek, C. Niehrs und W. Wu. (2004) R-Spondin2 is a secreted activator of Wnt/beta-catenin signaling and is required for *Xenopus* myogenesis. *Dev Cell* **7**: 525-34.
- Khan, Z., S. Vijayakumar, T.V. de la Torre, S. Rotolo und A. Bafico. (2007) Analysis of endogenous LRP6 function reveals a novel feedback mechanism by which Wnt negatively regulates its receptor. *Mol Cell Biol* **27**: 7291-301.
- Kim, M.K., D.J. Min, M. Rabin und J.D. Licht. (2011) Functional characterization of Wilms tumor-suppressor WTX and tumor-associated mutants. *Oncogene* **30**: 832-42.

- Kim, S.E., J.Y. Yoon, W.J. Jeong, S.H. Jeon, Y. Park, J.B. Yoon, Y.N. Park, H. Kim und K.Y. Choi. (2009) H-Ras is degraded by Wnt/beta-catenin signaling via beta-TrCP-mediated polyubiquitylation. *J Cell Sci* **122**: 842-8.
- Kimelman, D. und W. Xu. (2006) beta-catenin destruction complex: insights and questions from a structural perspective. *Oncogene* **25**: 7482-91.
- Kinderkrebsregister. (2009) Jahresbericht 2009. In *Deutsches Kinderkrebsregister*, <http://www.kinderkrebsregister.de/>.
- Kinzler, K.W., M.C. Nilbert, L.K. Su, B. Vogelstein, T.M. Bryan, D.B. Levy, K.J. Smith, A.C. Preisinger, P. Hedge, D. McKechnie und et al. (1991) Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21. *Science* **253**: 661-5.
- Kinzler, K.W. und B. Vogelstein. (1996) Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* **87**: 159-70.
- Klaus, A. und W. Birchmeier. (2008) Wnt signalling and its impact on development and cancer. *Nat Rev Cancer* **8**: 387-98.
- Kleihues, P., P.C. Burger und B.W. Scheithauer. (1993) The new WHO classification of brain tumours. *Brain Pathol* **3**: 255-68.
- Knudson, A.G. (2001) Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nat Rev Cancer* **1**: 157-62.
- Koch, A., D. Denkhaus, S. Albrecht, I. Leuschner, D. von Schweinitz und T. Pietsch. (1999) Childhood hepatoblastomas frequently carry a mutated degradation targeting box of the beta-catenin gene. *Cancer Res* **59**: 269-73.
- Koch, A., A. Waha, J.C. Tonn, N. Sorensen, F. Berthold, M. Wolter, J. Reifenberger, W. Hartmann, W. Friedl, G. Reifenberger, O.D. Wiestler und T. Pietsch. (2001) Somatic mutations of WNT/wingless signaling pathway components in primitive neuroectodermal tumors. *Int J Cancer* **93**: 445-9.
- Koch, A., N. Weber, A. Waha, W. Hartmann, D. Denkhaus, J. Behrens, W. Birchmeier, D. von Schweinitz und T. Pietsch. (2004) Mutations and elevated transcriptional activity of conductin (AXIN2) in hepatoblastomas. *J Pathol* **204**: 546-54.
- Koinuma, K., Y. Yamashita, W. Liu, H. Hatanaka, K. Kurashina, T. Wada, S. Takada, R. Kaneda, Y.L. Choi, S.I. Fujiwara, Y. Miyakura, H. Nagai und H. Mano. (2006) Epigenetic silencing of AXIN2 in colorectal carcinoma with microsatellite instability. *Oncogene* **25**: 139-46.
- Korkola, J.E., J. Houldsworth, R.S. Chadalavada, A.B. Olshen, D. Dobrzynski, V.E. Reuter, G.J. Bosl und R.S. Chaganti. (2006) Down-regulation of stem cell genes, including those in a 200-kb gene cluster at 12p13.31, is associated with in vivo differentiation of human male germ cell tumors. *Cancer Res* **66**: 820-7.
- Ku, M., R.P. Koche, E. Rheinbay, E.M. Mendenhall, M. Endoh, T.S. Mikkelsen, A. Presser, C. Nusbaum, X. Xie, A.S. Chi, M. Adli, S. Kasif, L.M. Ptaszek, C.A. Cowan, E.S. Lander, H. Koseki und B.E. Bernstein. (2008) Genomewide analysis of PRC1 and PRC2 occupancy identifies two classes of bivalent domains. *PLoS Genet* **4**: e1000242.
- Lammi, L., S. Arte, M. Somer, H. Jarvinen, P. Lahermo, I. Thesleff, S. Pirinen und P. Nieminen. (2004) Mutations in AXIN2 cause familial tooth agenesis and predispose to colorectal cancer. *Am J Hum Genet* **74**: 1043-50.
- Langdon, T., P. Hayward, K. Brennan, F. Wirtz-Peitz, P. Sanders, V. Zecchini, A. Friday, T. Balayo und A. Martinez Arias. (2006) Notch receptor encodes two structurally separable functions in Drosophila: a genetic analysis. *Dev Dyn* **235**: 998-1013.
- Lavergne, E., I. Hendaoui, C. Coulouarn, C. Ribault, J. Leseur, P.A. Eliat, S. Mebarki, A. Corlu, B. Clement und O. Musso. (2011) Blocking Wnt signaling by SFRP-like molecules inhibits in vivo cell proliferation and tumor growth in cells carrying active beta-catenin. *Oncogene* **30**: 423-33.

- Lee, A.Y., B. He, L. You, S. Dadfarmay, Z. Xu, J. Mazieres, I. Mikami, F. McCormick und D.M. Jablons. (2004) Expression of the secreted frizzled-related protein gene family is downregulated in human mesothelioma. *Oncogene* **23**: 6672-6.
- Lengauer, C., K.W. Kinzler und B. Vogelstein. (1997) Genetic instability in colorectal cancers. *Nature* **386**: 623-7.
- Lengauer, C., K.W. Kinzler und B. Vogelstein. (1998) Genetic instabilities in human cancers. *Nature* **396**: 643-9.
- Lepourcelet, M., Y.N. Chen, D.S. France, H. Wang, P. Crews, F. Petersen, C. Bruseo, A.W. Wood und R.A. Shivdasani. (2004) Small-molecule antagonists of the oncogenic Tcf/beta-catenin protein complex. *Cancer Cell* **5**: 91-102.
- Leucci, E., M. Cocco, A. Onnis, G. De Falco, P. van Cleef, C. Bellan, A. van Rijk, J. Nyagol, B. Byakika, S. Lazzi, P. Tosi, H. van Krieken und L. Leoncini. (2008) MYC translocation-negative classical Burkitt lymphoma cases: an alternative pathogenetic mechanism involving miRNA deregulation. *J Pathol* **216**: 440-50.
- Leung, W.K., K.F. To, E.P. Man, M.W. Chan, A.H. Bai, A.J. Hui, F.K. Chan, J.F. Lee und J.J. Sung. (2004) Detection of epigenetic changes in fecal DNA as a molecular screening test for colorectal cancer: a feasibility study. *Clin Chem* **50**: 2179-82.
- Liang, H., A.H. Coles, Z. Zhu, J. Zayas, R. Jurecic, J. Kang und S.N. Jones. (2007) Noncanonical Wnt signaling promotes apoptosis in thymocyte development. *J Exp Med* **204**: 3077-84.
- Lim, L.P., N.C. Lau, P. Garrett-Engele, A. Grimson, J.M. Schelter, J. Castle, D.P. Bartel, P.S. Linsley und J.M. Johnson. (2005) Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature* **433**: 769-73.
- Litvinov, S.V., M.P. Velders, H.A. Bakker, G.J. Fleuren und S.O. Warnaar. (1994) Ep-CAM: a human epithelial antigen is a homophilic cell-cell adhesion molecule. *J Cell Biol* **125**: 437-46.
- Liu, W., X. Dong, M. Mai, R.S. Seelan, K. Taniguchi, K.K. Krishnadath, K.C. Halling, J.M. Cunningham, L.A. Boardman, C. Qian, E. Christensen, S.S. Schmidt, P.C. Roche, D.I. Smith und S.N. Thibodeau. (2000) Mutations in AXIN2 cause colorectal cancer with defective mismatch repair by activating beta-catenin/TCF signalling. *Nat Genet* **26**: 146-7.
- Logan, C.Y. und R. Nusse. (2004) The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* **20**: 781-810.
- Looijenga, L.H., H. Stoop, H.P. de Leeuw, C.A. de Gouveia Brazao, A.J. Gillis, K.E. van Roozendaal, E.J. van Zoelen, R.F. Weber, K.P. Wolffenbuttel, H. van Dekken, F. Honecker, C. Bokemeyer, E.J. Perlman, D.T. Schneider, J. Kononen, G. Sauter und J.W. Oosterhuis. (2003a) POU5F1 (OCT3/4) identifies cells with pluripotent potential in human germ cell tumors. *Cancer Res* **63**: 2244-50.
- Looijenga, L.H., G. Zafarana, B. Grygalewicz, B. Summersgill, M. Debiec-Rychter, J. Veltman, E.F. Schoenmakers, S. Rodriguez, O. Jafer, J. Clark, A.G. van Kessel, J. Shipley, R.J. van Gurp, A.J. Gillis und J.W. Oosterhuis. (2003b) Role of gain of 12p in germ cell tumour development. *APMIS* **111**: 161-71; discussion 172-3.
- Lovig, T., G.I. Meling, C.B. Diep, L. Thorstensen, S. Norheim Andersen, R.A. Lothe und T.O. Rognum. (2002) APC and CTNNB1 mutations in a large series of sporadic colorectal carcinomas stratified by the microsatellite instability status. *Scand J Gastroenterol* **37**: 1184-93.
- Lustig, B. und J. Behrens. (2003) The Wnt signaling pathway and its role in tumor development. *J Cancer Res Clin Oncol* **129**: 199-221.

