



Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel an  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

aus dem Institut für Pathologie (Direktor Prof. Dr. C. Röcken),  
Sektion für Kinderpathologie (Leiter Prof. Dr. I. Leuschner)  
Betreuer: Prof. Dr. med. I. Leuschner

Inauguraldissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde  
der Medizinischen Fakultät der Christian- Albrechts-Universität zu Kiel

# **DIFFERENZIERUNG DER KOMPONENTEN DES WILMS - TUMOR IM KINDER- UND JUGENDALTER VON DEN KOMPONENTEN DER NEPHROBLASTOMATOSE**

vorgelegt von  
**STEPHANIE KAMKE, geb. Borchert**  
aus **Stendal**  
Kiel **2012**

Referent:	Prof. Dr. med. I. Leuschner
Koreferent:	Priv.-Doz. Dr. C. M. Naumann
Tag der mündlichen Prüfung:	22.05.2014
Zum Druck genehmigt, Kiel den	22.05.2014

# Inhalt

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>4</b>
2.1	PATIENTEN.....	4
2.2	MOLEKULARGENETISCHE DATEN.....	4
2.3	TUMORGEWEBE.....	5
2.4	HISTOPATHOLOGISCHE KLASSIFIKATION.....	5
2.5	IMMUNHISTOCHEMIE.....	8
2.5.1	<i>Antikörper.....</i>	<i>8</i>
2.5.1.1	Antikörper gegen $\beta$ -Catenin.....	8
2.5.1.2	Antikörper gegen APC.....	9
2.5.1.3	Antikörper gegen Axin 2.....	9
2.5.1.4	Antikörper gegen Mitf 2.....	9
2.5.1.5	Kontrollfärbungen.....	10
2.5.2	<i>Färbemethoden.....</i>	<i>10</i>
2.5.2.1	Grundlagen der ABC-Methode.....	10
2.5.2.2	Färbeprotokoll.....	11
2.6	AUSWERTUNG DER FÄRBUNGEN.....	13
2.6.1	<i>Methoden und Ziele der Auswertung .....</i>	<i>13</i>
2.6.2	<i>Auswertung der Färbungen.....</i>	<i>14</i>
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>15</b>
3.1	AUSWERTUNG DES VORKOMMENS DER EINZELNEN KOMPONENTEN.....	15
3.2	AUSWERTUNG DER B-CATENIN FÄRBUNGEN.....	16
3.3	AUSWERTUNG DER APC FÄRBUNGEN.....	18
3.4	AUSWERTUNG DER AXIN 2 FÄRBUNGEN.....	19
3.5	AUSWERTUNG DER MITF 2 FÄRBUNGEN.....	20
3.6	VERGLEICH DER IMMUNHISTOCHEMISCHEN FÄRBUNGEN MIT UND OHNE B-CATENIN MUTATION .....	21
3.6.1	<i><math>\beta</math>-Catenin-Expression .....</i>	<i>21</i>
3.6.2	<i>Axin-2 Expression.....</i>	<i>21</i>
3.6.3	<i>APC und MITF-2 Expression.....</i>	<i>21</i>
3.7	TOPOGRAPHIE DER B-CATENIN-, APC- UND MITF 2-EXPRESSION IM VERGLEICH BEI ZYTOPLASMATISCHER EXPRESSION VON AXIN 2 .....	22
3.8	EXPRESSIONSMUSTER IM VERGLEICH ZWISCHEN TUMORGEWEBE UND NEPHROBLASTOMATOSE.....	23
3.8.1	<i><math>\beta</math>-Catenin-Expression.....</i>	<i>23</i>
3.8.2	<i>APC-Expression.....</i>	<i>24</i>
3.8.3	<i>Axin-2 Expression.....</i>	<i>25</i>
<b>4</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>26</b>
4.1	BEDEUTUNG DES WNT-SIGNALWEGS IN WILMS-TUMOREN.....	26
4.2	UNTERSUCHUNGEN ZUR B-CATENIN-EXPRESSION.....	27
4.3	ERGEBNISSE DER EXPRESSION VON APC.....	29
4.4	ERGEBNISSE DER EXPRESSION VON AXIN 2.....	32
4.5	ERGEBNISSE DER EXPRESSION VON MITF 2.....	35

4.6 RESUMÉ DER IMMUNHISTOCHEMISCHEN ERGEBNISSE IM ZUSAMMENHANG.....	37
<b>5 AUSBLICK.....</b>	<b>39</b>
<b>6 ZUSAMMENFASSUNG UND SCHLUSSFOLGERUNGEN.....</b>	<b>39</b>
<b>7 LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>41</b>
<b>8 DANKSAGUNGEN.....</b>	<b>50</b>
<b>9 LEBENSLAUF.....</b>	<b>52</b>
<b>10 ERKLÄRUNG.....</b>	<b>54</b>

## Verzeichnis der Abbildungen

Abbildung 1: Lokalität der Beta-Catenin-Färbungen im Tumorblastem.....	16
Abbildung 2: Lokalität der Beta-Catenin-Färbungen im Tumorepithel.....	16
Abbildung 3: Lokalität der Beta-Catenin-Färbungen im Tumorstroma.....	16
Abbildung 4: Lokalität der Beta-Catenin-Färbungen im Nephroblastomasepithel.	17
Abbildung 5: Lokalität der Beta-Catenin-Färbungen im Nephroblastomaseblastem	17
Abbildung 6: Lokalität der Beta-Catenin-Färbungen im Nephroblastomasestroma.	17
Abbildung 7: Tumore mit Beta-Catenin-Mutation.....	20
Abbildung 8: Tumore ohne Beta-Catenin-Mutation.....	20
Abbildung 9: Off- und On-State des Wnt-Signalweges [Kikuchi, 1999].....	25
Abbildung 10: Axin im Wnt-Signalweg [Kikuchi, 1999].....	32

## Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 1: Übersicht der Antikörpereigenschaften.....	10
Tabelle 2: Erläuterung für die Auswertung der Färbungen.....	14
Tabelle 3: Häufigkeiten der einzelnen Komponenten.....	15
Tabelle 4: Häufigkeiten der einzelnen Komponenten in der Nephroblastomase.....	15
Tabelle 5: Auswertung der Beta-Catenin-Färbungen im Tumorgewebe.....	16
Tabelle 6: Auswertung der Beta-Catenin-Färbungen in der Nephroblastomase.....	17
Tabelle 7: Auswertung der APC-Färbungen im Tumorgewebe.....	18
Tabelle 8: Auswertung der APC-Färbungen in der Nephroblastomase.....	18
Tabelle 9: Auswertung der Axin 2-Färbungen im Tumorgewebe.....	19
Tabelle 10: Auswertung der Axin 2-Färbungen in der Nephroblastomase.....	19
Tabelle 11: Auswertung der Mitf 2-Färbungen im Tumorgewebe.....	20
Tabelle 12: Auswertung der Mitf 2-Färbungen in der Nephroblastomase.....	20
Tabelle 13: Lokalisationen von Beta-Catenin und APC bei zytoplasmatischer Axin-2 Expression im Tumorepithel.....	22
Tabelle 14: Lokalisationen von Beta-Catenin und APC bei zytoplasmatischer Axin-2 Expression im Tumorblastem.....	22
Tabelle 15: Lokalisationen von Beta-Catenin und APC bei zytoplasmatischer Axin-2 Expression in den Stromazellen des Tumors.....	22
Tabelle 16: Vergleich der Expressionslokalisationen im Tumorepithel mit den epithelialen Anteilen der Nephroblastomase für Beta-Catenin.....	23
Tabelle 17: Vergleich der Expressionslokalitäten im Tumorblastem mit den Blastemanteilen der Nephroblastomase für Beta-Catenin.....	23
Tabelle 18: Vergleich der Expressionslokalisationen im Tumorepithel mit den Epithelkomponenten Nephroblastomase für APC.....	24
Tabelle 19: Vergleich der Expressionslokalisationen im Tumorblastem mit den Blastemanteilen der Nephroblastomase für APC.....	24
Tabelle 20: Vergleich der Expressionslokalisationen im Tumorepithel mit den epithelialen Anteilen der Nephroblastomase für Axin 2.....	25
Tabelle 21: Vergleich der Expressionslokalisationen im Tumorblastem mit den Blastemanteilen der Nephroblastomase für Axin 2.....	25

## Verzeichnis der Abkürzungen

<i>Abkürzung</i>	<i>Erklärung</i>
APC	Adenomatous polyposis coli - Gen
Mitf	Microphthalmia-associated transcription factor
GSK	Glycogen Synthase Kinase
Dsh	Dishevelled
Tcf	T-cell-specific transkription factor
Lef	Lymphoid enhancer-binding factor

## **1 Einleitung**

Das Nephroblastom, auch Wilms-Tumor genannt, ist ein Nierentumor des Kindes- und Jugendalters. Er gehört mit einer Inzidenz von 1 pro 10.000 lebend geborenen Kindern pro Jahr zu den häufigsten Kindertumoren [Lonergan et al. 1998] und macht 84% aller kindlichen Nierentumoren aus [Cullinane et al. 2003]. Der Häufigkeitsgipfel für Neuerkrankungen liegt zwischen dem 2. und 3. Lebensjahr. Vor der Vollendung des 1. Lebensjahres und nach dem 5. Lebensjahr ist ein Auftreten eher selten. Meist kommen Nephroblastome unilateral vor. Bilaterale Wilms-Tumore, die rund 5% der Patienten ausmachen, sind gehäuft familiär bedingt [Böcker et al. 2004].

Das Nephroblastom gehört zusammen mit anderen typischen Tumoren des Kindesalters, wie dem Neuro-, Retino-, Medullo-, dem Rhabdomyo- und dem Hepatoblastom, in die Gruppe der sogenannten embryonalen Tumore, die von stark proliferierenden Zellen ausgehen, welche dem Blastem des jeweiligen Organs ähneln [Böcker et al. 2004].

Der Wilms-Tumor entsteht aus embryonalen nephrogenen Rudimenten und kann morphologisch sehr variabel sein. Makroskopisch kann der Tumor ein Gewicht von bis zu 500g erreichen und so klinisch als indolente, palpable Schwellung im Oberbauch auftreten [Massalme, 2004], [Lonergan et al. 1998], [Thomas et al. 1996]. Meist ist die Schnittfläche grau oder weiß beschaffen [Thomas, 1993]. Mikroskopisch lassen sich die drei Hauptkomponenten Blastem, Stroma und Epithel unterscheiden.

Aufgrund dieser Morphologie unterteilt man das Nephroblastom in Subtypen: unterschieden werden der blastemreiche, der stromareiche, der epitheliale und der Mischtyp sowie die Nephroblastome mit fokaler oder diffuser Anaplasie. Weiterhin existieren ein zystisch partiell differenziertes Nephroblastom und ein regressiver Typ. Nach präoperativer Chemotherapie gibt es weitere Subtypen der Nephroblastome: hier wird zusätzlich zu den oben genannten Typen noch der komplett nekrotische Typ unterschieden [SIOP, 2001/ GPOH]. Diese Unterteilung erlaubt eine Einteilung in Risikogruppen, die unterschiedliche Therapien bedingen. Die Prognose der Patienten ist trotz Risikostratifizierung nach wie vor variabel, so dass die Identi-

fizierung weiterer Risikofaktoren für eine bessere sogenannte Risiko-adaptierte Therapie notwendig ist.

Vom Nephroblastom mit seinen verschiedenen Differenzierungsformen muss die Nephroblastomatose abgegrenzt werden. Hierbei handelt es sich um nephrogene embryonale Reste, die als Ausgangspunkt für Wilms-Tumore gesehen werden. Man unterscheidet intralobuläre von perilobulären Formen, welche sich durch Form und Lokalisation im Nierenlobulus unterscheiden. [Cullinane et al. 2003].

Zu beachten ist, dass sich die Nephroblastomatose vom eigentlichen Tumor durch ihre Dignität und damit verbunden auch durch ihre Therapie unterscheidet. Bisher ist es allerdings teilweise noch schwierig zwischen dem tumorförmigen nephrogenen Rest, also der Nephroblastomatose, [Hennigar et al. 2001] und einem Wilms-Tumor mit Nephroblastomatose zu unterscheiden. Beim Ersteren könnte auf eine Chemotherapie verzichtet werden, wobei diese im zweiten Fall neben der chirurgischen Entfernung zusätzlich von Nöten ist.

Bei der Entstehung des Wilms-Tumors spielt der Wnt- Signalweg, der bereits die embryonale Entwicklung beeinflusst, eine wichtige Rolle. Das Onkoprotein  $\beta$ -Catenin ist als zytosmatische Komponente des Wnt- Transduktionsweges das wichtigste Bindeglied bei der Transmission der Signale bis in den Zellkern und dem damit verbundenen Eingriff in die Transkription [Seidensticker und Behrens, 2000]. Das bedeutet, dass  $\beta$ -Catenin einem Gleichgewicht zwischen inaktiven und aktiven Phasen unterliegen muss [Sun, 2009], um das richtige Maß für die Bildung von Transkriptionsfaktoren im Zellkern herzustellen. Wenn  $\beta$ -Catenin aktiviert wird, kann es den Zellzyklus von proliferationsfördernden Protoonkogenen fördern [Kawahara et al. 2000], [Hart et al. 1998]. Bei der Inaktivierung des  $\beta$ -Catenins kommt es zur Phosphorylierung bei Bindung an einen Komplex aus Axin 2, APC und GSK3 und dadurch zu einem Abbau in den Proteasomen der Zelle. Auch WTX gehört zu diesem Abbaukomplex. Nach der Inaktivierung kann  $\beta$ -Catenin die Signaltransduktion bis in den Zellkern nicht mehr ausführen.

In Tumoren ist  $\beta$ -Catenin dauerhaft aktiv, weil die Passivierung durch Mutationen im APC-Gen, WTX-Gen oder im  $\beta$ -Catenin-Gen selbst nicht erreicht wird. Dadurch kommt es zur ständigen Bildung der Protoonkogene, die zu Onkogenen werden und bei der Tumorentstehung mitwirken [Seidensticker und Behrens, 2000], [Major et al. 2007]. Die Mutationen von



$\beta$ -Catenin und APC sind relevant bei der Entstehung von Desmoid-Tumoren, denn nahezu alle tiefen Fibromatosen haben eine Anreicherung von  $\beta$ -Catenin im Zytoplasma und können so von anderen Fibromatosen differenziert werden [Bhattacharya et al. 2005]. Weiterhin spielen diese Mutationen eine wichtige Rolle bei kolorektalen Karzinomen [Behrens und Lustig, 2004] und Lebertumoren [Monga, 2009]. In der Literatur lassen sich weitere Hinweise finden, das  $\beta$ -Catenin als Onkogen mit vielen Tumoren assoziiert ist [Barker und Clevers, 2000]. Die Expression von  $\beta$ -Catenin in Nephroblastomen zeigt wiederum, dass es auch während der embryonalen Entwicklung zu Mutationen kommt, die die Tumorentstehung begünstigen [Kooeters et al. 1999].

In dieser Arbeit geht es darum, mithilfe des Wnt-Signalweges und den Komponenten des  $\beta$ -Catenin-Komplexes eine Unterscheidung der Tumorkomponenten Blastem, Epithel und Stroma von der Nephroblastomatose zu erreichen. Dazu wurden immunhistochemischen Färbungen für  $\beta$ -Catenin, worauf das Hauptaugenmerk liegt, sowie APC, Axin 2 und Mitf 2 angefertigt. Anhand der Expression soll ein Muster erarbeitet werden, welches die Differenzierung bereits in der Diagnosephase ermöglicht. Dies könnte genutzt werden, um Patienten/innen mit einer reinen Nephroblastomatose die Chemotherapie zu ersparen und dadurch die Therapie zu optimieren. Versucht werden soll auch, ob man anhand des erarbeitenden Musters Rückschlüsse auf die Prognose ziehen kann.

Genaue Fragestellungen dieser Arbeit sind:

1. Gibt es Unterschiede in der Akkumulation von  $\beta$ -Catenin zwischen den Anteilen des eigentlichen Wilms-Tumors und denen der Nephroblastomatose?
2. Welche Rolle spielen Mutationen und die dadurch bestimmte Expressierung von Axin 2, Mitf 2 und APC für das  $\beta$ -Catenin-Anfärbemuster?
3. Lässt sich anhand dieser Daten eine Grundlage für die Diagnostik und damit verbunden auch für die Therapie erarbeiten?
4. Lassen sich mit dem Muster der  $\beta$ -Catenin-Anfärbung Rückschlüsse auf die individuelle Prognose ziehen?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Patienten

Es wurden Nephroblastome von Patienten/innen aus den Geburtsjahrgängen 1990 bis 2005 untersucht. Das Material entstammt dem Kindertumorregister der deutschen Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie (GPOH) und wurde im Rahmen der SIOP-Studie mit einer Chemotherapie und Resektion behandelt [SIOP, 2001/ GPOH]. Die untersuchten Nephroblastome wurden in den Jahren 1995 bis 2006 diagnostiziert.

Betrachtet wurden die Daten von 17 weiblichen und 22 männlichen Patienten, wobei bei 17 der Tumoren eine Nephroblastomatose vorlag. Das Kollektiv wurde über einen Nachweis einer WTX-Mutation ausgewählt, die bei einem Teil von Nephroblastomen nachweisbar ist. Die Mutation wurde zuvor im Institut für Biochemie der Universität Würzburg (Prof. Dr. M. Gessler) bestimmt.

Eingeteilt wurden die Patienten nach den SIOP-Stadien. Inbegriffen in die Arbeit sind 21 Patienten mit SIOP-Stadium I, 7 Patienten mit Stadium II und 3 Patienten im Stadium III. Bei 8 Fällen konnte das Stadium nicht bestimmt werden, da zu wenig Material vorhanden war. Die Patienten wurden weiterhin in die Risikogruppen nach der Therapieoptimierungsstudie SIOP, 2001 eingeordnet. Somit wurden 3 Patienten aus der High Risk-Gruppe (hohe Malignität), 34 Fälle aus der Intermediate Risk-Gruppe und keiner aus der Low Risk-Gruppe (niedrige Malignität) untersucht. Bei 2 Tumoren wurde keine Risikogruppe angegeben.

Die untersuchten 39 Fällen lassen sich aufgrund der Komponenten folgendermaßen aufteilen: 2 Nephroblastome vom blastemreichen Typ, 2 Tumore vom epithelialen Typ, 5 Nephroblastome vom stromareichen Typ, 12 Mischtypen, 5 Fälle mit Anaplasie, 12 Wilms-Tumore vom regressiven Typ und 1 komplett nekrotischer Wilms-Tumor.

### 2.2 Molekulargenetische Daten

Molekulargenetische Daten erhielten wir von Prof. Dr. M. Gessler aus Würzburg im Rahmen der SIOP-Studie. Alle Tumore weisen eine Mutation im WTX-Gen auf, die vorher in Würzburg nachgewiesen wurde. Zusätzlich wurde bei 5 Fällen auch eine Mutation im  $\beta$ -Catenin Gen entdeckt. Es handelte sich zweimal um eine Ser45Phe-Mutation und in den anderen

drei Fällen lag eine Deletion Ser45 vor. Die Präparate waren in 2 Fällen vom stromareichen Typ und die anderen 3 Fälle waren vom Mischtyp.

### 2.3 Tumorgewebe

Die Resektionspräparate der Tumore wurden mit Formalin fixiert und in Paraffin gebettet. Die so entstandenen Paraffinblöcke wurden mit dem Rotationsmikrotom (Leica RM 2145, Wetzlar) in 2-3µm dicke Schnitte gebracht. Aufgezogen auf SuperFrost®Plus-Objektträger (Fa. Menzel-Gläser) wurden sie mindestens eine Stunde bei 60°C getrocknet.

Danach wurde ein Schnitt von jedem Patienten mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt. Anhand dieser Präparate wurden die histologischen Merkmale, die bereits bei der Erstdiagnose in die SIOP-Auswertungsmerkblätter eingetragen wurde, nachvollzogen. Das war hilfreich, um die Komponenten des Tumors in den Antikörperfärbungen wieder zu erkennen. Anschließend wurde für jeden Patienten je eine Färbung mit dem entsprechenden Antikörper gegen  $\beta$ -Catenin, Axin 2, Mitf 2 und APC angefertigt und ausgewertet.

### 2.4 Histopathologische Klassifikation

Die Stadieneinteilung und histologische Klassifikation erfolgt nach der Einteilung der SIOP/GPOH, 2001-Studie.

Es werden makroskopisch fünf Stadien (I-V) angegebenen:

Stadium I:

- a) „Der Tumor ist auf die Niere begrenzt oder der Tumor wölbt die normale Nierenkontur vor, ist aber von einer fibrösen Pseudokapsel umgeben. Die Nierenkapsel bzw. Pseudokapsel kann durch Tumorzellen infiltriert sein, jedoch zeigt sich keine Einbruch in das extrakapsuläre Gewebe. Der Tumor muss vollständig reseziert sein.
- b) Der Tumor kann sich in das Nierenbecken vorwölben und hierbei das bedeckende Urothel zerstören. [...]
- c) Die Gefäße des Nierensinus sind tumorfrei. Intrarenale/intratumorale Tumorgefäßinfiltrationen können vorhanden sein.“

Stadium II:

- a) „Der (vitale) Tumor wächst außerhalb der Niere oder penetriert durch die Pseudokapsel bzw. Nierenkapsel in das angrenzende Gewebe, wurde aber komplett reseziert mit tumorfreien Absetzungsrändern.
- b) Der (vitale) Tumor infiltriert den Nierensinus und /oder Blut- bzw. Lymphgefäße außerhalb des Nierenparenchyms, wurde aber komplett reseziert mit tumorfreien Absetzungsrändern.
- c) Der Tumor infiltriert benachbarte Organe oder die V. cava, aber er ist komplett mit freien Absetzungsrändern reseziert.“

Stadium III:

- a) „Inkomplette Resektion eines Tumors, der sich über die Resektatgrenzen hinaus ausdehnt [...].
- b) Lymphknotenmetastasen in allen abdomino-pelvinen Lokalisationen.
- c) Pre- oder intraoperative Tumorrupturn, fokal und diffus [...].
- d) Der Tumor wächst infiltrierend bis an die Peritonealoberfläche.
- e) Tumorthromben/-ausläufer sind an den Resektionsrändern der Gefäße bzw. des Ureters nachweisbar. Hierzu zählen auch in Teilstücken resezierte Tumoranteile im Bereich der Resektionslinie, die topographisch nicht sicher zugeordnet werden können.
- f) Offene Biopsie vor Therapiebeginn“

Stadium IV:

- a) „Hämatogene Metastasen (Lunge, Leber, Knochen, Gehirn etc.) oder Lymphknotenmetastasen außerhalb der abdomino-pelvinen-Region (ein lokales Tumorstadium des Nephrektomiepräparates muss immer angegeben werden).“

Stadium V:

- a) „Bilaterale Tumoren zum Zeitpunkt der Diagnose (ein lokales Tumorstadium muss immer für jeden Tumor angegeben werden).“

[SIOP, 2001/ GPOH]

Mikroskopisch unterscheidet man drei Hauptkomponenten - Blastem, Epithel sowie Stroma - . Dabei können auch zusätzlich Einblutungen und Nekrosen auftreten, die nicht zu den vitalen Anteilen des Nephroblastoms zählen, sondern therapiebedingt entstehen. Das Blastem im Wilms-Tumor ist eine frühembryogene, verdichtete Mesenchymanlage, aus der sich je nach Reifungsgrad des Tumors, Epithel in Form von Trabekeln und Tubuli oder Stroma mit allen weiteren Differenzierungsmöglichkeiten entwickeln können [Cullinane et al. 2003]. Aufgrund der histologischen Komponenten unterteilt man die Wilms-Tumore in der SIOP/GPOH, 2001-Studie in Risikogruppen (Malignitätsgrad) vor und nach Chemotherapie.

Die Nephroblastome nach präoperativer Chemotherapie, die den größten Anteil der in dieser Arbeit verwendeten Fälle ausmacht, werden nach SIOP/GPOH, 2001 wie folgt eingeteilt:

- I. „Low Risk“ - Gruppe (niedrige Malignität)
  - [...] Zystisch, partiell differenziertes Nephroblastom
  - Komplettnekrotisches Nephroblastom
- II. „Intermediate Risk“ - Gruppe (Standardrisiko)
  - Nephroblastom - epithelialer Typ
  - Nephroblastom - stromareicher Typ
  - Nephroblastom - Mischtyp
  - Nephroblastom - regressiver Typ
  - Nephroblastom mit fokaler Anaplasie
- III. „High Risk“ - Gruppe (hohe Malignität)
  - Nephroblastom - blastemreicher Typ
  - Nephroblastom mit diffuser Anaplasie [...]

[SIOP, 2001/ GPOH]

Die Einteilung der primär resezierten Wilms-Tumore unterscheidet sich nur in zwei Punkten von der Unterteilung nach präoperativer Chemotherapie. Erstens gehört hier der blastemreiche Typ in die Intermediate Risk-Gruppe und nicht in die High Risk-Gruppe. Zweitens wird das komplett nekrotische Nephroblastom nicht mit in die Klassifikation aufgenommen, da dieses nur durch vorherige Chemotherapie entstehen kann [SIOP, 2001/ GPOH].

Neben dem eigentlichen Tumorgewebe des Wilms-Tumor lässt sich mikroskopisch auch noch die Nephroblastomatose abgrenzen. Hierbei handelt es sich um nephrogene Reste, wel-

che Ansammlungen von rudimentären embryonalen Zellen sind, die entarten können. Es lassen sich die perilobuläre und die intralobuläre Form unterscheiden [Cullinane et al. 2003].

Die intralobuläre Nephroblastomatose kann überall im Nierenlobulus vorkommen und entsteht früh in der embryonalen Entwicklung. Sie ist meist reich an Stroma. Selten kommen auch epitheliale Strukturen, die sich auch zu glomeruloiden Körpern differenzieren können, vor und oft infiltrierend ins gesunde Nierengewebe oder die renalen Sinus wachsen. Meistens gibt es nur eine oder sehr wenige solcher Nephroblastomatosen in einem Lobulus. Oft tritt sie bei vorhandener WT1-Mutation auf [Beckwith, 1998], [Lonergan et al. 1998].

Für die perilobuläre Form der Nephroblastomatose ist ein Vorkommen in der Peripherie des Nierenlobulus kennzeichnend. Sie entwickelt sich embryonal gesehen später, als die intralobuläre Form. Häufig kommt sie multiple vor und besteht vor allem aus blastemartigen Zellen und epithelialen Strukturen, welche gut abgrenzbar zur gesunden Niere sind. Als epitheliale Differenzierung können auch glomeruloide Strukturen auftreten. Perilobuläre Nephroblastomatosen treten gerne im Rahmen von Syndromen, zum Beispiel dem Wiedemann-Beckwith-Syndrom oder der Trisomie 18, auf [Beckwith, 1998], [Lonergan et al. 1998].

## **2.5 Immunhistochemie**

### *2.5.1 Antikörper*

#### **2.5.1.1 Antikörper gegen $\beta$ -Catenin**

Der Anti- $\beta$ -Catenin-Antikörper ist ein monoklonaler Antikörper aus der Maus und reagiert sowohl mit menschlichem  $\beta$ -Catenin als auch dem der Maus und des Huhns. Er richtet sich gegen das Onkoprotein, welches als Transkriptionsfaktor für die Aktivierung von Protoonkogenen, wie z.B.: c-myc oder cyclin D1 fungiert [Barker und Clevers, 2000], [Kikuchi, 1999], die beim Tumorwachstum eine Rolle spielen [Fu et al. 2008].

In gesunden Zellen wird  $\beta$ -Catenin an der Zellmembran oder im Zytoplasma exprimiert. In Tumoren kann es mutiert sein, so dass es daueraktiv ist und im Zellkern akkumuliert [Fukuza-wa et al. 2004], [Sun, 2009].