- Lustig, B., B. Jerchow, M. Sachs, S. Weiler, T. Pietsch, U. Karsten, M. van de Wetering, H. Clevers, P.M. Schlag, W. Birchmeier und J. Behrens. (2002) Negative feedback loop of Wnt signaling through upregulation of conductin/axin2 in colorectal and liver tumors. *Mol Cell Biol* **22**: 1184-93.
- Macdonald, B.T., M.V. Semenov und X. He. (2007) SnapShot: Wnt/beta-catenin signaling. *Cell* **131**: 1204.
- MacDonald, B.T., K. Tamai und X. He. (2009) Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell* **17**: 9-26.
- Maclean, K.H., U.B. Keller, C. Rodriguez-Galindo, J.A. Nilsson und J.L. Cleveland. (2003) c-Myc augments gamma irradiation-induced apoptosis by suppressing Bcl-XL. *Mol Cell Biol* **23**: 7256-70.
- Maetzel, D., S. Denzel, B. Mack, M. Canis, P. Went, M. Benk, C. Kieu, P. Papior, P.A. Baeuerle, M. Munz und O. Gires. (2009) Nuclear signalling by tumour-associated antigen EpCAM. *Nat Cell Biol* **11**: 162-71.
- Major, M.B., N.D. Camp, J.D. Berndt, X. Yi, S.J. Goldenberg, C. Hubbert, T.L. Biechele, A.C. Gingras, N. Zheng, M.J. Maccoss, S. Angers und R.T. Moon. (2007) Wilms tumor suppressor WTX negatively regulates WNT/beta-catenin signaling. *Science* **316**: 1043-6.
- Mao, B., W. Wu, G. Davidson, J. Marhold, M. Li, B.M. Mechler, H. Delius, D. Hoppe, P. Stannek, C. Walter, A. Glinka und C. Niehrs. (2002) Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/beta-catenin signalling. *Nature* **417**: 664-7.
- Marks, P.A. und R. Breslow. (2007) Dimethyl sulfoxide to vorinostat: development of this histone deacetylase inhibitor as an anticancer drug. *Nat Biotechnol* **25**: 84-90.
- Mazieres, J., B. He, L. You, Z. Xu, A.Y. Lee, I. Mikami, N. Reguart, R. Rosell, F. McCormick und D.M. Jablons. (2004) Wnt inhibitory factor-1 is silenced by promoter hypermethylation in human lung cancer. *Cancer Res* **64**: 4717-20.
- Melkonyan, H.S., W.C. Chang, J.P. Shapiro, M. Mahadevappa, P.A. Fitzpatrick, M.C. Kiefer, L.D. Tomei und S.R. Umansky. (1997) SARPs: a family of secreted apoptosis-related proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 13636-41.
- Meyer, N. und L.Z. Penn. (2008) Reflecting on 25 years with MYC. *Nat Rev Cancer* **8**: 976-90.
- Michaelson, J.S. und P. Leder. (2001) beta-catenin is a downstream effector of Wnt-mediated tumorigenesis in the mammary gland. *Oncogene* **20**: 5093-9.
- Michor, F., Y. Iwasa, B. Vogelstein, C. Lengauer und M.A. Nowak. (2005) Can chromosomal instability initiate tumorigenesis? *Semin Cancer Biol* **15**: 43-9.
- Miller, J.R. (2002) The Wnts. *Genome Biol* **3**: REVIEWS3001.
- Milovanovic, T., K. Planutis, A. Nguyen, J.L. Marsh, F. Lin, C. Hope und R.F. Holcombe. (2004) Expression of Wnt genes and frizzled 1 and 2 receptors in normal breast epithelium and infiltrating breast carcinoma. *Int J Oncol* **25**: 1337-42.
- Miyaki, M., M. Konishi, R. Kikuchi-Yanoshita, M. Enomoto, T. Igari, K. Tanaka, M. Muraoka, H. Takahashi, Y. Amada, M. Fukayama und et al. (1994) Characteristics of somatic mutation of the adenomatous polyposis coli gene in colorectal tumors. *Cancer Res* **54**: 3011-20.
- Miyazaki, M., T. Furuya, A. Shiraki, T. Sato, A. Oga und K. Sasaki. (1999) The relationship of DNA ploidy to chromosomal instability in primary human colorectal cancers. *Cancer Res* **59**: 5283-5.
- Miyoshi, Y., H. Nagase, H. Ando, A. Horii, S. Ichii, S. Nakatsuru, T. Aoki, Y. Miki, T. Mori und Y. Nakamura. (1992) Somatic mutations of the APC gene in colorectal tumors: mutation cluster region in the APC gene. *Hum Mol Genet* **1**: 229-33.

- Mizutani, K., S. Miyamoto, T. Nagahata, N. Konishi, M. Emi und M. Onda. (2005) Upregulation and overexpression of DVL1, the human counterpart of the *Drosophila* dishevelled gene, in prostate cancer. *Tumori* **91**: 546-51.
- Molenaar, J.J., M.E. Ebus, J. Koster, E. Santo, D. Geerts, R. Versteeg und H.N. Caron. (2010) Cyclin D1 is a direct transcriptional target of GATA3 in neuroblastoma tumor cells. *Oncogene* **29**: 2739-45.
- Molenaar, J.J., M.E. Ebus, J. Koster, P. van Sluis, C.J. van Noesel, R. Versteeg und H.N. Caron. (2008) Cyclin D1 and CDK4 activity contribute to the undifferentiated phenotype in neuroblastoma. *Cancer Res* **68**: 2599-609.
- Molyneaux, K.A., H. Zinszner, P.S. Kunwar, K. Schaible, J. Stebler, M.J. Sunshine, W. O'Brien, E. Raz, D. Littman, C. Wylie und R. Lehmann. (2003) The chemokine SDF1/CXCL12 and its receptor CXCR4 regulate mouse germ cell migration and survival. *Development* **130**: 4279-86.
- Moon, R.T., B. Bowerman, M. Boutros und N. Perrimon. (2002) The promise and perils of Wnt signaling through beta-catenin. *Science* **296**: 1644-6.
- Morin, P.J., A.B. Sparks, V. Korinek, N. Barker, H. Clevers, B. Vogelstein und K.W. Kinzler. (1997) Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science* **275**: 1787-90.
- Moser, A.R., E.M. Mattes, W.F. Dove, M.J. Lindstrom, J.D. Haag und M.N. Gould. (1993) ApcMin, a mutation in the murine Apc gene, predisposes to mammary carcinomas and focal alveolar hyperplasias. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 8977-81.
- Mosimann, C., G. Hausmann und K. Basler. (2009) Beta-catenin hits chromatin: regulation of Wnt target gene activation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**: 276-86.
- Mostofi, F.K. und L.H. Sobin. (1977) Histological typing of testis tumors. *WHO International Histological Classification of Tumors, No. 16*.
- Müller, H.M., M. Oberwalder, H. Fiegl, M. Morandell, G. Goebel, M. Zitt, M. Muhlthaler, D. Ofner, R. Margreiter und M. Widschwendter. (2004) Methylation changes in faecal DNA: a marker for colorectal cancer screening? *Lancet* **363**: 1283-5.
- Mullis, K.B. und F.A. Faloona. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* **155**: 335-50.
- Mund, C. und F. Lyko. (2010) Epigenetic cancer therapy: Proof of concept and remaining challenges. *Bioessays* **32**: 949-57.
- Muntean, A.G. und J.L. Hess. (2009) Epigenetic dysregulation in cancer. *Am J Pathol* **175**: 1353-61.
- Munz, M., P.A. Baeuerle und O. Gires. (2009) The emerging role of EpCAM in cancer and stem cell signaling. *Cancer Res* **69**: 5627-9.
- Murphy, D.J., M.R. Junttila, L. Pouyet, A. Karnezis, K. Shchors, D.A. Bui, L. Brown-Swigart, L. Johnson und G.I. Evan. (2008) Distinct thresholds govern Myc's biological output in vivo. *Cancer Cell* **14**: 447-57.
- Nagase, H. und Y. Nakamura. (1993) Mutations of the APC (adenomatous polyposis coli) gene. *Hum Mutat* **2**: 425-34.
- Nakatsuru, S., A. Yanagisawa, S. Ichii, E. Tahara, Y. Kato, Y. Nakamura und A. Horii. (1992) Somatic mutation of the APC gene in gastric cancer: frequent mutations in very well differentiated adenocarcinoma and signet-ring cell carcinoma. *Hum Mol Genet* **1**: 559-63.
- Nam, J.S., T.J. Turcotte, P.F. Smith, S. Choi und J.K. Yoon. (2006) Mouse cristin/R-spondin family proteins are novel ligands for the Frizzled 8 and LRP6 receptors and activate beta-catenin-dependent gene expression. *J Biol Chem* **281**: 13247-57.
- Ng, V.Y., S.N. Ang, J.X. Chan und A.B. Choo. (2009) Characterization of epithelial cell

- adhesion molecule as a surface marker on undifferentiated human embryonic stem cells. *Stem Cells* **28**: 29-35.
- Nichols, C.R., N.A. Heerema, C. Palmer, P.J. Loehrer, Sr., S.D. Williams und L.H. Einhorn. (1987) Klinefelter's syndrome associated with mediastinal germ cell neoplasms. *J Clin Oncol* **5**: 1290-4.
- Niehrs, C. (2006) Function and biological roles of the Dickkopf family of Wnt modulators. *Oncogene* **25**: 7469-81.
- Niehrs, C. und M. Boutros. (2010) Trafficking, acidification, and growth factor signaling. *Sci Signal* **3**: pe26.
- Niida, A., T. Hiroko, M. Kasai, Y. Furukawa, Y. Nakamura, Y. Suzuki, S. Sugano und T. Akiyama. (2004) DKK1, a negative regulator of Wnt signaling, is a target of the beta-catenin/TCF pathway. *Oncogene* **23**: 8520-6.
- Nomoto, S., T. Kinoshita, K. Kato, S. Otani, H. Kasuya, S. Takeda, N. Kanazumi, H. Sugimoto und A. Nakao. (2007) Hypermethylation of multiple genes as clonal markers in multicentric hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer* **97**: 1260-5.
- Nusse, R. (2003) Wnts and Hedgehogs: lipid-modified proteins and similarities in signaling mechanisms at the cell surface. *Development* **130**: 5297-305.
- Nusse, R. (2005) Cell biology: relays at the membrane. *Nature* **438**: 747-9.
- Nusse, R., A. Brown, J. Papkoff, P. Scambler, G. Shackleford, A. McMahon, R. Moon und H. Varmus. (1991) A new nomenclature for int-1 and related genes: the Wnt gene family. *Cell* **64**: 231.
- Nusse, R. und H.E. Varmus. (1982) Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell* **31**: 99-109.
- Nüsslein-Volhard, C. und E. Wieschaus. (1980) Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* **287**: 795-801.
- Ohgaki, H., J.M. Kros, Y. Okamoto, A. Gaspert, H. Huang und M.O. Kurrer. (2004) APC mutations are infrequent but present in human lung cancer. *Cancer Lett* **207**: 197-203.
- Okpanyi, V., D.T. Schneider, S. Zahn, S. Sievers, G. Calaminus, J.C. Nicholson, R.D. Palmer, I. Leuschner, A. Borkhardt und S. Schönberger. (2010) Analysis of the adenomatous polyposis coli (APC) gene in childhood and adolescent germ cell tumors. *Pediatr Blood Cancer* **56**: 384-91.
- Onnis, A., G. De Falco, G. Antonicelli, M. Onorati, C. Bellan, O. Sherman, S. Sayed und L. Leoncini. (2010) Alteration of microRNAs regulated by c-Myc in Burkitt lymphoma. *PLoS One* **5**.
- Oosterhuis, J.W. und L.H. Looijenga. (2005) Testicular germ-cell tumours in a broader perspective. *Nat Rev Cancer* **5**: 210-22.
- Oosterhuis, J.W., H. Stoop, F. Honecker und L.H. Looijenga. (2007) Why human extragonadal germ cell tumours occur in the midline of the body: old concepts, new perspectives. *Int J Androl* **30**: 256-63; discussion 263-4.
- Osborne, C.K., K. Hobbs und J.M. Trent. (1987) Biological differences among MCF-7 human breast cancer cell lines from different laboratories. *Breast Cancer Res Treat* **9**: 111-21.
- Osta, W.A., Y. Chen, K. Mikhitarian, M. Mitas, M. Salem, Y.A. Hannun, D.J. Cole und W.E. Gillanders. (2004) EpCAM is overexpressed in breast cancer and is a potential target for breast cancer gene therapy. *Cancer Res* **64**: 5818-24.
- Palmer, H.G., J.M. Gonzalez-Sancho, J. Espada, M.T. Berciano, I. Puig, J. Baulida, M. Quintanilla, A. Cano, A.G. de Herreros, M. Lafarga und A. Munoz. (2001) Vitamin D(3) promotes the differentiation of colon carcinoma cells by the induction of E-cadherin and the inhibition of beta-catenin signaling. *J Cell Biol*

154: 369-87.