#### 2.5.1.2 Antikörper gegen APC

Der monoklonale Antikörper gegen APC entstammt der Maus und interagiert mit APC des Menschen, der Ratte und der Maus selber. APC ist ein Tumorsuppressorgen [Gumbiner, 1997], welches einen Komplex mit  $\beta$ -Catenin bildet und dieses runter reguliert [Bienz und Hamada, 2004]. Bei Funktionsverlust des APC-Gens ist  $\beta$ -Catenin dauerhaft aktiviert und fördert die Entstehung von Tumoren. In diesen Fällen akkumuliert APC im Zytoplasma [Fu et al. 2008].

#### 2.5.1.3 Antikörper gegen Axin 2

Der polyklonale Anti-Axin 2-Antikörper wurde im Kaninchen gewonnen. Der Antikörper geht eine Reaktion mit dem Axin des Menschen, der Maus, der Ratte sowie dem Huhn ein. Axin 2 ist wie  $\beta$ -Catenin und APC ein Protein des Wnt-Signalweges und fungiert ebenfalls als Inaktivator von  $\beta$ -Catenin im Komplex aus APC, GSK 3 und Axin 2 [Kadoya et al. 2000].

#### 2.5.1.4 Antikörper gegen Mitf 2

Der Antikörper gegen Mitf 2, dem 'microphthalmia-associated transcription factor' 2, ist ein monoklonales Maus-Immunglobulin [Yasumoto et al. 2002]. Mitf 2 ist ein Transkriptionsfaktor, welcher eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung von Melanozyten und der Expression verschiedener Gene, u.a dem  $\beta$ -Catenin-Gen, spielt. Im Zellkern greift Mitf 2 in den Wnt-Signalweg ein, indem es  $\beta$ -Catenin als Co-Aktivator für die Initiierung von weiteren Transkriptionsfaktoren nutzt [Schepsky et al. 2006]. Mitf 2 ist ein nukleäres Protein und wird in der normalen Niere nicht exprimiert.

Antikörper	mono-/ polyklonal	Klon	Verdünnung	Detektion	Beschreibung	Firma
β-Catenin	m	CAT-5H10	1:300	ABC	18-0226	Zytomed Laboratories; San Francisco, USA
Axin 2	p		1:100	ABC	ab32197	Abcam plc; Cambridge, UK
APC	m	CC-1	1:10	ABC	ab16794	Abcam plc; Cambridge, UK
Mitf 2	m	D5	1:200	ABC	M3621	DAKO; Carpinteria, USA

**Tabelle 1: Übersicht der Antikörpereigenschaften**

### 2.5.1.5 Kontrollfärbungen

Bei jedem Färbevorgang wurde je eine Positiv- und eine Negativkontrolle unter den selben Bedingungen mitgefärbt. Mit der Positivkontrolle konnte sichergestellt werden, dass der Tumor mit dem Antikörper reagiert und somit der braune Farbstoff, der das Reaktionsprodukt der verwendeten ABC-Methode ist, sichtbar wird. Durch die Negativkontrolle ohne Hinzugabe der Antikörper kann eine Hintergrundreaktion bzw. unspezifische Anfärbbarkeit ausgeschlossen werden. Als Kontrollen wurden für β-Catenin ein Plattenepithel, für APC der Nervus opticus, für Axin 2 das Hepatoblastom und für Mitf 2 Melanomgewebe verwendet.

## 2.5.2 Färbemethoden

### 2.5.2.1 Grundlagen der ABC-Methode

Die ABC-Methode, auch Avidin-Biotin-Complex genannt, beruht auf der hohen Bindungsaffinität von Avidin (aus Hühnerei) oder Streptavidin (aus *Streptomyces avidinii*) zu dem Vitamin Biotin. Grundlage ist ein primärer Antikörper gegen das darzustellende Antigen. Gegen dieses Primär-Immunglobulin ist der Biotin-gekoppelte Sekundär-Antikörper gerichtet.

Im nächsten Schritt bindet ein Avidinmolekül, welches vier Bindungsstellen für Biotin hat, aus dem Peroxidase-Avidin-Biotin-Komplex an den biotinylierten sekundären Antikörper. In dem Komplex werden Avidin und Biotin durch das Enzym Peroxidase irreversible aneinander gekoppelt.



Als Letztes wird durch Hinzugeben eines geeigneten chromogenen Substrates das Enzym Peroxidase visualisiert. Somit wird indirekt auch das gefragte Antigen sichtbar gemacht [Hsu et al. 1981],[Bratthauer, 2010], [Internet 1].

#### 2.5.2.2 Färbeprotokoll

Das Färbeprotokoll für die ABC-Methode gilt für alle Antikörper dieser Arbeit:  $\beta$ -Catenin, Axin 2, APC und MITF 2.

Damit die immunhistochemischen Färbungen gemacht werden können, müssen die Schnitte zuerst vom Paraffin befreit werden (Schritte 1 bis 4), um dann eine Antigen- Hitzedemasierung durchzuführen (Schritte 5 und 6). Als nächstes folgen eine Spülung mit destilliertem Wasser (7.), eine aufsteigende Alkoholreihe (8.) und ein Methanolbad (9.). Dies wird durchgeführt, um die endogene Peroxidase zu blocken und dadurch unspezifische Hintergrundreaktionen zu vermeiden. Um die Vorbereitung der Präparate für die folgende Färbung zu beenden, sind noch eine weitere Behandlung mit einer absteigenden Alkoholreihe und eine Spülung im Waschpuffer (Schritte 10 und 11) notwendig.

Nun kann mit der eigentlichen immunhistochemischen Färbung nach der ABC-Methode begonnen werden. Dazu ist erst eine Inkubation in Normalserum nötig (12.), um unspezifische Proteinbindungen zu hemmen. Dann kommt der primäre Antikörper (13.) hinzu, der das humane Antigen binden soll. Diese Bindungsreaktion braucht rund 45 Minuten und wird durch Waschen mit einem Puffer beendet (14.). Um dann dem ABC-Prinzip gerecht zu werden, wird auf den ersten Antikörper nun der biotinylierte sekundäre Antikörper gegeben (15.). Die Reaktion braucht erneut 30 Minuten und wird durch den Einsatz eines Waschpuffers unterbrochen (16.). Zur Vorbereitung der Sichtbarmachung des Antigens durch ein chromogenes Substrat muss erst eine spezielle ABC-Reagenz, welche die Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplexe enthält, für 30 Minuten auf die Schnitte aufgebracht (Schritte 17 und 18) und dann abgewaschen (19.) werden. Zur Vervollständigung der Färbung wird nun das sichtbarmachende Substrat hinzugefügt (20.). Im Abschluss wird nochmals mit Aqua dest. (21.) gespült, um die Immunhistochemie mit einer Kerngegenfärbung (22.) zu vollenden. Als Letztes werden die Schnitte durch eine aufsteigende Alkoholreihe (Schritte 23 und 24) dehydriert und dann zur

Haltbarmachung eingedeckelt (25.). Hiermit sind die Färbungen nach dem Protokoll für die ABC-Methode vollständig abgeschlossen.

Der genaue Ablauf der Färbungen ist hier nochmals aufgelistet:

1. Schnitte in Objekträgerhalterung bei Raumtemperatur geben
2. Bearbeitung der Schnitte 2x mit Xylol für je 15min
3. Präparate für je 2min 3x in 100%igem , 3x in 96%igem und 1x in 70%igem Ethanol (absteigende Alkoholreihe) schwenken
4. fließendes Spülen der Schnitte mit destilliertem Wasser (Aqua dest.)
5. Schnitte in Dampfdrucktopf (Pascal S2801; Fa. DAKO, Carpinteria, USA) mit 1 l TEC-Kochpuffer (2,5g TRIS-Base, 5g EDTA [Titriplex III; Fa. Merck, Darmstadt], 3,2g Trinatriumcitratdihydrat [Fa. Merck, Darmstadt]; mit Citratpuffer {10,5g Zitronensäuremonohydrat [Fa. Merck], 500ml Aqua dest.} einstellen) bei pH 7,8 4min lang auf höchster Stufe erhitzen
6. Abkühlung bei Raumtemperatur
7. Spülen mit Aqua dest.
8. Präparate durch 70%igem und 96%igem Ethanol (aufsteigende Alkoholreihe) führen
9. Inkubation der Schnitte in 250ml 2%igem Methanol gemischt mit 5ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für 15min
10. Schnitte erneut mit absteigender Alkoholreihe und Aqua dest. behandeln
11. Spülung im TRIS-Waschpuffer (9g TRIS-Base, 68,5g TRIS-HCl, NaCl auf 10l Aqua dest.)
12. 15minütiges Inkubieren der Schnitte in verdünntem Normalserum (pro 1ml 15µl Normalserum mit je 4% Milchpulver lösen [Vectastain ABC Peroxidase Kit; Fa. Vector Laboratories, Burlingame, USA])
13. Behandeln der Präparate mit 150µl primären Antikörpern pro Schnitt, welche durch Waschpuffer mit 2% Milchpulver verdünnt sind
14. nach 45min 3x spülen mit Waschpuffer
15. Applikation des sekundären Antikörpers, und zwar je 1ml Lösung enthalten 5µl Antikörper in 2% Milchpulver
16. 3x spülen mit Waschpuffer nach 30min

17. ABC-Reagenz (je 1ml Lösung braucht man 10 $\mu$ l Reagenz in 2% Milchpulver) ansetzen
18. Inkubation der Schnitte in der ABC-Reagenz
19. nach 30min 3x mit Waschpuffer behandeln
20. Auftragen des Chromogen 3'3-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB Substrate Kit für Peroxidase; Fa. Vector Laboratories, Burlingame, USA) für 15min auf Präparate (je Schnitt 125 $\mu$ l Aqua dest., 2,5 $\mu$ l Puffer, 2,5 $\mu$ l DAB sowie 2,5 $\mu$ l Hydrogen-Peroxidase)
21. Spülung der Schnitte mit Aqua dest.
22. Kerngegenfärbung mit Hämalaun nach Mayer (Fa. Merck, Darmstadt)
23. mit Aqua dest. spülen
24. Behandlung mit 70%igem, 96%igem und 100%igem Ethanol (aufsteigender Alkoholreihe)
25. Eindeckelung mit Pertex (Fa. Medite, Burgdorf)

## 2.6 Auswertung der Färbungen

### 2.6.1 Methoden und Ziele der Auswertung

Hämatoxylin-Eosin-Färbungen der einzelnen Tumoren wurden im Rahmen dieser Arbeit nochmals mikroskopiert und komplett analysiert, um den Tumorgehalt und den histologischen Typ ein weiteres Mal zu bestimmen. Dabei repräsentieren die begutachteten Tumoranteile den Gesamttumor. Es wurde darauf geachtet, ob genug vitales Tumorgewebe zur Auswertung vorhanden ist. Weiterhin lag das Augenmerk auf den einzelnen Tumorkomponenten und deren Differenzierungsmöglichkeiten sowie auf dem zusätzlichen Vorkommen von Regression, Nekrose, Granulationsgewebe und Einblutungen, welches das Ansprechen auf die Chemotherapie widerspiegelt.

Im nächsten Schritt wurden die Färbungen für die Antikörper gegen  $\beta$ -Catenin, Axin 2, APC und Mitf 2 nach der ABC-Methode angefertigt. Danach wurden diese immunhistochemischen Färbungen lichtmikroskopisch ausgewertet. Hierbei wurde die Intensität der Färbung, deren Lokalisation in der Zelle und der Anteil der positiven Zellen in Prozent der Gesamttumorzellen der Komponente beurteilt. Präparate bzw. einzelne Komponenten, deren Färbung

zu schwach war, wurden als negativ gewertet. Genaue Angaben zur Intensität und den Abkürzungen sind in der folgenden Tabelle aufgeführt:

Element		Beschreibung
Intensität	-	Färbung negativ
	+	Färbung schwach positiv
	++	Färbung mäßig positiv
	+++	Färbung stark positiv
Lokalisation	ZM	Gesamte Zellmembran
	ZM-a	Apikale Zellmembran
	ZP	Zytoplasma
	ZK	Zellkern
	m	Myogene Zellen des Stromas
	BG	bindegewebsartige Zellen des Stromas
	PE	Plattenepithel (wenn keine weitere Angabe, dann sind Tubuli gemeint)
	G	Glomerula
x	Komponente im Tumor/Läsion nicht vorhanden	

**Tabelle 2: Erläuterung für die Auswertung der Färbungen**

### 2.6.2 Auswertung der Färbungen

Zunächst wurde untersucht, ob die einzelnen Komponenten (Epithel, Blastem und Stroma) sowie eine Nephroblastomatose in den Präparaten vorhanden waren. Im Anschluss daran wurde bei den einzelnen Fällen die Anzahl der positiven Zellen, sowie die Häufigkeit der Positivität je Lokalisation (ZM, ZP, ZK) der einzelnen Komponenten im Tumor und in der Nephroblastomatose dokumentiert und untereinander verglichen. Dies wurde erst für jede Antikörperfärbung individuell im Vergleich Tumor und Nephroblastomatose betrachtet. In einem weiteren Schritt konnten die gleichen Komponenten verschiedener Antikörperfärbungen hinsichtlich ihrer Positivität an den Expressionslokalisationen im Zusammenhang beurteilt werden.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Auswertung des Vorkommens der einzelnen Komponenten

In den 39 Präparaten wurde bei 43,6% der Fälle neben dem Tumorgewebe auch eine Nephroblastomatose gefunden. Eine genaue Verteilung der einzelnen Komponenten findet sich in Tabelle 3:

Tumor						Nephroblastomatose	
Epithel		Blastem		Stroma			
nein	15,4%	nein	23,1%	nein	5,1%	nein	56,4%
ja	84,6%	ja	76,9%	ja	94,9%	ja	43,6%

**Tabelle 3: Häufigkeiten der einzelnen Komponenten**

Von den 17 Fällen mit vorhandener Nephroblastomatose handelte es sich bei 11 Tumoren um eine intralobuläre und bei den restlichen 6 Präparaten um eine perilobuläre Nephroblastomatose.

In den Nephroblastomatosen ließen sich folgende Komponenten zeigen: Epithel, Blastem sowie Stroma. Die Häufigkeiten finden sich in Tabelle 4:

Nephroblastomatose					
Epithel		Blastem		Stroma	
nein	0,0%	nein	76,5%	nein	88,2%
ja	100,0%	ja	23,5%	ja	11,8%

**Tabelle 4: Häufigkeiten der einzelnen Komponenten in der Nephroblastomatose**

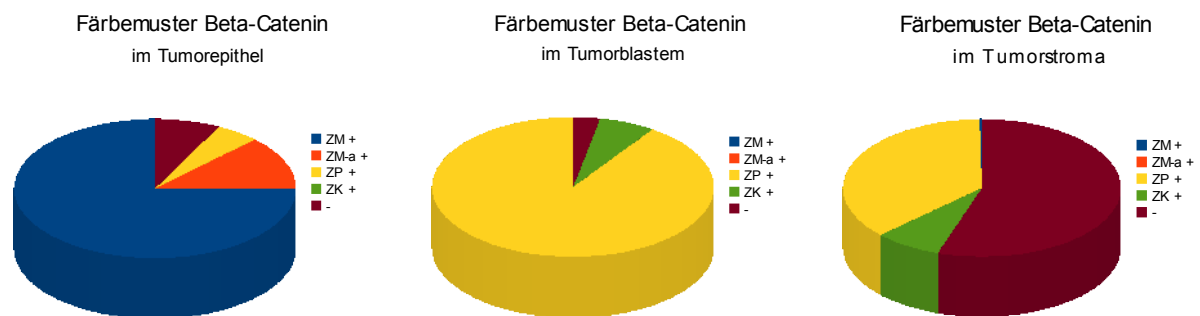
In den folgenden Auswertungen der einzelnen Antikörperfärbungen ergeben die Prozentangaben nicht immer 100%, weil einige Präparate mehrere positive Lokalisationen aufweisen. Außerdem beziehen sich die Prozentsätze immer auf die Anzahl der Fälle, in denen die entsprechende Komponente vorkommt, Präparate ohne die jeweilige Komponente werden nicht berücksichtigt. Dunkelgrau eingefärbte Kästchen stehen im Folgenden für 0,0%. Die Fälle, die ZM-a positiv sind, werden für eine bessere Auswertung extra mit angeführt, obwohl sie im Prozentsatz der ZM positiven Präparate auch inbegriffen sind.

### 3.2 Auswertung der $\beta$ -Catenin Färbungen

Von allen 39 Fällen wurden  $\beta$ -Catenin-Färbungen angefertigt und ausgewertet. In allen Präparaten konnte zumindest fokal eine Expression nachgewiesen werden. Die genaue prozentuale Aufteilung der Lokalisationen in den positiven  $\beta$ -Catenin-Färbungen ist in Tabelle 5 ersichtlich:

Epithel		Blastem		Stroma	
ZM +	90,9%	ZM +		ZM +	0,3%
ZM-a +	15,2%	ZM-a +		ZM-a +	
ZP +	6,1%	ZP +	96,7%	ZP +	37,8%
ZK +		ZK +	6,9%	ZK +	8,1%
-	9,1%	-	3,3%	-	56,8%

**Tabelle 5: Auswertung der Beta-Catenin-Färbungen im Tumorgewebe**



**Abbildung 2: Lokalität der Beta-Catenin-Färbungen im Tumorepithel**

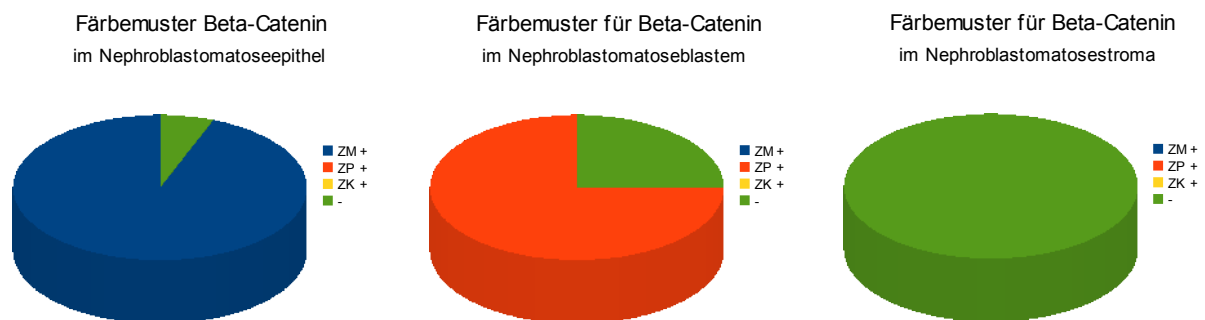
**Abbildung 1: Lokalität der Beta-Catenin-Färbungen im Tumorblastem**

**Abbildung 3: Lokalität der Beta-Catenin-Färbungen im Tumorstroma**

In den 17 Fällen, in denen eine Nephroblastomatose vor kam, war jeweils Epithel nachweisbar und 16 davon zeigten eine Positivität in der Expression. Beim Nephroblastomatoseblastem, dass nur in 4 Präparaten vorhanden war, waren 3 Fälle positiv. Stroma war lediglich in 2 Präparaten nachweisbar. Die genauen Orte der Positivität zeigen sich in Tabelle 6:

Epithel		Blastem		Stroma	
ZM +	94,1%	ZM +		ZM +	
ZP +		ZP +	75,0%	ZP +	
ZK +		ZK +		ZK +	
-	5,9%	-	25,0%	-	100,0%

**Tabelle 6: Auswertung der Beta-Catenin-Färbungen in der Nephroblastomatose**



**Abbildung 6: Lokalität der Beta-Catenin-Färbungen im Nephroblastomatoseepithel**

**Abbildung 5: Lokalität der Beta-Catenin-Färbungen im Nephroblastomatoseblastem**

**Abbildung 4: Lokalität der Beta-Catenin-Färbungen im Nephroblastomatosestroma**

In 12 Fällen (70,6% aller Nephroblastomatosen) waren in der Nephroblastomatose epitheliale Strukturen in Form von glomeruloiden Körpern vorhanden. Diese wiesen alle keine  $\beta$ -Catenin-Expression auf.

### 3.3 Auswertung der APC Färbungen

Die Färbung mit Antikörpern gegen APC, war bei 29 der 33 Fällen mit Epithel im Tumor positiv. Beim Tumorblastem zeigten 17 von 30 Präparaten mit dem Vorkommen dieser Komponente eine positive Expression und bei den 37 möglichen Tumoren mit vorhandenem Stroma waren 12 Präparate angefärbt. Die Darstellung der Lokalisationen mit Expression im Tumorgewebe sind in Tabelle 7 ablesbar:

Epithel		Blastem		Stroma	
ZM +	51,5%	ZM +		ZM +	2,7%
ZM-a +	45,5%	ZM-a +		ZM-a +	
ZP +	75,8%	ZP +	56,7%	ZP +	32,4%
ZK +		ZK +		ZK +	
-	12,1%	-	43,3%	-	67,6%

**Tabelle 7: Auswertung der APC-Färbungen im Tumorgewebe**

Von den 17 Tumoren mit Nephroblastomatose und darin vorhandenem Epithel zeigten 5 eine Expression. Blastem und Stroma waren in allen Fällen in der Nephroblastomatose negativ. Die Orte der Expression im Epithel der Nephroblastomatose sind in Tabelle 8 ersichtlich:

Epithel		Blastem		Stroma	
ZM +	23,5%	ZM +		ZM +	
ZP +	47,1%	ZP +		ZP +	
ZK +		ZK +		ZK +	
-	29,4%	-	100,0%	-	100,0%

**Tabelle 8: Auswertung der APC-Färbungen in der Nephroblastomatose**

Bei den APC-Färbungen waren alle 12 Präparate mit glomeruloiden Körpern in der Nephroblastomatose negativ. Die anderen 5 Fälle mit Nephroblastomatose wiesen keine solchen Strukturen auf.



### 3.4 Auswertung der Axin 2 Färbungen

Von den 37 Fällen mit Tumorepithel waren 35 positiv. Bei den 30 Tumoren mit Blastemvorkommen im Tumorgewebe zeigten 80%, also 24 Tumore, eine Reaktion auf den Antikörper und 17 der 37 Fälle mit Stromatumorkomponente waren ebenfalls positiv. Die Lokalisationen der Expression im Tumorgewebe sind in Tabelle 9 dargestellt:

Epithel		Blastem		Stroma	
ZM +	18,2%	ZM +		ZM +	2,7%
ZM-a +	9,1%	ZM-a +		ZM-a +	
ZP +	63,6%	ZP +	63,3%	ZP +	59,5%
ZK +	45,5%	ZK +	43,3%	ZK +	27,0%
-	6,1%	-	20,0%	-	27,0%

**Tabelle 9: Auswertung der Axin 2-Färbungen im Tumorgewebe**

Bei der Färbereaktion der 17 Nephroblastomatosen, in denen alle Epithel aufwiesen, zeigten 7 eine Reaktion. Blastem und Stroma der Nephroblastomatosen waren komplett negativ. Die genauen Lokalisationen der Expression finden sich in Tabelle 10 wieder:

Epithel		Blastem		Stroma	
ZM +		ZM +		ZM +	
ZP +	35,3%	ZP +		ZP +	
ZK +	5,9%	ZK +		ZK +	
-	58,8%	-	100,0%	-	100,0%

**Tabelle 10: Auswertung der Axin 2-Färbungen in der Nephroblastomatose**

In einem der 12 Nephroblastomatosen (5,9%) mit glomeruloiden Körpern war eine positive Expression von Axin-2 nachweisbar.

### 3.5 Auswertung der Mitf 2 Färbungen

Von den 33 Fällen mit Epithel waren 2 Tumore positiv. Das Tumorstroma zeigte gar keine Färbereaktion und im Stroma waren 5 der 37 Präparate positiv. Es handelte sich hierbei nicht um die gleichen Präparate, die auch eine epitheliale Expression zeigten. Die Expression ist in Tabelle 11 dargestellt:

Epithel		Blastem		Stroma	
ZM +		ZM +		ZM +	
ZM-a +		ZM-a +		ZM-a +	
ZP +		ZP +		ZP +	
ZK +	6,1%	ZK +		ZK +	13,5%
-	93,9%	-	100,0%	-	86,5%

**Tabelle 11: Auswertung der Mitf 2-Färbungen im Tumorgewebe**

Alle 17 Nephroblastomatosepräparate enthielten Epithel und davon zeigten 2 Fälle eine Expression. Blastem und Stroma der Nephroblastomatosen zeigten keine Anfärbung. Die positiven Expressionen sind aus Tabelle 12 ersichtlich:

Epithel		Blastem		Stroma	
ZM +		ZM +		ZM +	
ZP +		ZP +		ZP +	
ZK +	11,8%	ZK +		ZK +	
-	88,2%	-	100,0%	-	100,0%

**Tabelle 12: Auswertung der Mitf 2-Färbungen in der Nephroblastomatose**

In den glomeruloiden Strukturen konnte in allen 12 Fällen keine MITF-2 Expression gezeigt werden.

### 3.6 Vergleich der immunhistochemischen Färbungen mit und ohne $\beta$ -Catenin Mutation

#### 3.6.1 $\beta$ -Catenin-Expression

Bei der Betrachtung der Antikörperfärbungen im Vergleich zwischen den Tumoren mit und ohne  $\beta$ -Catenin-Mutation zeigte sich, dass  $\beta$ -Catenin in den Stromazellen des Tumors bei den Fällen mit einer Mutation in circa 60% der Zellkerne eine positive Expression aufweist. Bei den Tumoren ohne Mutation war keine nukleäre Expression in den Stromazellen vorhanden.

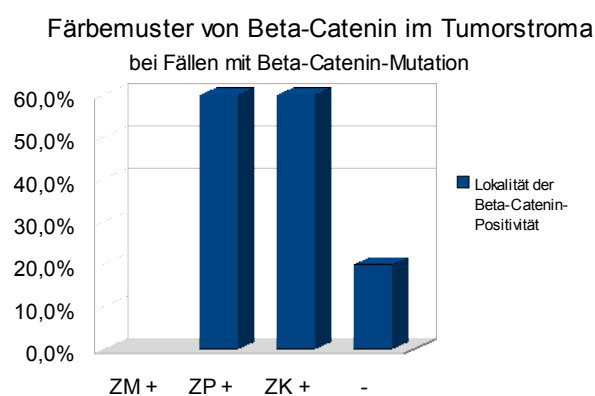


Abbildung 7: Tumore mit Beta-Catenin-Mutation

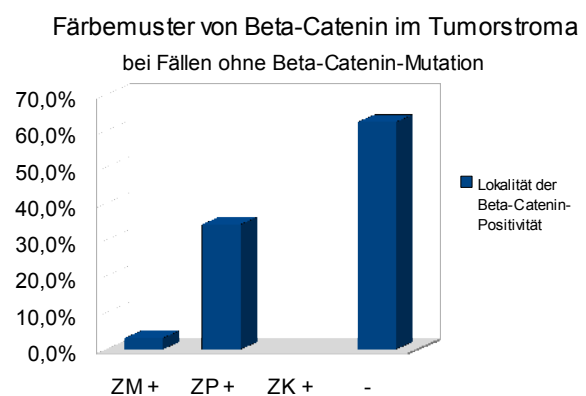


Abbildung 8: Tumore ohne Beta-Catenin-Mutation

#### 3.6.2 Axin-2 Expression

In den Nephroblastomen mit einer  $\beta$ -Catenin-Mutation zeigte sich in einem Fall mit glomeruloiden Strukturen eine Expression im Tumorepithelgewebe. Diese fand sich nicht in den Tumoren ohne Mutation.

#### 3.6.3 APC und MITF-2 Expression

Zwischen den Tumoren mit und ohne  $\beta$ -Catenin-Mutation stellte sich für diese beiden Antigene jeweils kein Unterschied in der Expression heraus.