- Palmer, R.D., M.J. Murray, H.K. Saini, S. van Dongen, C. Abreu-Goodger, B. Muralidhar, M.R. Pett, C.M. Thornton, J.C. Nicholson, A.J. Enright und N. Coleman. (2010) Malignant germ cell tumors display common microRNA profiles resulting in global changes in expression of messenger RNA targets. *Cancer Res* **70**: 2911-23.
- Pattillo, R.A., R.O. Hussa und J.C. Garancis. (1971) Glycogen metabolism in human hormone-producing trophoblastic cells in continuous culture. I. Regulation of glycogen metabolism by glucose. *In Vitro* **7**: 59-67.
- Pecina-Slaus, N., T. Niku Eva-Martic, V. Beros und D. Tomas. (2007) Genetic alterations of E-cadherin and beta-catenin in germinoma and teratoma: report of two central nervous system cases. *Pathol Oncol Res* **13**: 370-4.
- Peinado, H., D. Olmeda und A. Cano. (2007) Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer* **7**: 415-28.
- Pendas-Franco, N., O. Aguilera, F. Pereira, J.M. Gonzalez-Sancho und A. Munoz. (2008) Vitamin D and Wnt/beta-catenin pathway in colon cancer: role and regulation of DICKKOPF genes. *Anticancer Res* **28**: 2613-23.
- Perlman, E.J., J. Hu, D. Ho, B. Cushing, S. Lauer und R.P. Castleberry. (2000) Genetic analysis of childhood endodermal sinus tumors by comparative genomic hybridization. *J Pediatr Hematol Oncol* **22**: 100-5.
- Perlman, E.J., M.B. Valentine, C.A. Griffin und A.T. Look. (1996) Deletion of 1p36 in childhood endodermal sinus tumors by two-color fluorescence in situ hybridization: a pediatric oncology group study. *Genes Chromosomes Cancer* **16**: 15-20.
- Pfaffl, M.W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**: e45.
- Pino, M.S. und D.C. Chung. (2010) The chromosomal instability pathway in colon cancer. *Gastroenterology* **138**: 2059-72.
- Pinson, K.I., J. Brennan, S. Monkley, B.J. Avery und W.C. Skarnes. (2000) An LDL-receptor-related protein mediates Wnt signalling in mice. *Nature* **407**: 535-8.
- Polakis, P. (1999) The oncogenic activation of beta-catenin. *Curr Opin Genet Dev* **9**: 15-21.
- Polakis, P. (2000) Wnt signaling and cancer. *Genes Dev* **14**: 1837-51.
- Polakis, P. (2007) The many ways of Wnt in cancer. *Curr Opin Genet Dev* **17**: 45-51.
- Polakis, P., M. Hart und B. Rubinfeld. (1999) Defects in the regulation of beta-catenin in colorectal cancer. *Adv Exp Med Biol* **470**: 23-32.
- Popescu, N.C. und D.B. Zimonjic. (2002) Chromosome-mediated alterations of the MYC gene in human cancer. *J Cell Mol Med* **6**: 151-9.
- Portela, A. und M. Esteller. (2010) Epigenetic modifications and human disease. *Nat Biotechnol* **28**: 1057-68.
- Powell, S.M., N. Zilz, Y. Beazer-Barclay, T.M. Bryan, S.R. Hamilton, S.N. Thibodeau, B. Vogelstein und K.W. Kinzler. (1992) APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature* **359**: 235-7.
- Prentice, D.E. und A.W. Meikle. (1995) A review of drug-induced Leydig cell hyperplasia and neoplasia in the rat and some comparisons with man. *Hum Exp Toxicol* **14**: 562-72.
- Price, M.A. und D. Kalderon. (2002) Proteolysis of the Hedgehog signaling effector Cubitus interruptus requires phosphorylation by Glycogen Synthase Kinase 3 and Casein Kinase 1. *Cell* **108**: 823-35.
- Qian, J., J. Xie, S. Hong, J. Yang, L. Zhang, X. Han, M. Wang, F. Zhan, J.D.

- Shaughnessy, Jr., J. Epstein, L.W. Kwak und Q. Yi. (2007) Dickkopf-1 (DKK1) is a widely expressed and potent tumor-associated antigen in multiple myeloma. *Blood* **110**: 1587-94.
- Quelard, D., E. Lavergne, I. Hendaoui, H. Elamaa, U. Tiirola, R. Heljasvaara, T. Pihlajaniemi, B. Clement und O. Musso. (2008) A cryptic frizzled module in cell surface collagen 18 inhibits Wnt/beta-catenin signaling. *PLoS One* **3**: e1878.
- Radonic, A., S. Thulke, I.M. Mackay, O. Landt, W. Siegert und A. Nitsche. (2004) Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochem Biophys Res Commun* **313**: 856-62.
- Radu, A., V. Neubauer, T. Akagi, H. Hanafusa und M.M. Georgescu. (2003) PTEN induces cell cycle arrest by decreasing the level and nuclear localization of cyclin D1. *Mol Cell Biol* **23**: 6139-49.
- Rajagopalan, H., M.A. Nowak, B. Vogelstein und C. Lengauer. (2003) The significance of unstable chromosomes in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* **3**: 695-701.
- Rajpert-De Meyts, E. (2006) Developmental model for the pathogenesis of testicular carcinoma in situ: genetic and environmental aspects. *Hum Reprod Update* **12**: 303-23.
- Rajpert-de Meyts, E. und C.E. Hoesli-Hansen. (2007) From gonocytes to testicular cancer: the role of impaired gonadal development. *Ann N Y Acad Sci* **1120**: 168-80.
- Ralhan, R., J. Cao, T. Lim, C. Macmillan, J.L. Freeman und P.G. Walfish. (2010) EpCAM nuclear localization identifies aggressive thyroid cancer and is a marker for poor prognosis. *BMC Cancer* **10**: 331.
- Reisman, D., N.B. Elkind, B. Roy, J. Beamon und V. Rotter. (1993) c-Myc transactivates the p53 promoter through a required downstream CACGTG motif. *Cell Growth Differ* **4**: 57-65.
- Reya, T., S.J. Morrison, M.F. Clarke und I.L. Weissman. (2001) Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* **414**: 105-11.
- Rijsewijk, F., M. Schuermann, E. Wagenaar, P. Parren, D. Weigel und R. Nusse. (1987) The Drosophila homolog of the mouse mammary oncogene int-1 is identical to the segment polarity gene wingless. *Cell* **50**: 649-57.
- Rivera, M.N., W.J. Kim, J. Wells, D.R. Driscoll, B.W. Brannigan, M. Han, J.C. Kim, A.P. Feinberg, W.L. Gerald, S.O. Vargas, L. Chin, A.J. Iafrate, D.W. Bell und D.A. Haber. (2007) An X chromosome gene, WTX, is commonly inactivated in Wilms tumor. *Science* **315**: 642-5.
- Robinson, D.R., C.R. Zylstra und B.O. Williams. (2008) Wnt signaling and prostate cancer. *Curr Drug Targets* **9**: 571-80.
- Rodilla, V., A. Villanueva, A. Obrador-Hevia, A. Robert-Moreno, V. Fernandez-Majada, A. Grilli, N. Lopez-Bigas, N. Bellora, M.M. Alba, F. Torres, M. Dunach, X. Sanjuan, S. Gonzalez, T. Gridley, G. Capella, A. Bigas und L. Espinosa. (2009) Jagged1 is the pathological link between Wnt and Notch pathways in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 6315-20.
- Rodriguez, S., O. Jafer, H. Goker, B.M. Summersgill, G. Zafarana, A.J. Gillis, R.J. van Gorp, J.W. Oosterhuis, Y.J. Lu, R. Huddart, C.S. Cooper, J. Clark, L.H. Looijenga und J.M. Shipley. (2003) Expression profile of genes from 12p in testicular germ cell tumors of adolescents and adults associated with i(12p) and amplification at 12p11.2-p12.1. *Oncogene* **22**: 1880-91.
- Roy, B., J. Beamon, E. Balint und D. Reisman. (1994) Transactivation of the human p53 tumor suppressor gene by c-Myc/Max contributes to elevated mutant p53 expression in some tumors. *Mol Cell Biol* **14**: 7805-15.
- Rutkowski, S., A. von Bueren, K. von Hoff, W. Hartmann, T. Shalaby, F. Deinlein, M. Warmuth-Metz, N. Soerensen, A. Emser, U. Bode, U. Mittler, C. Urban, M.

- Benesch, R.D. Kortmann, P.G. Schlegel, J. Kuehl, T. Pietsch und M. Grotzer. (2007) Prognostic relevance of clinical and biological risk factors in childhood medulloblastoma: results of patients treated in the prospective multicenter trial HIT'91. *Clin Cancer Res* **13**: 2651-7.
- Ryo, A., M. Nakamura, G. Wulf, Y.C. Liou und K.P. Lu. (2001) Pin1 regulates turnover and subcellular localization of beta-catenin by inhibiting its interaction with APC. *Nat Cell Biol* **3**: 793-801.
- Salahshor, S., U. Kressner, L. Pahlman, B. Glimelius, G. Lindmark und A. Lindblom. (1999) Colorectal cancer with and without microsatellite instability involves different genes. *Genes Chromosomes Cancer* **26**: 247-52.
- Samaniego, F., E. Rodriguez, J. Houldsworth, V.V. Murty, M. Ladanyi, K.P. Lele, Q.G. Chen, E. Dmitrovsky, N.L. Geller, V. Reuter und et al. (1990) Cytogenetic and molecular analysis of human male germ cell tumors: chromosome 12 abnormalities and gene amplification. *Genes Chromosomes Cancer* **1**: 289-300.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch und T. Maniatis. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd Edition)*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, USA.
- Sanger, F., S. Nicklen und A.R. Coulson. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**: 5463-7.
- Sarrio, D., G. Moreno-Bueno, D. Hardisson, C. Sanchez-Estevéz, M. Guo, J.G. Herman, C. Gamallo, M. Esteller und J. Palacios. (2003) Epigenetic and genetic alterations of APC and CDH1 genes in lobular breast cancer: relationships with abnormal E-cadherin and catenin expression and microsatellite instability. *Int J Cancer* **106**: 208-15.
- Sato, H., H. Suzuki, M. Toyota, M. Nojima, R. Maruyama, S. Sasaki, H. Takagi, Y. Sogabe, Y. Sasaki, M. Idogawa, T. Sonoda, M. Mori, K. Imai, T. Tokino und Y. Shinomura. (2007) Frequent epigenetic inactivation of DICKKOPF family genes in human gastrointestinal tumors. *Carcinogenesis* **28**: 2459-66.
- Satoh, S., Y. Daigo, Y. Furukawa, T. Kato, N. Miwa, T. Nishiwaki, T. Kawasoe, H. Ishiguro, M. Fujita, T. Tokino, Y. Sasaki, S. Imaoka, M. Murata, T. Shimano, Y. Yamaoka und Y. Nakamura. (2000) AXIN1 mutations in hepatocellular carcinomas, and growth suppression in cancer cells by virus-mediated transfer of AXIN1. *Nat Genet* **24**: 245-50.
- Satoh, W., M. Matsuyama, H. Takemura, S. Aizawa und A. Shimono. (2008) Sfrp1, Sfrp2, and Sfrp5 regulate the Wnt/beta-catenin and the planar cell polarity pathways during early trunk formation in mouse. *Genesis* **46**: spcone.
- Scheurlen, W.G., G.C. Schwabe, S. Joos, J. Mollenhauer, N. Sorensen und J. Kuhl. (1998) Molecular analysis of childhood primitive neuroectodermal tumors defines markers associated with poor outcome. *J Clin Oncol* **16**: 2478-85.
- Schmidt, B.A., A. Rose, C. Steinhoff, T. Strohmeyer, M. Hartmann und R. Ackermann. (2001) Up-regulation of cyclin-dependent kinase 4/cyclin D2 expression but down-regulation of cyclin-dependent kinase 2/cyclin E in testicular germ cell tumors. *Cancer Res* **61**: 4214-21.
- Schneider, D. (2002) Habilitationsschrift - Extragonadale Keimzelltumoren bei Kindern und Jugendlichen – Untersuchungen zu Histogenese, Genetik und Klinik. In *Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin, Klinik für Kinder-Onkologie, -Hämatologie und klinische -Immunologie, Universitätsklinikum* pp. 68. Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.
- Schneider, D.T., G. Calaminus, S. Koch, C. Teske, P. Schmidt, R.J. Haas, D. Harms und U. Göbel. (2004) Epidemiologic analysis of 1,442 children and adolescents registered in the German germ cell tumor protocols. *Pediatr Blood Cancer* **42**: 169-75.
- Schneider, D.T., A.E. Schuster, M.K. Fritsch, G. Calaminus, U. Göbel, D. Harms, S.