### 3.7 Topographie der $\beta$ -Catenin-, APC- und Mitf 2-Expression im Vergleich bei zytoplasmatischer Expression von Axin 2

Die Lokalisationen der Expression von  $\beta$ -Catenin und APC im Tumorepithel bei Tumoren mit einer zytoplasmatischen Expression von Axin 2 (10 Fälle) zeigen sich in Tabelle 13:

$\beta$ -Catenin		APC	
ZM +	90,0%	ZM +	40,0%
ZP +		ZP +	70,0%
ZK +		ZK +	
-	10,0%	-	20,0%

**Tabelle 13: Lokalisationen von Beta-Catenin und APC bei zytoplasmatischer Axin-2 Expression im Tumorepithel**

Bei starker zytoplasmatischer Axin-2 Expression konnte eine geringere Expression von  $\beta$ -Catenin in der Zellmembran dargestellt werden.

Das Expressionsmuster von  $\beta$ -Catenin und APC im Blastem des Tumorgewebes bei Tumoren mit zytoplasmatischer Axin-2 Expression (11 Präparate) ist aus Tabelle 14 ersichtlich:

$\beta$ -Catenin		APC	
ZM +		ZM +	
ZP +	100,0%	ZP +	54,5%
ZK +	18,2%	ZK +	
-		-	45,5%

**Tabelle 14: Lokalisationen von Beta-Catenin und APC bei zytoplasmatischer Axin-2 Expression im Tumorblastem**

In 5 Fällen mit zytoplasmatischer Axin-2 Expression fand sich folgendes Muster in den Stromazellen des Tumors für  $\beta$ -Catenin und APC (Tabelle 15):

$\beta$ -Catenin		APC	
ZM +		ZM +	
ZP +	20,0%	ZP +	40,0%
ZK +		ZK +	
-	80,0%	-	60,0%

**Tabelle 15: Lokalisationen von Beta-Catenin und APC bei zytoplasmatischer Axin-2 Expression in den Stromazellen des Tumors**

### 3.8 Expressionsmuster im Vergleich zwischen Tumorgewebe und Nephroblastomatose

Im Folgenden werden je eine Tabelle für die untersuchten Antigene mit einem Vergleich der Expressionsmuster zwischen den Tumorkomponenten und den Komponenten der Nephroblastomatose präsentiert. Da Mitf 2 in nur 7 Tumoren exprimiert wurde, wird auf eine Darstellung für dieses Protein verzichtet, wie auch auf Expressionslokalisationen, die im Tumorgewebe nicht nachweisbar waren.

#### 3.8.1 $\beta$ -Catenin-Expression

Die nächsten 3 Tabellen stellen den Vergleich der Expressionsmuster der einzelnen Tumorkomponenten zu den vergleichbaren Nephroblastomatosekomponenten für  $\beta$ -Catenin-Färbungen dar. Auf das Stroma wird hierbei verzichtet, weil es nur sehr selten in der Nephroblastomatose vor kam. Tabelle 16 bezieht sich auf das Epithel und Tabelle 17 auf das Blastem.

Tumor	Nephroblastomatose		Tumor	Nephroblastomatose		Tumor	Nephroblastomatose	
ZM + (30 Fälle)	ZM +	40,0%	ZP + (2 Fälle)	ZM +		- (3 Fälle)	ZM +	100,0%
	ZP +			ZP +			ZP +	
	ZK +			ZK +			ZK +	
	-	3,3%		-			-	
	x	56,7%		x	100,0%		x	

**Tabelle 16: Vergleich der Expressionslokalisationen im Tumorepithel mit den epithelialen Anteilen der Nephroblastomatose für Beta-Catenin**

Tumor	Nephroblastomatose		Tumor	Nephroblastomatose		Tumor	Nephroblastomatose	
ZP + (29 Fälle)	ZM +		ZK + (2 Fälle)	ZM +		- (1 Fall)	ZM +	
	ZP +	10,3%		ZP +			ZP +	
	ZK +			ZK +			ZK +	
	-	3,5%		-			-	
	x	86,2%		x	100,0%		x	100,0%

**Tabelle 17: Vergleich der Expressionslokalitäten im Tumorblastem mit den Blastemanteilen der Nephroblastomatose für Beta-Catenin**

## 3.8.2 APC-Expression

Die folgenden Tabellen zeigen die APC Expression im Vergleich zwischen den Tumorkomponenten und den vergleichbaren Anteilen der Nephroblastomatose. Auch hier wird keine Dokumentation des Stromas wegen des geringen Vorkommens in der Nephroblastomatose vorgenommen. Tabelle 18 zeigt das Epithel und Tabelle 19 das Blastem.

Tumor	Nephroblastomatose		Tumor	Nephroblastomatose		Tumor	Nephroblastomatose	
ZM + (17 Fälle)	ZM +	11,8%	ZP + (25 Fälle)	ZM +	4,0%	- (4 Fälle)	ZM +	25,0%
	ZP +	17,7%		ZP +	20,0%		ZP +	25,0%
	ZK +			ZK +			ZK +	
	-	17,7%		-	8,0%		-	
	x	52,9%		x	56,0%		x	50,0%

**Tabelle 18: Vergleich der Expressionslokalisationen im Tumorepithel mit den Epithelkomponenten Nephroblastomatose für APC**

Tumor	Nephroblastomatose		Tumor	Nephroblastomatose	
ZP + (17 Fälle)	ZM +		- (13 Fälle)	ZM +	
	ZP +			ZP +	
	ZK +			ZK +	
	-	17,7%		-	7,7%
	x	82,3%		x	92,3%

**Tabelle 19: Vergleich der Expressionslokalisationen im Tumorblastem mit den Blastemanteilen der Nephroblastomatose für APC**

## 3.8.3 Axin-2 Expression

Die folgenden Tabellen zeigen die Axin-2 Expression im Vergleich zwischen den Tumorkomponenten und den vergleichbaren Anteilen der Nephroblastomatose. Die Darstellungen für das Epithel finden sich in Tabelle 20 und die für das Blastem in Tabelle 21.

Tumor	Nephroblastomatose		Tumor	Nephroblastomatose		Tumor	Nephroblastomatose		Tumor	Nephroblastomatose	
ZM + (6 Fälle)	ZM +		ZP + (21 Fälle)	ZM +		ZK + (15 Fälle)	ZM +		- (2 Fälle)	ZM +	
	ZP +	50,0%		ZP +	14,3%		ZP +	6,7%		ZP +	50,0%
	ZK +			ZK +			ZK +	6,7%		ZK +	
	-	16,7%		-	28,6%		-	40,0%		-	
	x	33,3%		x	57,1%		x	46,7%		x	50,0%

**Tabelle 20: Vergleich der Expressionslokalisationen im Tumorepithel mit den epithelialen Anteilen der Nephroblastomatose für Axin 2**

In einem Fall fanden sich im Tumorepithel glomeruloide Strukturen, die eine Axin-2 Expression aufwiesen. In einem weiteren Fall wurde eine zytoplasmatische Expression von Axin-2 in den glomeruloiden Körpern der Nephroblastomatose sowie in den Zellkernen des Epithel des Tumorgewebes nachgewiesen. Diese beiden Fälle sind in der Gruppe ZP + der Nephroblastomatose inbegriffen.

Tumor	Nephroblastomatose		Tumor	Nephroblastomatose		Tumor	Nephroblastomatose	
ZP + (19 Fälle)	ZM +		ZK + (13 Fälle)	ZM +		- (6 Fälle)	ZM +	
	ZP +			ZP +			ZP +	
	ZK +			ZK +	7,7%		ZK +	
	-	15,8%		-	15,4%		-	
	x	84,2%		x	76,9%		x	100,0%

**Tabelle 21: Vergleich der Expressionslokalisationen im Tumorblastem mit den Blastemanteilen der Nephroblastomatose für Axin 2**

## 4 Diskussion

Die genaue Ätiologie von Wilms-Tumoren ist noch nicht vollständig geklärt. Verschiedene genetische Veränderungen, u.a. ein 'Loss of heterozygosity' (LOH) sind bekannt. Mutationen spielen eine entscheidende Rolle bei einem Teil der Tumore. In etwa 10% liegt eine Mutation des WT1-Gens, welches als Transkriptionsfaktor und Tumorsuppressorgen fungiert, als LOH in 11p13 und in etwa 45% eine Mutation des WT2-Gens als LOH in 11p15.5 vor. Die Verbindung zum Wnt-Signalweg ist durch die Mutation im  $\beta$ -Catenin-Gen gegeben. Sie kommt in etwa 15% der Nephroblastome vor [Maiti et al. 2000], [Koesters et al. 2003]. Nachweisbar sind auch Mutationen im APC- und WTX-Gen, die unmittelbar auf den Signalweg des  $\beta$ -Catenins in der Wnt-Kaskade Einfluss nehmen [Ramburan et al. 2005], [Eklof Spink et al. 2001]. Eine WTX-Mutation zeigt sich in circa 30% der Wilms-Tumore [Major et al. 2007].

### 4.1 Bedeutung des Wnt-Signalwegs in Wilms-Tumoren

Der Wnt-Signalweg nimmt eine zentrale Rolle während der embryonalen Entwicklung und bei der Regulation von Zellwachstum, Zelldifferenzierung sowie Zellbeweglichkeit ein. Es gibt einen Zustand des Signalwegs ohne Bindung von Wnt, den Off-State-Modus und einen Zustand, bei dem die Kaskade durch die Verknüpfung von Wnt mit dem entsprechenden Rezeptor in Gang gesetzt wird, den On-State-Modus.

Bei Abwesenheit des Wnt-Signals wird  $\beta$ -Catenin durch einen Komplex aus GSK3 $\beta$ , Axin 2 und APC im Zytoplasma, der mit Tyrosinkinasen interagiert, phosphoryliert. Dadurch wird der Abbau in Proteasomen vorbereitet und  $\beta$ -Catenin abgebaut. Der  $\beta$ -Catenin-Gehalt im Zytoplasma wird so gering gehalten und das Protein kann nicht in den Zellkern gelangen, um dort als Transkriptionsfaktor für Zielgene der Proliferation aktiv zu werden. Zellwachstum und andere Funktionen des Wnt-Weges werden dadurch gehemmt und reguliert.

Durch die Bindung eines Wnt-Moleküls an den Frizzled-Rezeptor in der Zellmembran kommt es zu einer Aktivierung von Dsh. Das aktivierte Dsh hemmt GSK3 $\beta$  und bindet Axin 2 an die Membran, so dass kein Komplex zum Abbau von  $\beta$ -Catenin gebildet werden kann und  $\beta$ -Catenin frei im Zytoplasma vorhanden ist. Das Level an  $\beta$ -Catenin ist dann ausreichend hoch, um auch im Zellkern zu akkumulieren und dort eine Verknüpfung mit Tcf einzugehen. Dadurch kann die Transkription von Genen, die relevant für die Zellteilung sind, wie c-myc,



cyclin D1 und Tcf-1, aktiviert werden [Barker und Clevers, 2000], [Behrens und Lustig, 2004], [Seidensticker und Behrens, 2000], [Huang und He, 2008], [Kikuchi, 1999].

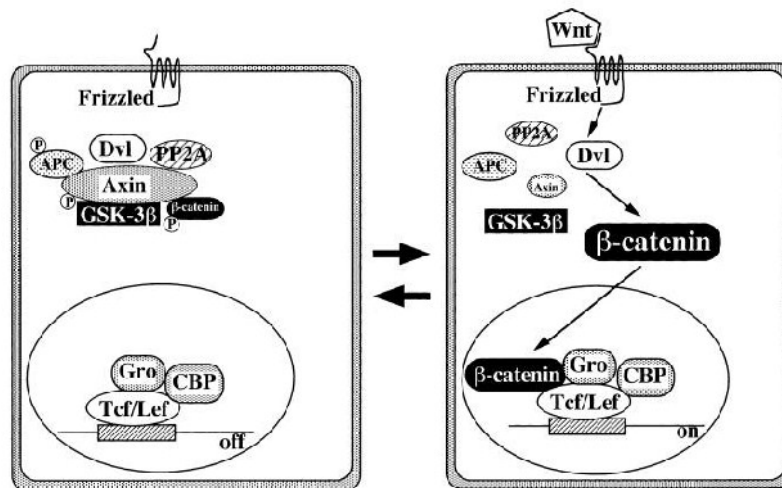


Abbildung 9: Off- und On-State des Wnt-Signalweges [Kikuchi, 1999]

Diese beiden Funktionsmodi der Wnt-Kaskade sind der diskutierte Grund für ihr Mitwirken bei der Entstehung von Tumoren, ausgelöst durch Mutationen einer oder mehrerer Komponenten des Transduktionsweges [Behrens und Lustig, 2004], [Seidensticker und Behrens, 2000]. Es kann zu einem dauerhaften On- bzw. Off-State kommen, wodurch die Zellteilung ungehindert fortschreiten kann oder gestoppt wird. Besonders in Tumoren des Urogenitaltraktes, wie Prostata-Karzinome oder Wilms-Tumoren, ist diese Signalkaskade relevant für die Entstehung [Tycko et al. 2007].

## 4.2 Untersuchungen zur $\beta$ -Catenin-Expression

$\beta$ -Catenin hat zwei Hauptfunktionen in den Zellen. Zum einen ist es ein Bestandteil des Cadherin/Catenin-Komplexes in den Zell-Zell-Adhäsionskontakten und ist für das Zusammenhalten der Zellen verantwortlich. Es bindet das Zytoskelett an die Zellmembran, welches zur Stabilisierung der Zelle beiträgt. Diese Funktion wird vom größten Teil des  $\beta$ -Catenins

ausgeführt. Zum anderen ist es der zentrale Baustein im Wnt-Signalweg und somit an Zellteilung und Zellwachstum, aber auch an Differenzierung und Zelluntergang beteiligt. Das freie  $\beta$ -Catenin lässt sich im Vergleich zum gebundenen Protein in einem sehr viel geringerem Umfang nachweisen [Koesters et al. 2003], [Sun, 2009], [Gooding et al. 2004].

15% der Wilms Tumore weisen eine  $\beta$ -Catenin Mutation auf [Maiti et al. 2000]. In diesen Tumoren stellten wir eine nukleäre Expression vor allem in der Stroma- und Blastemkomponente dar. Allerdings liegt auch bei etwa 50% der Wilms-Tumore ohne diese Mutationen eine Expression im Zellkern vor [Koesters et al. 2003]. Dieses Expressionsmuster würde für eine Aktivierung der Wnt-Kaskade sprechen, da  $\beta$ -Catenin im Zellkern nur akkumulieren kann, wenn der Signalweg im „On-State“ ist und dadurch die Komplexbildung mit Axin 2 im Zytoplasma verhindert wird. Eine zytoplasmatische und membranständige Anfärbung im Epithel findet sich in allen Nephroblastomen. Es zeigt das physiologische Vorkommen des Onkoproteins [Koesters et al. 2003].  $\beta$ -Catenin ist nur anfärbbar, wenn es in einem Komplex vorliegt. In der Zellmembran ist das der Komplex mit Cadherin, im Zytoplasma mit GSK3 $\beta$ , Axin 2 sowie APC und im Zellkern die Verbindung mit Tcf und Lef.

Bei den untersuchten Wilms-Tumoren liegt zu 12,8% eine  $\beta$ -Catenin-Mutation vor (5 von 39 Fällen). In den restlichen Präparate kann keine solche Mutation nachgewiesen werden. Im Vergleich der Expressionsmuster zeigen sich eine nukleäre Positivität im Stroma in 60% der Fälle mit Mutationen, während die Tumoren ohne Mutation eine nukleäre Expression nur in einem Fall (6,9%) im Blastem aufweisen. Die Nephroblastomatosen zeigen unabhängig vom Mutationsstatus der Tumoren jeweils keine nukleäre Expression. Das legt den Schluss nahe, dass die Mutationen nur im Nephroblastom selbst, aber nicht in der Nephroblastomatose vorhanden sind. Hierzu liegen noch keine Untersuchungen vor, die den  $\beta$ -Catenin-Mutationsstatus zwischen Tumor und Nephroblastomatose verglichen haben.

Prognostisch lässt sich kein Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein einer Mutation und der Prognose der Patienten in unserem Untersuchungsgut erkennen. Alle 5 Fälle befinden sich in dem prognostisch günstigen SIOP-Stadium I und stellen Tumore der sogenannten Intermediären Risikogruppe da, in der für die Patienten eine 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit von 90% gegeben ist [SIOP, 2001/ GPOH].

Die Prognose ist anders bei anderen malignen Tumoren, wie dem hepatozellulären Karzinomen (HCC), bei welchem eine nukleäre Anfärbung mit einer schlechteren Prognose einhergeht und mit einer vermehrten intravasalen Tumorausbreitung sowie einer erhöhten Tumorinvasivität assoziiert ist [Polakis, 2000]. Ein weiteres Beispiel bilden Hepatoblastome. Hier kann eine Assoziation zwischen einer Akkumulation im Zellkern und einer geringeren Differenzierung des Tumors gezeigt werden [Takayasu et al. 2001]. Allerdings kann auch eine nukleäre Expression in sogenannten Desmoid Tumoren (eine aggressive Fibromatose) dargestellt werden, die auf  $\beta$ -Catenin-Mutationen beruht [Bhattacharya et al. 2005]. Demgegenüber werden in Tumoren ohne  $\beta$ -Catenin-Mutation eine zytoplasmatische oder membranständige Expression gefunden [Bhattacharya et al. 2005]. Das passt zu den Ergebnissen der von uns untersuchten Wilms-Tumoren mit nukleärer Expression in der Stromalen Komponente bei vorhandener Mutation.

Der Vergleich der Expressionsmuster von  $\beta$ -Catenin zwischen Nephroblastomen und den Vorläuferläsionen, den Nephroblastomatosen, zeigt in unserem Untersuchungsgut mit Ausnahme der Fälle mit  $\beta$ -Catenin-Mutationen keine Unterschiede. So stellt anscheinend die alleinige immunhistochemische Untersuchung von Wilms-Tumoren mit einem Antikörper gegen das Onkoprotein  $\beta$ -Catenin keine Unterscheidungsmöglichkeit zwischen den eigentlichen Tumoren und deren Vorläuferläsion (Nephroblastomatose) dar, es sei denn der Tumor weist eine  $\beta$ -Catenin-Mutation auf. Diese kommen nur in circa 15% der Fälle vor und auch führen hier ebenfalls nur in einem Teil der Fälle die Mutationen zu einer nukleären Expression. Weiterhin kann die alleinige Expressionsuntersuchung von  $\beta$ -Catenin keinen Hinweis zur Prognose der Patienten bieten.

### 4.3 Ergebnisse der Expression von APC

Das Adenomatous polyposis coli (APC) Protein ist bei der Proliferation, der Zellteilung, der Apoptose, der Zelladhäsion und -migration sowie bei chromosomalen Prozessen beteiligt [Ramburan et al. 2005]. Mehrere Funktionen übt es durch sein Mitwirken im Wnt-Signalweg und seine Rolle als Tumorsuppressor aus. Diese Funktionen sind teils miteinander verknüpft, denn in der Wnt-Kaskade bei Abwesenheit des Wnt-Signals bindet APC zusammen mit Axin 2 und GSK3 $\beta$  das  $\beta$ -Catenin, wodurch dessen Abbau in Proteasomen durch Phosphorylierung

gebahnt wird. Die Transkription von Zielgenen für die Zellteilung wird somit nicht aktiviert, welches zur physiologischen Regulation der Zellteilung führt, aber auch zur Verhinderung der Entstehung von Tumoren durch ungehemmte Teilung [Huang und He, 2008], [Behrens und Lustig, 2004]. Gleichsam hat APC eine Funktion im Zellkern. Es transportiert überschüssiges  $\beta$ -Catenin aus dem Zellkern zurück ins Zytoplasma [Senda et al. 2005].

Physiologischerweise wird APC im Zytoplasma und im Zellkern gefunden [Deka et al. 1999]. Es gibt weiterhin Hinweise, dass APC auch im Bereich der Zellmembran Funktionen hat, und zwar in mutierter und nicht mutierter Form. Im Bereich der Zellmembran hat APC einen Einfluss auf die Zell-Zellkontakte [Carothers et al. 2001], [Midgley et al. 1997], [Harris und Nelson, 2010]. In der normalen Niere wird APC immer im Zytoplasma sowie selten im Zellkern nachgewiesen [Maschietto et al. 2008].

Gezeigt werden kann, dass APC-Mutationen zur Entstehung von Tumoren führen. Durch den Funktionsverlust des APC-Proteins wird kein Abbau-Komplex für  $\beta$ -Catenin gebildet.  $\beta$ -Catenin kumuliert im Zytoplasma und auch im Zellkern und kann ungehindert die Transkription und somit die Zellteilung fördern. Mutiertes APC begünstigt auch die Migration von Epithelzellen, welches eine entscheidende Rolle bei der Metastasierung und dem invasivem Wachstum von Tumoren spielt.

Besonders intensiv sind Mutationen des APC-Gens bei kolorektalen Karzinomen untersucht. Mutationen sind nicht nur an der 'familial adenomatous polyposis' (FAP), einer vererbaren Erkrankung, bei der multiple Dickdarmadenome mit hohem Entartungsrisiko entstehen, sondern auch bei der Entstehung eines Großteils der sporadischen Kolonkarzinome beteiligt [Behrens und Lustig, 2004], [Gumbiner, 1997], [Eklof Spink et al. 2001]. Mutationen im APC-Gen sind bei Kolonkarzinomen deutlich häufiger als im  $\beta$ -Catenin-Gen. In anderen Tumoren spielen Mutationen im APC-Gen eine wesentlich geringere Rolle [Caca et al. 1999], [Barker und Clevers, 2000].

Informationen über Mutationen des APC-Gens in Wilms-Tumoren liegen bisher nur in geringem Umfang vor. Es gibt Hinweise, dass 'loss-of-function'-Mutationen des Tumorsuppressors auftreten [Maschietto et al. 2008].

In den hier untersuchten Nephroblastomen wurde die Expression des APC-Gens ausgewertet. Zytoplasmatisch konnte APC in der epithelialen Komponente in 75,8% der Fälle gefunden

werde, in der Blastem-Komponente in 56,7% der Fälle sowie in der Stroma-Komponente in 32,4% der Fälle. In der Epithelkomponente findet sich zusätzlich in 51,5% der Fälle eine Expression in der Zellmembran. Eine nukleäre Expression zeigt sich in keinem Fall. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen kann in einer kürzlich veröffentlichten Studie eine nukleäre Expression von APC in 62 bis 90% der verschiedenen Komponenten der untersuchten Nephroblastome nachgewiesen werden [Maschietto et al. 2008]. Möglicherweise ist für diese Untersuchung eine andere immunhistochemische Nachweismethode verwendet worden.

In der Epithelkomponente der Nephroblastomatose findet sich ein praktisch identisches Muster wie in der Epithelkomponente des Tumors. Dies spricht dafür, dass das Expressionmuster von APC von der Differenzierung der Zellen abhängt, da in der Nephroblastomatose sowie in der Epithelkomponente des Tumors häufig ein vergleichbarer epithelialer Differenzierungsgrad vorliegt.

Eine nukleäre Positivität des APC-Proteins spricht im Kolonepithel für eine gesteigerte Proliferation in Zellen der basalen Krypten, die für die Regeneration und Neubildung zuständig sind. In den hier untersuchten Fällen sind keine Anfärbungen der Zellkerne nachgewiesen, sodass APC in Wilms-Tumoren die Zellen nicht zur gesteigerten Proliferation und somit zur vermehrten Zellteilung direkt anzuregen scheint [Deka et al. 1999].

Der Nachweis von APC im Zytoplasma passt zu einer physiologischen Expression in den Zellen. Unklar bleibt jedoch, ob eine membranständige Expression mit einer Mutation assoziiert ist oder auch physiologisch in den Tumoren vorkommt. Anhand des vorliegenden Expressionsmusters gibt es keine eindeutigen Hinweise, die auf eine Mutation von APC schließen lassen könnten.

Prognostisch scheint die APC-Expression in den untersuchten Tumoren keine Rolle zu spielen. Eine membranständige Expression wird zwar in einem Fall mit diffuser Anaplasie gefunden, jedoch ist aus diesem Einzelfall keine prognostische Wertigkeit ableitbar. Bei den Tumoren mit ausgeprägter Regression nach präoperativer Chemotherapie, d.h. Tumoren mit guter Chemosensitivität, lässt sich kein Expressionsmuster von APC erkennen. Nur im Blastem, welches nach Chemotherapie als prognostisch ungünstige Tumorkomponente angesehen wird, findet sich eine ausschließlich zytoplasmatische Expression.

Kolorektale Adenome als Vorläuferläsionen für Dickdarmkarzinome weisen eine im Vergleich zu den Karzinomen verminderte Expression von APC auf [Fu et al. 2008]. Eine Verminderung der APC-Expression in Nephroblastomatosen findet sich in den untersuchten Fällen nicht. Daher kann diese Analogie in der APC-Expression bei den Vorläuferläsionen des Kolonkarzinoms bei Nephroblastomen nicht gezeigt werden.

Zusammenfassend lässt sich aus den Ergebnissen der APC-Expression kein sicherer Hinweis auf das Vorliegen einer durch APC verursachten Störung des Wnt-Signalweges bei Nephroblastomen ableiten. Das Expressionsmuster ist mit einer physiologischen Funktion von APC in den Tumorzellen vereinbar. Dennoch lässt sich nicht ausschließen, dass trotz der unauffällig erscheinenden APC-Expression Mutationen im APC-Gen in den Tumoren vorhanden sein könnten.

#### **4.4 Ergebnisse der Expression von Axin 2**

Axin 2 fungiert als negativer Regulator des Wnt-Signalweges und beeinflusst somit verschiedene zelluläre Funktionen, insbesondere die Proliferation der Zellen [Kikuchi, 1999]. Weiterhin wirkt es bei der embryonalen Wirbelsäulenentwicklung mit. Diese unterschiedlichen Aufgaben erfüllen zwei verschiedene Domänen des Axin-Proteins [Fagotto et al. 1999]. Durch eine Komplexbildung mit APC und GSK3 $\beta$  kommt es zur Phosphorylierung und zum Abbau von  $\beta$ -Catenin in Proteasomen. Dies hat eine verminderte Wachstumsrate der Zelle zur Folge [Kikuchi, 1999], [Kishida et al. 1999], [Kadoya et al. 2000]. Die Funktion von Axin 2 wird durch einen negativen Feedbackmechanismus reguliert.  $\beta$ -Catenin aktiviert bei Abwesenheit von Axin 2 die Transkription von Axin 2. Bei ausreichenden Axin 2 Mengen wird  $\beta$ -Catenin degradiert und dadurch die Aktivierung von Axin 2 gehemmt [Leung et al. 2002], [Kikuchi, 1999], [Fagotto et al. 1999].