- Lauer, T. Olson und E.J. Perlman. (2002) Genetic analysis of mediastinal nonseminomatous germ cell tumors in children and adolescents. *Genes Chromosomes Cancer* **34**: 115-25.
- Schneider, D.T., A.E. Schuster, M.K. Fritsch, G. Calaminus, D. Harms, U. Göbel und E.J. Perlman. (2001a) Genetic analysis of childhood germ cell tumors with comparative genomic hybridization. *Klin Pädiatr* **213**: 204-11.
- Schneider, D.T., A.E. Schuster, M.K. Fritsch, J. Hu, T. Olson, S. Lauer, U. Göbel und E.J. Perlman. (2001b) Multipoint imprinting analysis indicates a common precursor cell for gonadal and nongonadal pediatric germ cell tumors. *Cancer Res* **61**: 7268-76.
- Schneider, D.T., S. Zahn, S. Sievers, K. Alemzkour, G. Reifenberger, O.D. Wiestler, G. Calaminus, U. Göbel und E.J. Perlman. (2006) Molecular genetic analysis of central nervous system germ cell tumors with comparative genomic hybridization. *Mod Pathol* **19**: 864-73.
- Schraml, P., G. Schwerdtfeger, F. Burkhalter, A. Raggi, D. Schmidt, T. Ruffalo, W. King, K. Wilber, M.J. Mihatsch und H. Moch. (2003) Combined array comparative genomic hybridization and tissue microarray analysis suggest PAK1 at 11q13.5-q14 as a critical oncogene target in ovarian carcinoma. *Am J Pathol* **163**: 985-92.
- Schwartz, D.R., R. Wu, S.L. Kardia, A.M. Levin, C.C. Huang, K.A. Shedden, R. Kuick, D.E. Misek, S.M. Hanash, J.M. Taylor, H. Reed, N. Hendrix, Y. Zhai, E.R. Fearon und K.R. Cho. (2003) Novel candidate targets of beta-catenin/T-cell factor signaling identified by gene expression profiling of ovarian endometrioid adenocarcinomas. *Cancer Res* **63**: 2913-22.
- Schwarz-Romond, T., M. Fiedler, N. Shibata, P.J. Butler, A. Kikuchi, Y. Higuchi und M. Bienz. (2007a) The DIX domain of Dishevelled confers Wnt signaling by dynamic polymerization. *Nat Struct Mol Biol* **14**: 484-92.
- Schwarz-Romond, T., C. Metcalfe und M. Bienz. (2007b) Dynamic recruitment of axin by Dishevelled protein assemblies. *J Cell Sci* **120**: 2402-12.
- Scully, R.E. (1970) Gonadoblastoma. A review of 74 cases. *Cancer* **25**: 1340-56.
- Sebastian, M., P. Kiewe, W. Schuette, D. Brust, C. Peschel, F. Schneller, K.H. Ruhle, G. Nilius, R. Ewert, S. Lodziewski, B. Passlick, W. Sienel, R. Wiewrodt, M. Jager, H. Lindhofer, H. Friccius-Quecke und A. Schmittel. (2009) Treatment of malignant pleural effusion with the trifunctional antibody catumaxomab (Removab) (anti-EpCAM x Anti-CD3): results of a phase 1/2 study. *J Immunother* **32**: 195-202.
- Segditsas, S., A.J. Rowan, K. Howarth, A. Jones, S. Leedham, N.A. Wright, P. Gorman, W. Chambers, E. Domingo, R.R. Roylance, E.J. Sawyer, O.M. Sieber und I.P. Tomlinson. (2009) APC and the three-hit hypothesis. *Oncogene* **28**: 146-55.
- Segditsas, S., O.M. Sieber, A. Rowan, F. Setien, K. Neale, R.K. Phillips, R. Ward, M. Esteller und I.P. Tomlinson. (2008) Promoter hypermethylation leads to decreased APC mRNA expression in familial polyposis and sporadic colorectal tumours, but does not substitute for truncating mutations. *Exp Mol Pathol* **85**: 201-6.
- Segditsas, S. und I. Tomlinson. (2006) Colorectal cancer and genetic alterations in the Wnt pathway. *Oncogene* **25**: 7531-7.
- Semenov, M., K. Tamai und X. He. (2005) SOST is a ligand for LRP5/LRP6 and a Wnt signaling inhibitor. *J Biol Chem* **280**: 26770-5.
- Semenov, M.V., R. Habas, B.T. Macdonald und X. He. (2007) SnapShot: Noncanonical Wnt Signaling Pathways. *Cell* **131**: 1378.
- Semenov, M.V., K. Tamai, B.K. Brott, M. Kuhl, S. Sokol und X. He. (2001) Head

- inducer Dickkopf-1 is a ligand for Wnt coreceptor LRP6. *Curr Biol* **11**: 951-61.
- Serov, S.F. und R.E. Scully. (1973) Histopathological typing of ovarian tumors. *WHO International Histological Classification of Tumors, No. 9*.
- Sethi, J.K. und A. Vidal-Puig. (2010) Wnt signalling and the control of cellular metabolism. *Biochem J* **427**: 1-17.
- Seto, E.S. und H.J. Bellen. (2006) Internalization is required for proper Wingless signaling in *Drosophila melanogaster*. *J Cell Biol* **173**: 95-106.
- Shalet, S.M. (2009) Normal testicular function and spermatogenesis. *Pediatr Blood Cancer* **53**: 285-8.
- Shi, Y., J.M. Glynn, L.J. Guilbert, T.G. Cotter, R.P. Bissonnette und D.R. Green. (1992) Role for c-myc in activation-induced apoptotic cell death in T cell hybridomas. *Science* **257**: 212-4.
- Shih, Y.L., R.Y. Shyu, C.B. Hsieh, H.C. Lai, K.Y. Liu, T.Y. Chu und Y.W. Lin. (2006) Promoter methylation of the secreted frizzled-related protein 1 gene SFRP1 is frequent in hepatocellular carcinoma. *Cancer* **107**: 579-90.
- Shou, J., F. Ali-Osman, A.S. Multani, S. Pathak, P. Fedi und K.S. Srivenugopal. (2002) Human Dkk-1, a gene encoding a Wnt antagonist, responds to DNA damage and its overexpression sensitizes brain tumor cells to apoptosis following alkylation damage of DNA. *Oncogene* **21**: 878-89.
- Shtutman, M., J. Zhurinsky, I. Simcha, C. Albanese, M. D'Amico, R. Pestell und A. Ben-Ze'ev. (1999) The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 5522-7.
- Shuman, S. (1994) Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase. *J Biol Chem* **269**: 32678-84.
- Sieber, O.M., K. Heinimann, P. Gorman, H. Lamlum, M. Crabtree, C.A. Simpson, D. Davies, K. Neale, S.V. Hodgson, R.R. Roylance, R.K. Phillips, W.F. Bodmer und I.P. Tomlinson. (2002) Analysis of chromosomal instability in human colorectal adenomas with two mutational hits at APC. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 16910-5.
- Sieber, O.M., K. Heinimann und I.P. Tomlinson. (2003) Genomic instability--the engine of tumorigenesis? *Nat Rev Cancer* **3**: 701-8.
- Sievers, S., K. Alemazkour, S. Zahn, E.J. Perlman, A.J. Gillis, L.H. Looijenga, U. Göbel und D.T. Schneider. (2005) IGF2/H19 imprinting analysis of human germ cell tumors (GCTs) using the methylation-sensitive single-nucleotide primer extension method reflects the origin of GCTs in different stages of primordial germ cell development. *Genes Chromosomes Cancer* **44**: 256-64.
- Sievers, S., C. Fritzsich, M. Lehnhardt, S. Zahn, N. Kutzner, C. Kuhnen und O. Müller. (2006) Hypermethylation of the APC promoter but lack of APC mutations in myxoid/round-cell liposarcoma. *Int J Cancer* **119**: 2347-52.
- Silverman, L.R., E.P. Demakos, B.L. Peterson, A.B. Kornblith, J.C. Holland, R. Odchimar-Reissig, R.M. Stone, D. Nelson, B.L. Powell, C.M. DeCastro, J. Ellerton, R.A. Larson, C.A. Schiffer und J.F. Holland. (2002) Randomized controlled trial of azacitidine in patients with the myelodysplastic syndrome: a study of the cancer and leukemia group B. *J Clin Oncol* **20**: 2429-40.
- Skakkebaek, N.E., E. Rajpert-De Meyts und K.M. Main. (2001) Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. *Hum Reprod* **16**: 972-8.
- Skotheim, R.I., G.E. Lind, O. Monni, J.M. Nesland, V.M. Abeler, S.D. Fossa, N. Duale, G. Brunborg, O. Kallioniemi, P.W. Andrews und R.A. Lothe. (2005) Differentiation of human embryonal carcinomas in vitro and in vivo reveals expression profiles relevant to normal development. *Cancer Res* **65**: 5588-98.

- Smigel, K. (2000) Arthritis drug approved for polyp prevention blazes trail for other prevention trials. *J Natl Cancer Inst* **92**: 297-9.
- Smiraglia, D.J., J. Szymanska, S.M. Kraggerud, R.A. Lothe, P. Peltomaki und C. Plass. (2002) Distinct epigenetic phenotypes in seminomatous and nonseminomatous testicular germ cell tumors. *Oncogene* **21**: 3909-16.
- Snow, G.E., A.C. Kasper, A.M. Busch, E. Schwarz, K.E. Ewings, T. Bee, M.J. Spinella, E. Dmitrovsky und S.J. Freemantle. (2009) Wnt pathway reprogramming during human embryonal carcinoma differentiation and potential for therapeutic targeting. *BMC Cancer* **9**: 383.
- Sotelo-Avila, C., F. Gonzalez-Crussi und J.W. Fowler. (1980) Complete and incomplete forms of Beckwith-Wiedemann syndrome: their oncogenic potential. *J Pediatr* **96**: 47-50.
- Soucek, L. und G.I. Evan. (2010) The ups and downs of Myc biology. *Curr Opin Genet Dev* **20**: 91-5.
- Soule, H.D., J. Vazquez, A. Long, S. Albert und M. Brennan. (1973) A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* **51**: 1409-16.
- Sparks, A.B., P.J. Morin, B. Vogelstein und K.W. Kinzler. (1998) Mutational analysis of the APC/beta-catenin/Tcf pathway in colorectal cancer. *Cancer Res* **58**: 1130-4.
- Sperger, J.M., X. Chen, J.S. Draper, J.E. Antosiewicz, C.H. Chon, S.B. Jones, J.D. Brooks, P.W. Andrews, P.O. Brown und J.A. Thomson. (2003) Gene expression patterns in human embryonic stem cells and human pluripotent germ cell tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 13350-5.
- Spink, K.E., P. Polakis und W.I. Weis. (2000) Structural basis of the Axin-adenomatous polyposis coli interaction. *EMBO J* **19**: 2270-9.
- Spirio, L., B. Otterud, D. Stauffer, H. Lynch, P. Lynch, P. Watson, S. Lanspa, T. Smyrk, J. Cavalieri, L. Howard und et al. (1992) Linkage of a variant or attenuated form of adenomatous polyposis coli to the adenomatous polyposis coli (APC) locus. *Am J Hum Genet* **51**: 92-100.
- Spizzo, G., D. Fong, M. Wurm, C. Ensinger, P. Obrist, C. Hofer, G. Mazzoleni, G. Gastl und P. Went. (2011) EpCAM expression in primary tumour tissues and metastases: an immunohistochemical analysis. *J Clin Pathol*.
- Srivastava, M., E. Begovic, J. Chapman, N.H. Putnam, U. Hellsten, T. Kawashima, A. Kuo, T. Mitros, A. Salamov, M.L. Carpenter, A.Y. Signorovitch, M.A. Moreno, K. Kamm, J. Grimwood, J. Schmutz, H. Shapiro, I.V. Grigoriev, L.W. Buss, B. Schierwater, S.L. Dellaporta und D.S. Rokhsar. (2008) The Trichoplax genome and the nature of placozoans. *Nature* **454**: 955-60.
- Stock, C., I.M. Ambros, T. Lion, O.A. Haas, A. Zoubek, H. Gadner und P.F. Ambros. (1994) Detection of numerical and structural chromosome abnormalities in pediatric germ cell tumors by means of interphase cytogenetics. *Genes Chromosomes Cancer* **11**: 40-50.
- Stoick-Cooper, C.L., G. Weidinger, K.J. Riehle, C. Hubbert, M.B. Major, N. Fausto und R.T. Moon. (2007) Distinct Wnt signaling pathways have opposing roles in appendage regeneration. *Development* **134**: 479-89.
- Strohsnitter, W.C., K.L. Noller, R.N. Hoover, S.J. Robboy, J.R. Palmer, L. Titus-Ernstoff, R.H. Kaufman, E. Adam, A.L. Herbst und E.E. Hatch. (2001) Cancer risk in men exposed in utero to diethylstilbestrol. *J Natl Cancer Inst* **93**: 545-51.
- Sugimachi, K., K. Taguchi, S. Aishima, S. Tanaka, M. Shimada, K. Kajiyama und M. Tsuneyoshi. (2001) Altered expression of beta-catenin without genetic mutation in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Mod Pathol* **14**: 900-5.
- Summersgill, B., H. Goker, S. Weber-Hall, R. Huddart, A. Horwich und J. Shipley. (1998) Molecular cytogenetic analysis of adult testicular germ cell tumours and

- identification of regions of consensus copy number change. *Br J Cancer* **77**: 305-13.
- Surani, M.A. (2001) Reprogramming of genome function through epigenetic inheritance. *Nature* **414**: 122-8.
- Suzuki, H., E. Gabrielson, W. Chen, R. Anbazhagan, M. van Engeland, M.P. Weijnenberg, J.G. Herman und S.B. Baylin. (2002) A genomic screen for genes upregulated by demethylation and histone deacetylase inhibition in human colorectal cancer. *Nat Genet* **31**: 141-9.
- Suzuki, H., D.N. Watkins, K.W. Jair, K.E. Schuebel, S.D. Markowitz, W.D. Chen, T.P. Pretlow, B. Yang, Y. Akiyama, M. Van Engeland, M. Toyota, T. Tokino, Y. Hinoda, K. Imai, J.G. Herman und S.B. Baylin. (2004) Epigenetic inactivation of SFRP genes allows constitutive WNT signaling in colorectal cancer. *Nat Genet* **36**: 417-22.
- Suzuki, R., M. Onizuka, M. Kojima, M. Shimada, S. Fukagawa, K. Tsuboi, H. Kobayashi, A. Shintani, Y. Ogawa, H. Kawada, T. Hotta und K. Ando. (2007) Preferential hypermethylation of the Dickkopf-1 promoter in core-binding factor leukaemia. *Br J Haematol* **138**: 624-31.
- Taipale, J. und P.A. Beachy. (2001) The Hedgehog and Wnt signalling pathways in cancer. *Nature* **411**: 349-54.
- Takahashi-Yanaga, F. und M. Kahn. (2010) Targeting Wnt signaling: can we safely eradicate cancer stem cells? *Clin Cancer Res* **16**: 3153-62.
- Takahashi, K. und S. Yamanaka. (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**: 663-76.
- Takigawa, Y. und A.M. Brown. (2008) Wnt signaling in liver cancer. *Curr Drug Targets* **9**: 1013-24.
- Tamai, K., M. Semenov, Y. Kato, R. Spokony, C. Liu, Y. Katsuyama, F. Hess, J.P. Saint-Jeannet und X. He. (2000) LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction. *Nature* **407**: 530-5.
- Tamai, K., X. Zeng, C. Liu, X. Zhang, Y. Harada, Z. Chang und X. He. (2004) A mechanism for Wnt coreceptor activation. *Mol Cell* **13**: 149-56.
- Taniguchi, H., H. Yamamoto, T. Hirata, N. Miyamoto, M. Oki, K. Nosho, Y. Adachi, T. Endo, K. Imai und Y. Shinomura. (2005) Frequent epigenetic inactivation of Wnt inhibitory factor-1 in human gastrointestinal cancers. *Oncogene* **24**: 7946-52.
- Teilum, G. (1965) Classification of endodermal sinus tumour (mesoblastoma vitellinum) and so-called "embryonal carcinoma" of the ovary. *Acta Pathol Microbiol Scand* **64**: 407-29.
- Teilum, G. (1976) Comparative pathology - tumors of germ cell origin. In, pp. 32-119, Munksgaard, Copenhagen.
- Teilum, G., R. Albrechtsen und B. Norgaard-Pedersen. (1975) The histogenetic-embryologic basis for reappearance of alpha-fetoprotein in endodermal sinus tumors (yolk sac tumors) and teratomas. *Acta Pathol Microbiol Scand A* **83**: 80-6.
- Teshima, S., Y. Shimosato, S. Hirohashi, Y. Tome, I. Hayashi, H. Kanazawa und T. Kakizoe. (1988) Four new human germ cell tumor cell lines. *Lab Invest* **59**: 328-36.
- Tetsu, O. und F. McCormick. (1999) Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* **398**: 422-6.
- Thorstensen, L., G.E. Lind, T. Lovig, C.B. Diep, G.I. Meling, T.O. Rognum und R.A. Lothe. (2005) Genetic and epigenetic changes of components affecting the WNT pathway in colorectal carcinomas stratified by microsatellite instability. *Neoplasia* **7**: 99-108.

- Toft, N.J. und M.J. Arends. (1998) DNA mismatch repair and colorectal cancer. *J Pathol* **185**: 123-9.
- Torres, M.A., J.A. Yang-Snyder, S.M. Purcell, A.A. DeMarais, L.L. McGrew und R.T. Moon. (1996) Activities of the Wnt-1 class of secreted signaling factors are antagonized by the Wnt-5A class and by a dominant negative cadherin in early *Xenopus* development. *J Cell Biol* **133**: 1123-37.
- Tran, P.T., A.C. Fan, P.K. Bendapudi, S. Koh, K. Komatsubara, J. Chen, G. Horng, D.I. Bellovin, S. Giuriato, C.S. Wang, J.A. Whitsett und D.W. Felsher. (2008) Combined Inactivation of MYC and K-Ras oncogenes reverses tumorigenesis in lung adenocarcinomas and lymphomas. *PLoS One* **3**: e2125.
- Trzpis, M., P.M. McLaughlin, L.M. de Leij und M.C. Harmsen. (2007) Epithelial cell adhesion molecule: more than a carcinoma marker and adhesion molecule. *Am J Pathol* **171**: 386-95.
- Tsuchiya, T., G. Tamura, K. Sato, Y. Endoh, K. Sakata, Z. Jin, T. Motoyama, O. Usuba, W. Kimura, S. Nishizuka, K.T. Wilson, S.P. James, J. Yin, A.S. Fleisher, T. Zou, S.G. Silverberg, D. Kong und S.J. Meltzer. (2000) Distinct methylation patterns of two APC gene promoters in normal and cancerous gastric epithelia. *Oncogene* **19**: 3642-6.
- Turashvili, G., J. Bouchal, G. Burkadze und Z. Kolar. (2006) Wnt signaling pathway in mammary gland development and carcinogenesis. *Pathobiology* **73**: 213-23.
- Urakami, S., H. Shiina, H. Enokida, T. Kawakami, K. Kawamoto, H. Hirata, Y. Tanaka, N. Kikuno, M. Nakagawa, M. Igawa und R. Dahiya. (2006a) Combination analysis of hypermethylated Wnt-antagonist family genes as a novel epigenetic biomarker panel for bladder cancer detection. *Clin Cancer Res* **12**: 2109-16.
- Urakami, S., H. Shiina, H. Enokida, T. Kawakami, T. Tokizane, T. Ogishima, Y. Tanaka, L.C. Li, L.A. Ribeiro-Filho, M. Terashima, N. Kikuno, H. Adachi, T. Yoneda, H. Kishi, K. Shigeno, B.R. Konety, M. Igawa und R. Dahiya. (2006b) Epigenetic inactivation of Wnt inhibitory factor-1 plays an important role in bladder cancer through aberrant canonical Wnt/beta-catenin signaling pathway. *Clin Cancer Res* **12**: 383-91.
- Uren, A., F. Reichsman, V. Anest, W.G. Taylor, K. Muraiso, D.P. Bottaro, S. Cumberledge und J.S. Rubin. (2000) Secreted frizzled-related protein-1 binds directly to Wingless and is a biphasic modulator of Wnt signaling. *J Biol Chem* **275**: 4374-82.
- Ushijima, T. (2005) Detection and interpretation of altered methylation patterns in cancer cells. *Nat Rev Cancer* **5**: 223-31.
- Utsunomiya, T., Y. Doki, H. Takemoto, H. Shiozaki, M. Yano, M. Sekimoto, S. Tamura, T. Yasuda, Y. Fujiwara und M. Monden. (2001) Correlation of beta-catenin and cyclin D1 expression in colon cancers. *Oncology* **61**: 226-33.
- van Amerongen, R., A. Mikels und R. Nusse. (2008) Alternative wnt signaling is initiated by distinct receptors. *Sci Signal* **1**: re9.
- van der Gun, B.T., L.J. Melchers, M.H. Ruiters, L.F. de Leij, P.M. McLaughlin und M.G. Rots. (2010) EpCAM in carcinogenesis: the good, the bad or the ugly. *Carcinogenesis* **31**: 1913-21.
- Vandesompele, J., K. De Preter, F. Pattyn, B. Poppe, N. Van Roy, A. De Paepe und F. Speleman. (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* **3**: RESEARCH0034.
- Veeck, J., C. Geisler, E. Noetzel, S. Alkaya, A. Hartmann, R. Knuchel und E. Dahl. (2008a) Epigenetic inactivation of the secreted frizzled-related protein-5 (SFRP5) gene in human breast cancer is associated with unfavorable prognosis. *Carcinogenesis* **29**: 991-8.