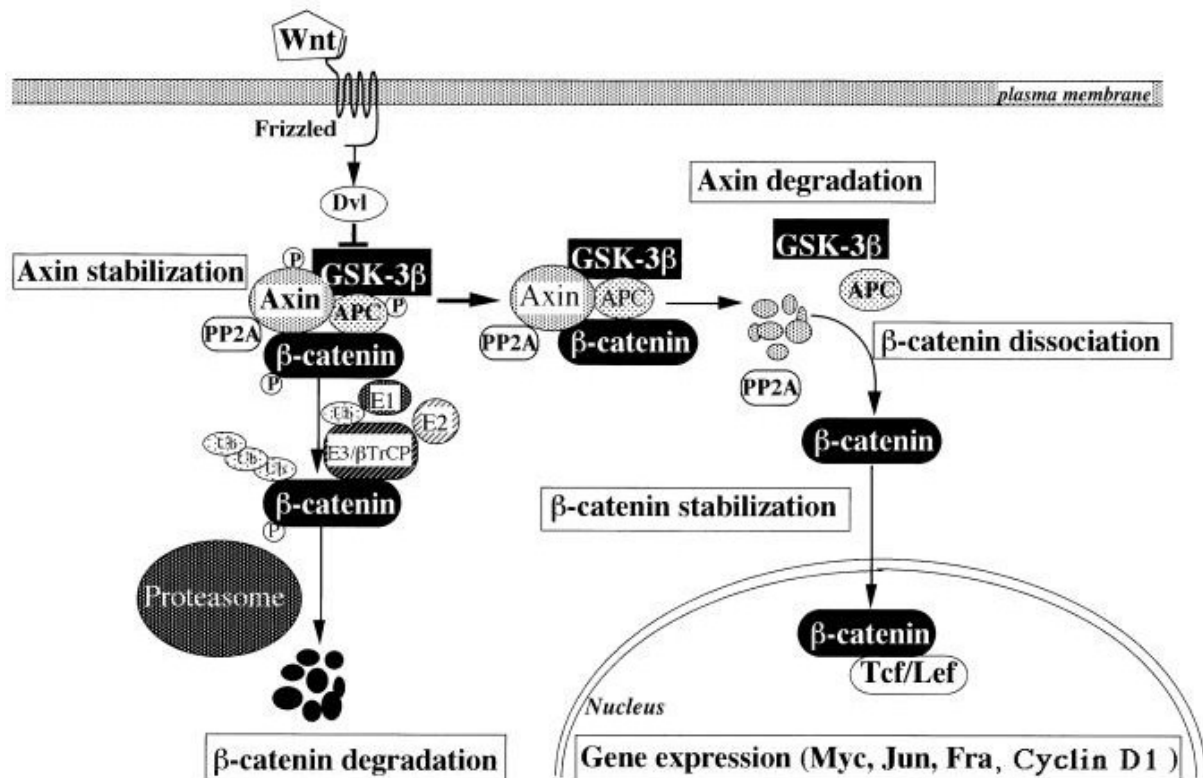


Abbildung 10: Axin im Wnt-Signalweg [Kikuchi, 1999]

Axin 2-Mutationen können entweder zu einer gesteigerten Expression des Proteins oder zu einem Funktionsverlust führen. Eine Überexpression induziert eine Phosphorylierung von APC durch GSK3 $\beta$  und reduziert die  $\beta$ -Catenin-Spiegel. Ein Verlust der Axin 2-Funktion hat eine gesteigerte Aktivität von  $\beta$ -Catenin zur Folge. Die Funktionsveränderungen des Axin 2-Gens sind durch den mutierten Abschnitt des Gens bedingt. Eine Mutation in der APC- oder Dsh-bindenden-Domäne führt zur Reduktion des  $\beta$ -Catenin-Levels, während Mutationen in den  $\beta$ -Catenin-, GSK3 $\beta$ - und DIX-bindenden-Bezirken keinen Einfluss auf die Menge des vorhandenen Onkoproteins haben [Fagotto et al. 1999], [Kishida et al. 1999], [Nakamura et al. 1998].

Bei einigen Kolonkarzinomen können Axin 2 - Mutationen nachgewiesen werden, jedoch keine APC- und  $\beta$ -Catenin-Mutationen. Diese Axin 2-Mutationen führen zur gesteigerten Aktivierung der Transkription der Zielgene durch  $\beta$ -Catenin und begünstigen das Zellwachstum und die Tumorgenese [Leung et al. 2002]. Loss-of-function Mutationen kommen in einigen Lebertumoren vor [Barker und Clevers, 2000]. In hepatozellulären Karzinomen ist eine Inakti-

vierung von Axin 2 in Tumoren ohne  $\beta$ -Catenin-aktivierende Mutation bekannt. Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um Genveränderungen in den  $\beta$ -Catenin-bindenden Domänen des Axins [Polakis, 2000]. Beim Lungenkarzinom reguliert Axin die Transkription von  $\beta$ -Catenin herunter und hemmt so die Proliferation und das invasive Wachstum der Tumorzellen [Yang et al. 2010].

In Wilms-Tumoren können sog. 'silent mutations' im Axin-Gen auftreten, d.h. Mutationen, die keine Änderung der Aminosäuresequenz bedingen. Ein ursächlicher Zusammenhang von Axin 2 - Mutationen bei der Entstehung der Nephroblastome kann aber bisher nicht nachgewiesen werden [Miao et al. 2002]. Axin wird normalerweise überwiegend im Zytoplasma und teilweise in der Zellmembran exprimiert. Dieses Expressionsmuster kann sich in Abhängigkeit von der Lokalisation der Mutation ändern. Bei Mutationen der GSK3 $\beta$ - und  $\beta$ -Catenin-bindenden Domänen findet sich keine Expression im Bereich der Zellmembran. Bei Deletion der COOH-Domäne kommt es hauptsächlich zu einer Zellmembran-Expression des Proteins und bei Mutation des NH<sub>2</sub>-Abschnitts vor allem zu einer zytoplasmatische Expression. Demgegenüber haben Mutationen in der APC-bindenden Domäne keinen Einfluss auf das Expressionsmuster. Das Muster kann daher ein indirekter Hinweis auf eine Mutation im Axin 2-Gen sein [Fagotto et al. 1999]. Eine nukleäre Expression von Axin 2 ist bisher in keiner Studie beschrieben worden.

In den untersuchten Nephroblastomen dieser Arbeit findet sich im Tumorepithel in 18,2% der Fälle eine membranständige, in 63,6% der Fälle eine zytoplasmatische und in 45,5% der Fälle eine nukleäre Expression von Axin 2. In der Blastem-Komponente zeigt sich in 63,3% der Fälle eine Expression im Zytoplasma und in 43,3% der Fälle im Zellkern. Die Stromakomponente weist in 59,5% der Fälle eine zytoplasmatische, in 27,0% der Fälle eine nukleäre und in 2,7% der Fälle eine membranständige Expression auf. Eine Koexpression im Zytoplasma und im Zellkern findet sich in 30,3% der Fälle mit epithelialer Komponente, in 26,7% der Fälle mit Blastemkomponente sowie in 10,8% der Fälle mit Stromadifferenzierung. Die Nephroblastomatose hat ein ganz ein ähnliches Expressionsmuster. Der zytoplasmatische und membranständige Nachweis von Axin 2 entsprechen der physiologischen Expression. Die nukleäre Expression ist bisher in der Literatur nicht beschrieben worden. Es wäre daher denkbar, dass diese nukleäre Expression durch Mutationen bedingt sein könnte. Hierzu würde auch



passen, dass die nukleäre Expression mit Ausnahme eines Falles nur in den Nephroblastomen zu sehen war, jedoch nicht in der ebenfalls in der Niere vorhandenen Nephroblastomatose. Es wäre möglich, dass dieses veränderte Expressionsmuster erst durch eine im Nephroblastom auftretende Genveränderung verursacht wird, die in den Vorläuferläsionen noch nicht nachweisbar ist.

In Bezug auf das Ausbreitungsstadium der Tumoren lässt sich kein Unterschied zwischen den verschiedenen Stadien und einer Axin 2-Expression zeigen. Daher hat die Axin 2-Expression wahrscheinlich keine prognostische Bedeutung für die Patienten.

Bei Lungenkarzinomen kann gezeigt werden, dass eine geringere Invasivität und verminderte Proliferation im Tumor auftritt, wenn eine Mutation in der  $\beta$ -Catenin-Domäne des Axins vorliegt [Yang et al. 2010]. Eine membranständige Expression von Axin 2 tritt bei dieser Form der Mutation nicht auf [Miao et al. 2002]. In den untersuchten Nephroblastomen findet sich meist nur in einzelnen Tumorkomponenten eine fehlende membranständige Expression von Axin 2 bei sonst deutlicher Expression im Zytoplasma oder im Zellkern. In Tumoren mit fortgeschrittenem Ausbreitungsstadium sowie Tumoren der hohen Risikogruppe zeigt sich teilweise ebenfalls eine fehlende membranständige Axin 2-Expression. Da man davon ausgehen muss, dass diese Tumoren primär ein aggressiveres Wachstumsverhalten aufweisen als Tumoren niedriger Ausbreitungsstadien bzw. der intermediären Risikogruppe, ist nicht anzunehmen, dass die Tumore Axin 2-Mutationen aufweisen, wie für Lungenkarzinome mit geringerer Invasivität beschrieben [Yang et al. 2010]. Dies passt auch dazu, dass Mutationen im Axin 2-Gen bei Nephroblastomen bisher nicht beschrieben werden.

#### **4.5 Ergebnisse der Expression von Mitf 2**

Der 'microphthalmia-associated transcription factor' (Mitf) spielt eine wichtige Rolle in der Regulation der Differenzierung und Entwicklung des retinalen Pigmentepithels im Auge und fördert dazu entsprechende Melanogenesenzyme. Hierbei ist Mitf im Zellkern in die Regulation des Zellzyklus von Melanozyten-Stammzellen involviert. Des Weiteren interagiert Mitf mit Lef1, einem Transkriptionsfaktor des Wnt-Signalwegs und greift so in die Zelldifferenzierung und Zellproliferation ein [Saito et al. 2003]. Es arbeitet auch direkt mit  $\beta$ -Catenin, dem

wichtigsten Regulator der Wnt-Kaskade, zusammen [Shibahara et al. 2001], [Yasumoto et al. 2002], [Schepsky et al. 2006].

Im weiteren wird nur auf die Rolle von Mitf 2 im Wnt-Signalweg eingegangen. Mitf 2 weist eine Bindungsstelle für Lef1 auf, worüber Mitf die Expression von c-myc sowie cyclin D1 induzieren kann und dadurch ein positiver Feedbackmechanismus entsteht. Weiterhin existiert eine Domäne für  $\beta$ -Catenin, um eine Verknüpfung zu den Transkriptionsfaktoren Tcf/Lef1 herstellen zu können und  $\beta$ -Catenin als Koaktivator zu nutzen. Diese beiden Mechanismen regulieren sich gegenseitig. Durch Aktivierung des Wnt-Pathways wird Mitf aktiviert und fördert die Transkription. Der genaue Mechanismus ist jedoch noch unklar [Schepsky et al. 2006].

Gezeigt werden kann, dass eine Überexpression von Mitf die Transkription durch den  $\beta$ -Catenin-Tcf-Komplex vermindert. Umgekehrt wird aber auch die Aktivität der Mitf-abhängigen Transkription gesenkt, wenn  $\beta$ -Catenin vermehrt vorkommt. Mutationen im Mitf-Gen führen dazu, dass zwar  $\beta$ -Catenin noch gebunden werden kann, aber es nicht mehr zur Aktivierung der Transkription kommt [Schepsky et al. 2006].

Mitf-Amplifikationen werden in Melanomen beschrieben. Hier treten sie in 10-20% der Fälle auf, und zwar bevorzugt bei metastasierten Fällen. Mutationen treten ebenfalls in einzelnen Fällen auf [Cronin et al. 2009].

Mitf wird in Melanomen in variablem Umfang exprimiert und zeigt eine hohe Spezifität für diese Tumorentität [Levy et al. 2006], [Miettinen et al. 2001], [King et al. 1999], [Miller et al. 2004], [Steingrimsson et al. 2004]. Die Mitf-Expression ist in metastasierten Melanomen reduziert, mit Ausnahme der Fälle mit einer Amplifikation [Levy et al. 2006]. Weiterhin wird Mitf in Klarzellensarkomen der Weichteile nachgewiesen [Davis et al. 2006]. Auch Angiomyolipome der Niere exprimieren dieses Protein [Zavala-Pompa et al. 2001].

In den untersuchten Nephroblastomen kann eine nukleäre Expression in der Epithelkomponente in 6,1% der Fälle, in der Stromakomponente in 13,5% der Fälle und in dem Epithelanteil der Nephroblastomatose in 11,8% der Fälle nachgewiesen werden. Im Blastem der Tumoren zeigt sich keine Mitf-Expression. Alle Tumore mit Mitf-Expression gehören zu der intermediären Risikogruppe und es sind alle SIOP-Stadien von I bis III vertreten. Die Ursache für die Expression von Mitf in Nephroblastomen geht aus den Untersuchungen nicht hervor. Es

ist nicht wahrscheinlich, dass Amplifikationen für diese Expression verantwortlich sind. Denkbar ist, dass Störungen bei den Interaktionspartnern, wie Lef1, für die Expression ausschlaggebend sind.

#### **4.6 Resumé der immunhistochemischen Ergebnisse im Zusammenhang**

In allen untersuchten Nephroblastomen wurde eine Mutation im WTX-Gen nachgewiesen. Beim WTX-Gen handelt es sich um ein Tumorsuppressorgen auf dem X-Chromosom, welches bei 6-30% der Nephroblastome vorkommt. Die Mutationen sind zwischen weiblichen und männlichen Patienten gleichermaßen verteilt. Mutationen im WTX-Gen können bereits in Nephroblastomatosen auftreten, die als Vorläuferläsionen des Wilms-Tumors gelten. Die Bedeutung einer WTX-Mutation ist bisher nicht geklärt. Es kann bisher keine klinische Relevanz für die Prognose der Patienten gezeigt werden [Fukuzawa et al. 2010], [Wegert et al. 2009], [Ruteshouser et al. 2008]. WTX ist in dem Wnt-Signalweg involviert. Es bildet einen Teil des Komplexes zum Abbau von  $\beta$ -Catenin und ist somit für dessen Abbau notwendig [Major et al. 2007]. Da alle untersuchten Nephroblastome eine WTX-Mutation aufweisen, haben wir anfangs die Hypothese aufgestellt, dass möglicherweise in allen Tumoren eine Störung des Wnt-Pathways auftreten könne. Diese könne sich in einer nukleären Expression von  $\beta$ -Catenin darstellen, weil der Abbau von  $\beta$ -Catenin aufgrund des fehlenden oder gestörten WTX-Proteins verhindert würde [Major et al. 2007].