- Veeck, J., D. Niederacher, H. An, E. Klopocki, F. Wiesmann, B. Betz, O. Galm, O. Camara, M. Durst, G. Kristiansen, C. Huszka, R. Knuchel und E. Dahl. (2006) Aberrant methylation of the Wnt antagonist SFRP1 in breast cancer is associated with unfavourable prognosis. *Oncogene* **25**: 3479-88.
- Veeck, J., E. Noetzel, N. Bektas, E. Jost, A. Hartmann, R. Knuchel und E. Dahl. (2008b) Promoter hypermethylation of the SFRP2 gene is a high-frequent alteration and tumor-specific epigenetic marker in human breast cancer. *Mol Cancer* **7**: 83.
- Veltman, I., J. Veltman, I. Janssen, C. Hulsbergen-van de Kaa, W. Oosterhuis, D. Schneider, H. Stoop, A. Gillis, S. Zahn, L. Looijenga, U. Göbel und A.G. van Kessel. (2005) Identification of recurrent chromosomal aberrations in germ cell tumors of neonates and infants using genomewide array-based comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* **43**: 367-76.
- Vibhakar, R., G. Foltz, J.G. Yoon, L. Field, H. Lee, G.Y. Ryu, J. Pierson, B. Davidson und A. Madan. (2007) Dickkopf-1 is an epigenetically silenced candidate tumor suppressor gene in medulloblastoma. *Neuro Oncol* **9**: 135-44.
- Visvader, J.E. und G.J. Lindeman. (2008) Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat Rev Cancer* **8**: 755-68.
- Vlad, A., S. Rohrs, L. Klein-Hitpass und O. Muller. (2008) The first five years of the Wnt targetome. *Cell Signal* **20**: 795-802.
- von Eyben, F.E. (2004) Chromosomes, genes, and development of testicular germ cell tumors. *Cancer Genet Cytogenet* **151**: 93-138.
- Wallingford, J.B. und R. Habas. (2005) The developmental biology of Dishevelled: an enigmatic protein governing cell fate and cell polarity. *Development* **132**: 4421-36.
- Walther, A., R. Houlston und I. Tomlinson. (2008) Association between chromosomal instability and prognosis in colorectal cancer: a meta-analysis. *Gut* **57**: 941-50.
- Wang, C., Z. Li, M. Fu, T. Bouras und R.G. Pestell. (2004) Signal transduction mediated by cyclin D1: from mitogens to cell proliferation: a molecular target with therapeutic potential. *Cancer Treat Res* **119**: 217-37.
- Wang, J., J. Shou und X. Chen. (2000) Dickkopf-1, an inhibitor of the Wnt signaling pathway, is induced by p53. *Oncogene* **19**: 1843-8.
- Wang, N., K.L. Perkins, D.L. Bronson und E.E. Fraley. (1981) Cytogenetic evidence for premeiotic transformation of human testicular cancers. *Cancer Res* **41**: 2135-40.
- Wassmann, K. und R. Benezra. (2001) Mitotic checkpoints: from yeast to cancer. *Curr Opin Genet Dev* **11**: 83-90.
- Wegert, J., S. Wittmann, I. Leuschner, E. Geissinger, N. Graf und M. Gessler. (2009) WTX inactivation is a frequent, but late event in Wilms tumors without apparent clinical impact. *Genes Chromosomes Cancer* **48**: 1102-11.
- Wei, W., Q. Lu, G.J. Chaudry, S.H. Leppla und S.N. Cohen. (2006) The LDL receptor-related protein LRP6 mediates internalization and lethality of anthrax toxin. *Cell* **124**: 1141-54.
- Weksberg, R., C. Shuman und J.B. Beckwith. (2010) Beckwith-Wiedemann syndrome. *Eur J Hum Genet* **18**: 8-14.
- Went, P.T., A. Lugli, S. Meier, M. Bundi, M. Mirlacher, G. Sauter und S. Dirnhofer. (2004) Frequent EpCam protein expression in human carcinomas. *Hum Pathol* **35**: 122-8.
- Westfall, T.A., R. Brimeyer, J. Twedt, J. Gladon, A. Olberding, M. Furutani-Seiki und D.C. Slusarski. (2003) Wnt-5/pipetail functions in vertebrate axis formation as a negative regulator of Wnt/beta-catenin activity. *J Cell Biol* **162**: 889-98.

- Willert, J., M. Epping, J.R. Pollack, P.O. Brown und R. Nusse. (2002) A transcriptional response to Wnt protein in human embryonic carcinoma cells. *BMC Dev Biol* **2**: 8.
- Willert, K., J.D. Brown, E. Danenberg, A.W. Duncan, I.L. Weissman, T. Reya, J.R. Yates, 3rd und R. Nusse. (2003) Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature* **423**: 448-52.
- Williams, B.O. und K.L. Insogna. (2009) Where Wnts went: the exploding field of Lrp5 and Lrp6 signaling in bone. *J Bone Miner Res* **24**: 171-8.
- Winklbauer, R., A. Medina, R.K. Swain und H. Steinbeisser. (2001) Frizzled-7 signalling controls tissue separation during *Xenopus* gastrulation. *Nature* **413**: 856-60.
- Winter, M.J., V. Cirulli, I.H. Briaire-de Bruijn und S.V. Litvinov. (2007) Cadherins are regulated by Ep-CAM via phosphatidylinositol-3 kinase. *Mol Cell Biochem* **302**: 19-26.
- Winter, M.J., B. Nagelkerken, A.E. Mertens, H.A. Rees-Bakker, I.H. Briaire-de Bruijn und S.V. Litvinov. (2003a) Expression of Ep-CAM shifts the state of cadherin-mediated adhesions from strong to weak. *Exp Cell Res* **285**: 50-8.
- Winter, M.J., I.D. Nagtegaal, J.H. van Krieken und S.V. Litvinov. (2003b) The epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM) as a morphoregulatory molecule is a tool in surgical pathology. *Am J Pathol* **163**: 2139-48.
- Wirhth, O., A. Waha, S. Weggen, P. Schirmacher, T. Kuhne, C.G. Goodyer, S. Albrecht, D. Von Schweinitz und T. Pietsch. (2003) Overexpression of human Dickkopf-1, an antagonist of wntless/WNT signaling, in human hepatoblastomas and Wilms' tumors. *Lab Invest* **83**: 429-34.
- Wissmann, C., P.J. Wild, S. Kaiser, S. Roepcke, R. Stoehr, M. Woenckhaus, G. Kristiansen, J.C. Hsieh, F. Hofstaedter, A. Hartmann, R. Knuechel, A. Rosenthal und C. Pilarsky. (2003) WIF1, a component of the Wnt pathway, is down-regulated in prostate, breast, lung, and bladder cancer. *J Pathol* **201**: 204-12.
- Wistuba, II, C. Behrens, S. Milchgrub, S. Syed, M. Ahmadian, A.K. Virmani, V. Kurvari, T.H. Cunningham, R. Ashfaq, J.D. Minna und A.F. Gazdar. (1998) Comparison of features of human breast cancer cell lines and their corresponding tumors. *Clin Cancer Res* **4**: 2931-8.
- Xi, S., M. Yang, Y. Tao, H. Xu, J. Shan, S. Inchauste, M. Zhang, L. Mercedes, J.A. Hong, M. Rao und D.S. Schrupp. (2010) Cigarette smoke induces C/EBP-beta-mediated activation of miR-31 in normal human respiratory epithelia and lung cancer cells. *PLoS One* **5**: e13764.
- Xu, Q., Y. Wang, A. Dabdoub, P.M. Smallwood, J. Williams, C. Woods, M.W. Kelley, L. Jiang, W. Tasman, K. Zhang und J. Nathans. (2004) Vascular development in the retina and inner ear: control by Norrin and Frizzled-4, a high-affinity ligand-receptor pair. *Cell* **116**: 883-95.
- Xu, W. und D. Kimelman. (2007) Mechanistic insights from structural studies of beta-catenin and its binding partners. *J Cell Sci* **120**: 3337-44.
- Yaccoby, S., W. Ling, F. Zhan, R. Walker, B. Barlogie und J.D. Shaughnessy, Jr. (2007) Antibody-based inhibition of DKK1 suppresses tumor-induced bone resorption and multiple myeloma growth in vivo. *Blood* **109**: 2106-11.
- Yamaguchi, T.P. (2001) Heads or tails: Wnts and anterior-posterior patterning. *Curr Biol* **11**: R713-24.
- Yamamoto, A., T. Nagano, S. Takehara, M. Hibi und S. Aizawa. (2005) Shisa promotes head formation through the inhibition of receptor protein maturation for the caudalizing factors, Wnt and FGF. *Cell* **120**: 223-35.
- Yamamoto, H., H. Komekado und A. Kikuchi. (2006) Caveolin is necessary for Wnt-3a-

- dependent internalization of LRP6 and accumulation of beta-catenin. *Dev Cell* **11**: 213-23.
- Yamashita, T., A. Budhu, M. Forgues und X.W. Wang. (2007) Activation of hepatic stem cell marker EpCAM by Wnt-beta-catenin signaling in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* **67**: 10831-9.
- Yanai, K., M. Nakamura, T. Akiyoshi, S. Nagai, J. Wada, K. Koga, H. Noshiro, E. Nagai, M. Tsuneyoshi, M. Tanaka und M. Katano. (2008) Crosstalk of hedgehog and Wnt pathways in gastric cancer. *Cancer Lett* **263**: 145-56.
- Yang-Snyder, J., J.R. Miller, J.D. Brown, C.J. Lai und R.T. Moon. (1996) A frizzled homolog functions in a vertebrate Wnt signaling pathway. *Curr Biol* **6**: 1302-6.
- Yen, C.C., Y.J. Chen, J.T. Chen, J.Y. Hsia, P.M. Chen, J.H. Liu, F.S. Fan, T.J. Chiou, W.S. Wang und C.H. Lin. (2001) Comparative genomic hybridization of esophageal squamous cell carcinoma: correlations between chromosomal aberrations and disease progression/prognosis. *Cancer* **92**: 2769-77.
- Ying, Y. und Q. Tao. (2009) Epigenetic disruption of the WNT/beta-catenin signaling pathway in human cancers. *Epigenetics* **4**: 307-12.
- Yoo, C.B. und P.A. Jones. (2006) Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. *Nat Rev Drug Discov* **5**: 37-50.
- Yoshikawa, S., R.D. McKinnon, M. Kokel und J.B. Thomas. (2003) Wnt-mediated axon guidance via the Drosophila Derailed receptor. *Nature* **422**: 583-8.
- Yost, C., M. Torres, J.R. Miller, E. Huang, D. Kimelman und R.T. Moon. (1996) The axis-inducing activity, stability, and subcellular distribution of beta-catenin is regulated in *Xenopus* embryos by glycogen synthase kinase 3. *Genes Dev* **10**: 1443-54.
- Yue, W., Q. Sun, S. Dacic, R.J. Landreneau, J.M. Siegfried, J. Yu und L. Zhang. (2008) Downregulation of Dkk3 activates beta-catenin/TCF-4 signaling in lung cancer. *Carcinogenesis* **29**: 84-92.
- Zaanan, A., K. Meunier, F. Sangar, J.F. Flejou und F. Praz. (2011) Microsatellite instability in colorectal cancer: from molecular oncogenic mechanisms to clinical implications. *Cell Oncol (Dordr)*.
- Zafarana, G., A.J. Gillis, R.J. van Gurp, P.G. Olsson, F. Elstrodt, H. Stoop, J.L. Millan, J.W. Oosterhuis und L.H. Looijenga. (2002) Coamplification of DAD-R, SOX5, and EKI1 in human testicular seminomas, with specific overexpression of DAD-R, correlates with reduced levels of apoptosis and earlier clinical manifestation. *Cancer Res* **62**: 1822-31.
- Zafarana, G., B. Grygalewicz, A.J. Gillis, L.E. Vissers, W. van de Vliet, R.J. van Gurp, H. Stoop, M. Debiec-Rychter, J.W. Oosterhuis, A.G. van Kessel, E.F. Schoenmakers, L.H. Looijenga und J.A. Veltman. (2003) 12p-amplicon structure analysis in testicular germ cell tumors of adolescents and adults by array CGH. *Oncogene* **22**: 7695-701.
- Zahn, S., S. Sievers, K. Alemzkour, S. Orb, D. Harms, W.A. Schulz, G. Calaminus, U. Göbel und D.T. Schneider. (2006) Imbalances of chromosome arm 1p in pediatric and adult germ cell tumors are caused by true allelic loss: a combined comparative genomic hybridization and microsatellite analysis. *Genes Chromosomes Cancer* **45**: 995-1006.
- Zhang, L., X. Gao, J. Wen, Y. Ning und Y.G. Chen. (2006) Dapper 1 antagonizes Wnt signaling by promoting dishevelled degradation. *J Biol Chem* **281**: 8607-12.
- Zhang, L., H. Zhou, Y. Su, Z. Sun, H. Zhang, Y. Zhang, Y. Ning, Y.G. Chen und A. Meng. (2004) Zebrafish Dpr2 inhibits mesoderm induction by promoting degradation of nodal receptors. *Science* **306**: 114-7.
- Zhou, S., K. Eid und J. Glowacki. (2004) Cooperation between TGF-beta and Wnt pathways during chondrocyte and adipocyte differentiation of human marrow

stromal cells. *J Bone Miner Res* **19**: 463-70.

Ziegler, S., S. Rohrs, L. Tickenbrock, T. Moroy, L. Klein-Hitpass, I.R. Vetter und O. Müller. (2005) Novel target genes of the Wnt pathway and statistical insights into Wnt target promoter regulation. *FEBS J* **272**: 1600-15.

Zitterbart, K., H. Filkova, L. Tomasikova, E. Necesalova, I. Zambo, D. Kantorova, I. Slamova, V. Vranova, D. Zezulkova, M. Pesakova, Z. Pavelka, R. Veselska, P. Kuglik und J. Sterba. (2010) Low-level copy number changes of MYC genes have a prognostic impact in medulloblastoma. *J Neurooncol* **102**: 25-33.

7 PUBLIKATIONEN UND KONGRESSBEITRÄGE

Ein Teil der Forschungsergebnisse dieser Arbeit wurde in Fachzeitschriften publiziert bzw. auf wissenschaftlichen Kongressen in Form von Vorträgen oder Postern präsentiert. Weitere Teile dieser Arbeit sollen zur Veröffentlichung eingereicht werden.

Originalpublikationen

Okpanyi V., Schneider D.T., Zahn S., Alemazkour K., Sievers S., Calaminus G., Nicholson J.C., Palmer R., Leuschner I., Borkhardt A., Schönberger S. **2010**. Analysis of the Adenomatous Polyposis Coli (APC) Gene in Childhood and Adolescent Germ Cell Tumors. *Pediatric Blood & Cancer* 56: 384-91.

Calaminus G., Schneider D.T., Weissbach L., Schönberger S., **Okpanyi V.**, Leuschner I., Poremba C., Göbel U. **2009**. Survival after an antiangiogenetic therapy and surgery in a wide spread growing teratoma originating from a testicular mixed malignant germ cell tumor. *Klin Pädiatr* 221: 136-140.

Vorträge

Okpanyi V., Schneider D., Alemazkour K., Looijenga L., Nicholson J.C., Borkhardt A., Schönberger S. **2010**. Extracellular regulators of the Wnt signalling pathway in childhood germ cell tumors: Methylation of the SFRP2 promotor leads to Wnt activation and β -Catenin accumulation. 42nd Congress of the International Society of Paediatric Oncology (SIOP), Boston.

Okpanyi V., Schönberger S., Alemazkour K., Borkhardt A., Schneider D.T. **2009**. Wnt signalling in childhood germ cell tumors – dysregulation of extracellular Wnt inhibitors as a reason for tumor progression? XXII. Jahrestagung der Kind-Philipp-Stiftung für Leukämieforschung in Wilsede, #T-16.3.

Okpanyi V., Schönberger S., Alemazkour K., Zahn S., Sievers S., Göbel U., Borkhardt A., Schneider D.T. **2008**. Progression of Germ Cell Tumors (GCT) in childhood may be induced by a constitutive activation of the Wnt signalling pathway caused by genetic and epigenetic alterations and disturbed gene expression levels of several Wnt regulators. XXI. Jahrestagung der Kind-Philipp-Stiftung für Leukämieforschung in Wilsede, #T-3.f.

Poster

Okpanyi V., Alemazkour K., Borkhardt A., Schneider D.T. Schönberger S. **2009**. Analyse intra- und extrazellulärer Regulatoren des Wnt-Signalweges in Keimzelltumoren des Kindes- und Jugendalters. 74. wissenschaftliche Halbjahrestagung der Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie

(GPOH), Frankfurt a. M.

Okpanyi V., Alemazkour K., Zahn S., Sievers S., Göbel U., Borkhardt A., Schneider D.T., Schönberger S. **2008**. The wnt signaling pathway in childhood Germ Cell Tumors (GCT): Evidence on its activation in tumor progression caused by genetic and epigenetic alterations. *15th International AEK Cancer Congress*, Berlin, #P-G-30.

Schönberger S., **Okpanyi V.**, Alemazkour K., Zahn S., Sievers S., Göbel U., Borkhardt A., Schneider D.T., **2008**. The wnt signaling pathway in childhood Germ Cell Tumors (GCT): Evidence on its activation in tumor progression caused by genetic and epigenetic alterations of several Wnt regulators. *40th Congress of the International Society of Paediatric Oncology (SIOP)*, Berlin.

8 ANHANG

8.1 Übersicht der Tumorfälle

Tabelle 8.1. Detaillierte Auflistung analysierter Tumorfälle.

Die Tabelle umfasst die Datenbank-Identnummer (#ID), das Alter in Jahren bei Diagnosestellung, das Geschlecht, die Histologie, die Zuteilung zur Analyse-Gruppe (Gruppe), die Tumor-Lokalisation (Lokalisation), die klinische Anamnese, die Behandlung mit Chemotherapie (Chemotherapie) und Angaben zum klinischen Verlauf (Status). CHC, Choriokarzinom; CR, complete remission; DOC, dead of complications; DOD, dead of disease; DYS, Dysgerminom; EC, Embryonales Karzinom; IT, unreifes Teratom; k.A., keine Angabe; m, männlich; MGCT, gemischter maligner Keimzelltumor; TER, reifes Teratom; w, weiblich; YST, Dottersacktumor.

#ID	Alter (Jahre)	Geschlecht	Histologie	Gruppe	Lokalisation	Klinische Anamnese	Chemotherapie	Status
133	1,1	w	TER	TER	präsakral	Primär	Z.n.C.	k.A.
39	1,4	w	TER	TER	Steiß	Primär	Z.n.C.	CR
155	4,1	w	TER	TER	Becken	Primär	ohne	k.A.
1	9,5	w	TER (+IT)	TER	Ovar	k.A.	k.A.	CR
23	13,9	w	TER	TER	Ovar	Rezidiv	ohne	CR
136	51,9	m	TER	TER	Steiß	Primär	ohne	k.A.
74	16,8	m	IT	IT	thorakal	Rezidiv	Z.n.C.	DOD
89	0,0	m	IT I	IT	Grenzstrang	Primär	ohne	CR
104	0,5	w	IT I (+YST)	IT	Steiß	Rezidiv	ohne	CR
20	0,0	m	IT II	IT	Halsbereich	Primär	ohne	k.A.
66	0,0	w	IT II	IT	Steiß	k.A.	k.A.	CR
2	0,4	m	IT II	IT	Retroperitoneum	Primär	ohne	CR
55	0,7	m	IT II	IT	Steiß	Primär	ohne	CR
78	0,4	m	IT III	IT	Steiß	Primär	ohne	k.A.
76	1,1	w	IT II (+YST)	IT	Ovar	Primär	ohne	k.A.
119	0,1	w	YST (+TER)	YST	Steiß	Primär	ohne	DOD?
69	0,7	k.a.	YST	YST	k.A.	Primär	ohne	k.A.
14	0,8	w	TER + YST	YST	Steiß	k.A.	k.A.	CR
U420	1,0	w	YST	YST	Ovar	k.A.	ohne	k.A.

63	1,3	w	YST	YST	Steiß	Primär	ohne	CR
U45	1,3	m	YST	YST	Hoden	k.A.	ohne	k.A.
U363	1,3	m	YST	YST	Hoden	k.A.	ohne	k.A.
126	1,5	m	YST	YST	Hoden	Primär	ohne	k.A.
3	1,6	m	YST	YST	Hoden	Primär	ohne	k.A.
82	2,0	m	YST	YST	Steiß	Primär	ohne	k.A.
8	2,1	w	YST	YST	Steiß	Rezidiv	ohne	CR
4	3,1	w	YST	YST	Steiß	Primär	ohne	CR
154	3,6	m	YST	YST	Becken	Primär	ohne	CR
U3	14,4	w	YST	YST	Ovar	k.A.	k.A.	k.A.
9	16,0	w	YST	YST	Ovar	Primär	ohne	DOD
34	16,0	w	YST	YST	Becken	Rezidiv	ohne	k.A.
54	8,3	w	EC	MGCT	Ovar	Primär	ohne	CR
48	9,9	w	MGCT (YST+DYS+IT+EC)	MGCT	Ovar	Primär	ohne	k.A.
19	10,0	w	MGCT (DYS+CHC)	MGCT	Ovar	Primär	ohne	CR
6	11,7	w	MGCT (TER+YST+EC+CHC)	MGCT	Ovar	Primär	ohne	CR
90	15,0	m	MGCT (YST+EC+CHC+TER)	MGCT	Hoden	Primär	ohne	k.A.
111	15,2	m	MGCT (EC+IT+CHC)	MGCT	Hoden	Primär	ohne	CR
51	15,3	m	MGCT (EC+YST)	MGCT	Hoden	Primär	ohne	k.A.
68	16,6	m	MGCT (TER+EC)	MGCT	Hoden	Primär	ohne	k.A.
99	18,0	m	MGCT	MGCT	Hoden	Metast.	Z.n.C.	CR
122	18,1	m	MGCT (CHC+YST)	MGCT	Hoden	Primär	ohne	CR
11	9,5	w	DYS	DYS	Ovar	Primär	ohne	DOC
43	11,5	w	DYS	DYS	Ovar	k.A.	k.A.	k.A.
U212	11,8	w	DYS	DYS	Ovar	k.A.	ohne	k.A.
10	12,5	w	DYS	DYS	Ovar	Primär	ohne	CR
33	12,8	w	DYS	DYS	Ovar	Primär	ohne	CR
U144	12,8	w	DYS	DYS	Ovar	k.A.	ohne	k.A.
31	15,2	w	DYS	DYS	Ovar	Primär	ohne	CR
57	15,4	w	DYS	DYS	Ovar	Primär	ohne	CR
46	16,1	w	Gonadoblastom	DYS	Ovar	k.A.	k.A.	k.A.

8.2 Übersicht der pro Tumorfall durchgeführten Analysen

Tabelle 8.2. Detaillierte Auflistung pro Tumorfall durchgeführter Analysen.

1–20, Quantitative Real-Time PCR (qPCR): (1) CTNNB1, (2) CCND1, (3) cMYC, (4) FZD2, (5) APC, (6) AXIN1, (7) AXIN2, (8) GSK3 β , (9) WTX, (10) HRAS, (11) DACT3, (12) SNAI1, (13) DVL1, (14) EpCAM, (15) SFRP1, (16) SFRP4, (17) SFRP5, (18) SFRP2, (19) DKK1, (20) WIF1. 21–23, Immunhistochemie (IHC): (21) β -Catenin, (22) EpCAM, (23) SFRP2. 24–26, Mutationsanalyse (Mutation): (24) CTNNB1, (25) APC, (26) WTX. 27–29, Methylierungsspezifische PCR (MSP): (27) APC, (28) SFRP2, (29) DKK1. 30–31, Bisulfidsequenzierung (BGS): (30) APC, (31) DKK1. Mikrosatelliten-Analyse (LOH): (32) APC. Protein Truncation Test: (33) APC.

#ID	qPCR																				IHC			Mutation			MSP			BGS		LOH	PTT		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33		
133	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x						x			x						
39	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x				x	x	x	x	x	x					x	
155			x	x		x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x						x		x	x						
1	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x				x	x	x	x	x	x	x				x	
23	x	x	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		x	x	x	x	x	x	x		x	x		
136	x	x			x			x	x															x	x	x	x		x	x					
74	x	x			x			x	x															x	x	x	x		x	x				x	
89	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		x	x		
104																																			
20																										x	x	x	x		x	x			x
66			x	x		x	x			x	x	x	x	x	x		x		x																
2																								x	x	x	x		x	x				x	
55	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x				x	
78	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x				x	
76		x	x	x		x	x			x	x	x	x	x	x		x		x		x	x		x	x	x	x	x	x	x		x	x		
119	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x				x	
69			x	x		x	x			x	x	x	x	x	x		x		x					x											
14	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x				x	
U420	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x																x
63	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x				x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
U45	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x									x	x	x					
U363	x	x			x			x	x								x		x																

126	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x				x	x	x	x		x	x			x		
3	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x				x	x	x	x	x	x	x			x		
82	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x			x			
8																							x	x	x	x		x	x			x		
4	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		
154			x	x		x	x		x	x	x	x	x	x	x		x	x	x						x		x	x						
U3		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x							x	x	x						
9	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		x	x	x					x	x	x	x	x	x			x		
34																								x	x	x	x	x	x		x	x		
54	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		
48	x	x			x			x	x								x		x					x	x	x	x	x	x		x	x		
19	x	x	x	x	x	x	x	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		
6	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		x	x		x	
90	x	x			x			x	x								x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
111	x	x			x			x	x										x					x	x	x	x		x	x		x	x	
51	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x					x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
68																									x	x		x		x			x	
99	x	x			x			x	x										x						x	x	x	x		x	x		x	x
122	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x					x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
11																									x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
43	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x					x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
U212	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x							x								
10		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x					x	x	x	x	x	x	x			x	
33			x	x		x	x		x		x	x	x	x	x	x	x	x	x						x	x	x	x	x	x		x	x	
U144	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x							x		x						
31																									x	x	x	x		x	x		x	x
57	x	x	x	x	x	x	x	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x					x	x	x	x	x	x	x			x	x
46																									x	x	x	x		x	x			x

8.3 Epigenetische Analysen der Gene *APC*, *DKK1* und *SFRP2*

A	#133	#39	#155	#1	#23	#136	#74	#89	#104	#20	#66	#2	#55	#78	#76
APC MSP	n.a.		n.a.						n.a.		n.a.				
APC BGS				1	1,8	0,8	68	1,4		2,6		1,5	0	1,1	1
DKK1 MSP															
SFRP2 MSP	n.a.					n.a.	n.a.		n.a.	n.a.		n.a.			

B	#119	#69	#14	#U420	#63	#U45	#U363	#126	#3	#82	#8	#4	#154	#U3	#9	#34
APC MSP		n.a.		n.a.			n.a.						n.a.			
APC BGS	82		45		79			47	68	54	68	76			1,3	33
DKK1 MSP		n.a.														
SFRP2 MSP		n.a.		n.a.			n.a.	n.a.			n.a.					

C	#54	#48	#19	#6	#90	#111	#51	#68	#99	#122
APC MSP										
APC BGS	3,7	5	1	51	18	1	1		0	35
DKK1 MSP										
SFRP2 MSP				n.a.		n.a.		n.a.	n.a.	

D	#11	#43	#212	#10	#33	#144	#31	#57	#46
APC MSP									
APC BGS	1	1,3		2,4	1		2,3	0	1
DKK1 MSP			n.a.						
SFRP2 MSP			n.a.			n.a.	n.a.		n.a.

Abbildung 8.1: Methylierungsstatus der Gene *APC*, *DKK1* und *SFRP2* in KZT.

Schematisch dargestellt sind die Ergebnisse der methylierungsspezifischen PCRs (MSP) an den Promotorregionen der Gene *APC*, *DKK1* und *SFRP2* für (A) Teratome, (B) Dottersacktumoren, (C) gemischte maligne KZT sowie (D) Dysgerminome. Die Spalten repräsentieren die Ergebnisse für den einzelnen Tumor, der mit seiner jeweiligen Datenbank-Identnummer (#) codiert ist. Ergänzend angegeben ist die mittels Bisulfitsequenzierung (BGS) analysierte Methylierung (%) des *APC*-Promotors. Proben ohne Angabe einer Zahl wurden nicht analysiert. In der MSP symbolisieren schwarze Rechtecke einen methylierten Status der analysierten CpGs, graue Rechtecke einen unmethylierten Status. In den methylierungsspezifischen PCRs von *APC* und *SFRP2* wiesen alle methyliert vorliegenden Proben neben dem methylierten Produkt ebenfalls ein unmethyliertes Produkt auf, dargestellt wurde hier daher nur der methylierte bzw. der ausschließlich unmethylierte Status (d.h. gegebenenfalls auch im Fall eines gemischten Methylierungszustands). n.a., nicht-analysiert.

8.4 Plasmidkarte des pCR[®]2.1-TOPO[®]-Vektor

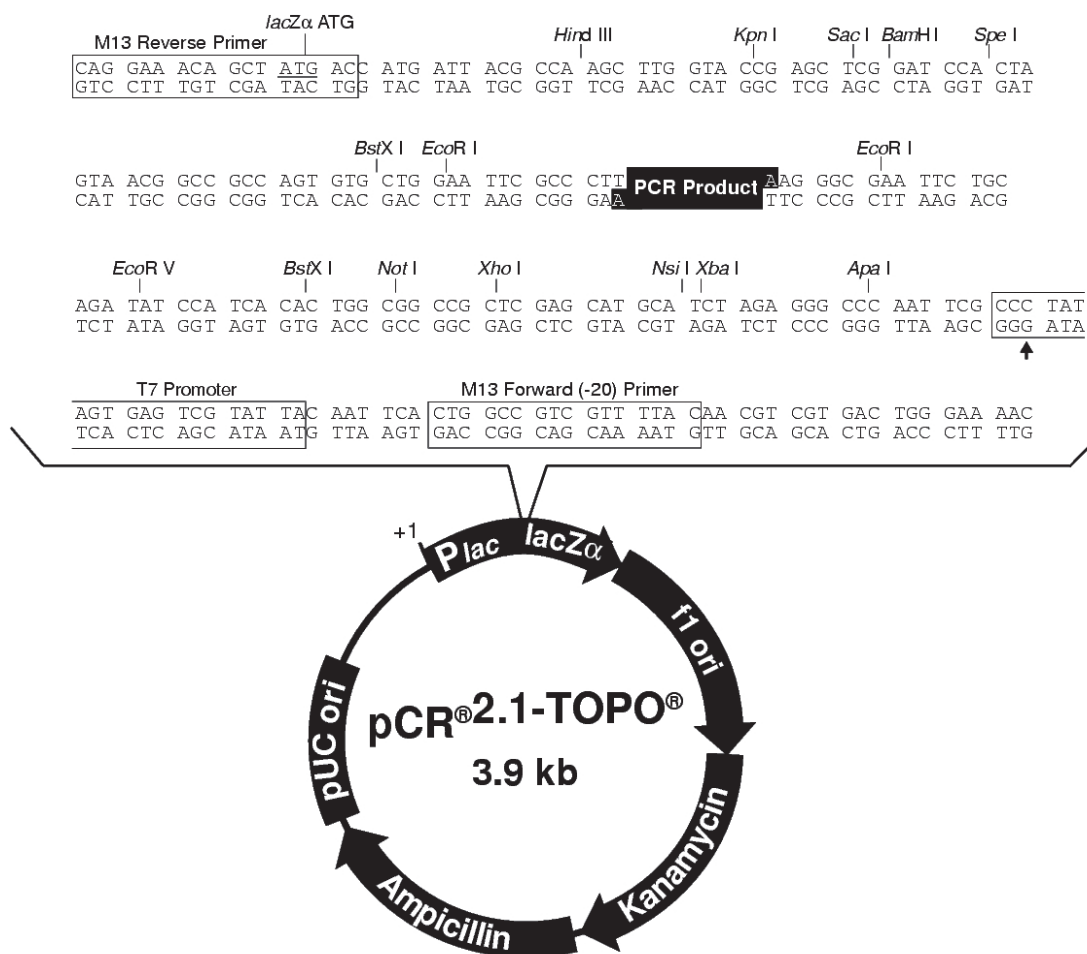


Abbildung 8.2: Plasmidkarte des pCR[®]2.1-TOPO[®]-Vektor.

pCR[®]2.1-TOPO[®]-Vektor (3.9 kb) des TOPO[®] TA Cloning Kits (Invitrogen). Vektor und Sequenz sind der Homepage www.invitrogen.com entnommen.

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich diese Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Die Dissertation wurde in vorgelegter oder ähnlicher Form bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, 13. Mai 2011

(Vera Okpanyi)

LEBENS LAUF

PERSÖNLICHE DATEN

Name Vera Ozioma Okpanyi
Geburtsdatum/-ort 19. April 1981 in Wiesbaden

BERUFSTÄTIGKEIT

Seit 01/2010 Klinik für Kinder-Onkologie, -Hämatologie und Klinische Immunologie, Universitätsklinikum Düsseldorf, Prof. Dr. med. A. Borkhardt

PROMOTION

22. Juni 2011 Promotion zum *Dr. rer. nat.* ('magna cum laude') an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

04/2007 – 12/2009 Klinik für Kinder-Onkologie, -Hämatologie und Klinische Immunologie, Universitätsklinikum Düsseldorf, Prof. Dr. med. D. Schneider

HOCHSCHULBILDUNG

26. Juli 2006 Abschluss: Diplom-Biologie ('sehr gut')

10/2005 – 07/2006 Diplomarbeit am Institut für Humangenetik, Universitätsklinikum Mainz, Prof. Dr. med. Thomas Haaf

07/2005 – 09/2005 Diplom-Hauptprüfung in Zoologie, Genetik und Immunologie

09/2003 Diplom-Vorprüfung

10/2000 – 07/2006 Johannes-Gutenberg-Universität Mainz, Studium der Biologie

SCHULBILDUNG

Juni 2000 Abitur am Leibniz-Gymnasium in Wiesbaden

DANKSAGUNG

Am Ende möchte ich mich bei allen Menschen bedanken, die mich auf dem Weg der Entstehung und der Fertigstellung dieser Arbeit begleitet und unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt:

Prof. Dr. Dominik Schneider für die Bereitstellung des spannenden Themas sowie des wissenschaftlichen Freiraums, seine Hilfsbereitschaft zu jeder Zeit, seine zahlreichen konstruktiven Ratschläge und Anregungen und die kritische Durchsicht dieser Arbeit.

Prof. Dr. Rolf Wagner für die kurzfristige, fakultätsübergreifende Übernahme des zweiten Gutachtens.

Prof. Dr. Arndt Borkhardt für seine Unterstützung sowie die Möglichkeit, die Arbeit in den Laborräumen des KMT-Labors der Klinik für Kinder-Onkologie, -Hämatologie und Klinische Immunologie des Heinrich-Heine-Universitätsklinikums durchzuführen.

Dr. Stefan Schönberger für die umfassende Betreuung vor Ort, die interessanten Diskussionen und seine stetige Begeisterung für das Projekt.

Prof. Dr. Nikolas Stöcklein, seinem Team des Chirurgischen Forschungslabors sowie Christa Mähler für ihre Unterstützung bei der Immunhistochemie.

Kati Alemzkour für eine ausgezeichnete Zusammenarbeit und ihren reichen Wissensschatz, der mich so viel gelehrt hat.

Conny Wiek und Sarah Wildenhain für ihre Freundschaft und die gemeinsame Zeit der letzten Jahre.

Allen anderen lieben, namentlich nicht genannten, Kollegen für unzählige schöne Momente im Labor und in der neuen Stadt, eine sehr gute Arbeitsatmosphäre und ihre Unterstützung bei Problemen jeglicher Art.

Sebastian für einen wunderbaren, geduldigen Beistand in vielen Jahren.

Olaf für den unerschütterlichen Glauben an mich und seine Begleitung durch die Höhen und Tiefen der vergangenen Jahre.

Meinen Eltern und meiner Schwester für ihre stete Motivation und die liebevolle Unterstützung in jeder erdenklichen Hinsicht – ohne Euch würde es diese Arbeit nicht geben.