Eine nukleäre Expression von  $\beta$ -Catenin kann man als Störung des Wnt-Pathways im weiteren Sinn ansehen. Ein Nachweis von  $\beta$ -Catenin im Zellkern findet sich in den untersuchten Fällen nur in Tumoren mit bekannter  $\beta$ -Catenin-Mutation und davon nur in der Stromakomponente in 60% der Fälle. Alle anderen Fälle zeigen eine als normal anzusehende Expression im Bereich der Zellmembran oder im Zytoplasma. Bei den Nephroblastomatosen war keine nukleäre Expression zu sehen.

Eine Veränderung der APC-Expression im Vergleich zur normalen Niere stellt sich in unserem Untersuchungsgut nicht heraus. Eine vermehrte nukleäre Expression, wie sie in einer weiteren Untersuchung zu finden ist [Maschietto et al. 2008], kann hier nicht bestätigt werden. Dieses ist möglicherweise damit zu erklären, dass einerseits bei den hier untersuchten Fällen ausschließlich Tumore mit einer WTX-Mutationen untersucht werden (über die Anzahl von

WTX-Mutationen liegen in der Publikation von [Maschietto et al. 2008] keine Angaben vor), andererseits können auch unterschiedlich sensitive immunhistochemische Nachweismethoden verwendet worden sein.

Mitf wird in der normalen Niere nicht exprimiert. Der Nachweis einer Mitf-Expression in einem kleiner Teil der untersuchten Fälle (in der Epithelkomponente in 6,1% der Fälle in der Stromakomponente in 13,5% der Fälle) könne ein Hinweis dafür sein, dass die Mitf-Expression in diesen Tumoren aktiviert wird und möglicherweise Ausdruck einer Störung des Wnt-Pathways darstellt.

Besonders interessant sind die Ergebnisse der Axin 2-Expression in den untersuchten Tumoren. In den Tumoren findet sich zwar überwiegend eine zytoplasmatische und auch membranständige Expression dieses Proteins, jedoch war zusätzlich in bis zu 45% der Fälle auch eine Kernexpression vorhanden. Man muss davon ausgehen, dass es zu einer Verlagerung des Axins in den Zellkern gekommen ist. Im Vergleich zwischen der Axin 2- und  $\beta$ -Catenin-Expression zeigt sich, dass eine starke Expression von  $\beta$ -Catenin in der Zellmembran mit einer schwachen Expression von Axin 2 im Zytoplasma einhergeht. Im Gegensatz dazu ist eine starke zytoplasmatische Axin 2-Expression häufig mit einer verminderten bzw. fehlenden Expression von  $\beta$ -Catenin verbunden. Bei den Tumoren mit starker Axin 2-Expression im Zytoplasma spricht die fehlende bzw. reduzierte  $\beta$ -Catenin-Expression für einen funktionierenden Abbauprozess des  $\beta$ -Catenins. Dieser findet anscheinend auch bei Anwesenheit eines mutierten WTX-Gens statt. Demgegenüber könne die nur schwache Axin 2-Expression bei starker Expression von  $\beta$ -Catenin für einen Verminderten Abbau des  $\beta$ -Catenins sprechen, der möglicherweise durch eine Störung der Axin 2-Funktion bedingt ist. Ob die WTX-Mutation dabei eine Rolle spielt, bleibt ungeklärt. Auch die bisher nicht beschriebene nukleäre Axin 2-Expression könne ein wichtiger Hinweis für eine Störung des Wnt-Pathways in Nephroblastomen zumindest mit WTX-Mutationen darstellen.

## 5 Ausblick

Die erhobenen Ergebnisse zeigen, dass der Wnt-Pathway in Nephroblastomen in den untersuchten Tumoren bei Vorhandensein einer WTX-Mutation Auffälligkeiten zeigt. Um die Ursachen für die Veränderungen besser verstehen zu können, sollten Mutationsanalysen des Axin 2-Gens in den Fällen mit einer nukleären Expression angeschlossen werden. Auch sollten die Untersuchungen auf Tumoren, die keine WTX-Mutation aufweisen, vergleichend ausgedehnt werden, um die Rolle von WTX im Wnt-Pathway bei Nephroblastomen besser zu verstehen.

## 6 Zusammenfassung und Schlussfolgerungen

Für die vorliegende Arbeit wurden 39 Nephroblastome hinsichtlich des Wnt-Pathways untersucht. In allen Fällen war im molekulargenetischen Referenzlabor der Nephroblastomstudie der Deutschen Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie (GPOH) in Würzburg (Leiter: Prof. Dr. M. Gessler) eine WTX-Mutation nachgewiesen. 5 Fälle wiesen zusätzlich auch eine  $\beta$ -Catenin-Mutation auf. Alle Tumoren wurden noch einmal nach der SIOP-Klassifikation für kindliche Nierentumoren untersucht. Die Tumorpräparate wurden nach einer primäre Chemotherapie reseziert. Alle SIOP-Stadien sowie Tumoren der sog. intermediären und hohen Risikogruppe waren in dem Untersuchungsgut enthalten. Eine Nephroblastomatose wurde bei 17 Präparaten nachgewiesen.

Primäres Ziel der Arbeit war es, immunhistochemische Marker zu finden, anhand derer man einen Wilms-Tumor von seiner Vorläuferläsion, der Nephroblastomatose, unterscheiden kann, um möglicherweise die Therapie anzupassen. Als eine Unterscheidungsmöglichkeit wurde der  $\beta$ -Catenin-Pathway angesehen, da einerseits Mutationen im  $\beta$ -Catenin-Gen in Nephroblastomen bekannt sind, andererseits WTX-Mutationen existieren. Ebenfalls wäre durch WTX eine Beeinflussung des Wnt-Pathways möglich, welche unterschiedlich zwischen Nephroblastomatosen und Wilms-Tumoren sein könnte.

Für diese Untersuchungen wurden immunhistochemische Untersuchungen mit Antikörpern gegen  $\beta$ -Catenin, Axin 2, APC und Mitf 2 durchgeführt und dann mikroskopisch ausgewertet. Es handelt sich hierbei um Komponenten des Wnt-Signalweges, die für die Zellproliferation

und -differenzierung verantwortlich sind. In anderen Tumoren werden diese Proteine teils schon als prognostische Marker eingesetzt.

Eine aberrante  $\beta$ -Catenin-Expression fand sich nur in Tumoren mit bekannter Mutation in diesem Gen. Interessanterweise zeigte sich die nukleäre Expression von  $\beta$ -Catenin in diesem Tumoren nur in 60% der Fälle und auch nur in der Stromakomponente des Wilms-Tumors. In allen anderen Tumoren wurde  $\beta$ -Catenin sowohl in der Epithelkomponente als auch im Blastem sowie im Stroma exprimiert, wobei eine membranbetonte Expression vermehrt in den epithelialen Anteilen zu sehen war. Dieser Unterschied zeigte sich auch in den verschiedenen Komponenten der Nephroblastomatose. Eine Abgrenzung zwischen Nephroblastom und Nephroblastomatose anhand der  $\beta$ -Catenin-Expression war nicht möglich.

Die Untersuchung der APC-Expression ergab, dass eine vermehrte membranständige Expression in den Tumoren vorlag. Eine nukleäre Expression, wie von anderen Autoren gefunden worden ist, konnte nicht gezeigt werden. Einen Unterschied zwischen den Nephroblastomen und Nephroblastomatosen fand sich nicht.

Ungewöhnlich war die nukleäre Expression von Axin 2 in einem größeren Teil der Tumore. Diese nukleäre Expression fand sich auch nur in den Nephroblastomen, jedoch nicht in den Nephroblastomatosen. Die Ursache dieser nukleären Expression blieb unklar, jedoch sprach das Fehlen der nukleären Expression in den Nephroblastomatosen für eine auf die Nephroblastome beschränkte Funktionsänderung dieses Proteins.

Mitf wurde in einem Teil der Tumoren exprimiert, obwohl dieses Protein physiologischerweise nicht in der Niere exprimiert wird bzw. mittels Immunhistochemie nicht nachweisbar war. Dieser Befund sprach dafür, dass in diesen Tumoren eine Aktivierung von Mitf vorlag und dies einer möglichen Störung des Wnt-Pathways entsprach.

Zusammenfassend zeigte sich, dass man mittels der untersuchten Proteine (mit Ausnahme einer nukleären Axin 2-Expression) zwischen Nephroblastomen und den Nephroblastomatosen als Vorläuferläsionen nicht sicher unterscheiden kann. Die Ergebnisse hatten aber Veränderungen in der Expression einzelner Proteine ergeben, die auf eine Störung des Wnt-Pathways in Nephroblastomen schließen lassen. Mittels molekulargenetischen Techniken müssten die Proteine codierenden Gene weiter untersucht werden.

## 7 Literaturverzeichnis

Barker und Clevers, 2000: (Hrsg.) N. Barker, H. Clevers: "Cateneins, wnt signaling and cancer", Bioessays, (2000), Aufl. 11 , Seite 961 - 965; Utrecht (Niederlande)

Beckwith, 1998: (Hrsg.) J.B. Beckwith: "Nephrogenic rests and the pathogenesis of Wilms tumor: developmental and clinical considerations", American journal of medical genetics, (1998), Aufl. 4 , Seite 268-273; Loma Linda (USA)

Behrens und Lustig, 2004: (Hrsg.) J. Behrens, B. Lustig: "The wnt connection to tumorigenesis", The International journal of developmental biology, (2004), Aufl. 5 - 6 , Seite 477 - 487; Erlangen (Deutschland)

Bhattacharya et al. 2005: (Hrsg.) B. Bhattacharya, H. P. Dilworth, C. Iacobuzio-Donahue, F. Ricci, K. Weber, M. A. Furlong, C. Fisher, E. Montgomery : "Nuclear beta-catenin expression distinguishes deep fibromatosis from other benign and malignant fibroblastic and myofibroblastic lesions", The American Journal of Surgical Pathology, (2005), Aufl. 5 , Seite 653 - 659; Baltimore (USA)

Bienz und Hamada, 2004: (Hrsg.) M. Bienz, F. Hamada: "Adenomatous polyposis coli proteins and cell adhesion", Current Opinion in Cell Biology, (2004), Aufl. 5 , Seite 528 - 535; Cambridge (UK)

Böcker et al. 2004: (Hrsg.) W. Böcker, H. Denk, P. U. Heitz (Beitrag von T. Stallmach): "40.7.2. Nephroblastom", Pathologie, (2004), Aufl. 3 , Seite 971; München (Deutschland)

Bratthauer, 2010: (Hrsg.) G. L. Bratthauer: "The avidin-biotin complex (ABC) method and other avidin-biotin binding methods", Methods in molecular biology, (2010), Aufl. , Seite 257 - 270; Washington (USA)

Caca et al. 1999: (Hrsg.) K. Caca, F.T. Kolligs, X. Ji, M. Hayes, J. Qian, A. Yahanda, D.L. Rimm, J. Costa, E.R. Fearon: "Beta- and gamma-catenin mutations, but not E-cadherin inactivation, underlie T-cell factor/lymphoid enhancer factor transcriptional deregulation in gastric and pancreatic cancer", Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research, (1999), Aufl. 6 , Seite 369 - 376; Ann Arbor (USA)

Carothers et al. 2001: (Hrsg.) A.M. Carothers, K.A. Jr. Melstrom, J.D. Mueller, M.J. Weyant, M.M. Bertagnolli: "Progressive changes in adherens junction structure during intestinal adenoma formation in Apc mutant mice", *The Journal of biological chemistry*, (2001), Aufl. 42 , Seite 39094 - 39102; New York (USA)

Cronin et al. 2009: (Hrsg.) J.C. Cronin, J. Wunderlich, S.K. Loftus, T.D. Prickett, X. Wei, K. Ridd, S. Vemula, A.S. Burell, N.S. Agrawal, J.C. Lin, C.E. Banister, P. Buckhaults, S.A. Rosenberg, B.C. Bastian, W.J. Pavan, Y. Samuels: "Frequent mutations in the MITF pathway in melanoma", *Pigment cell & melanoma research*, (2009), Aufl. 4 , Seite 435 - 444; Bethesda (USA)

Cullinane et al. 2003: (Hrsg.) C. J. Cullinane, S. A. Burchill, J. A. Squire, J. J. O'Leary, I. J. Lewis: "Wilms tumor (nephroblastoma)", *Molecular Biology and Pathology of Pediatric Cancer*, (2003), Aufl. 1 , Seite 218 - 225; New York (USA)

Cullinane et al. 2003: (Hrsg.) C. J. Cullinane, S. A. Burchill, J. A. Squire, J. J. O'Leary, I. J. Lewis: "Wilms tumor (nephroblastoma)", *Molecular Biology and Pathology Pediatric Cancer*, (2003), Aufl. 1 , Seite 218 - 225; New York (USA)

Davis et al. 2006: (Hrsg.) I.J. Davis, J.J. Kim, F. Oszolak, H.R. Widlund, O. Rozenblatt-Rosen, S.R. Granter, J. Du, J.A. Fletcher, C.T. Denny, S.L. Lessnick, W.M. Linehan, A.L. Kung, D.E. Fisher: "Oncogenic MITF dysregulation in clear cell sarcoma: defining the MiT family of human cancers", *Cancer Cell*, (2006), Aufl. 6 , Seite 473 - 484; Boston (USA)

Deka et al. 1999: (Hrsg.) J. Deka, P. Herter, M. Sprenger-Haußels, S. Koosch, D. Franz, K.-M. Müller, C. Kuhnen, I. Hoffmann, O. Müller: "The APC protein binds to A/T rich DNA sequences", *Oncogene*, (1999), Aufl. 41 , Seite 5654 - 5661; Dortmund (Deutschland)

Eklof Spink et al. 2001: (Hrsg.) K. Eklof Spink, S.G. Fridman, W.I. Weis: "Molecular mechanisms of beta-catenin recognition by adenomatous polyposis coli revealed by the structure of an APC-beta-catenin complex", *The EMBO journal*, (2001), Aufl. 22 , Seite 6203 - 6212; Stanford (USA)

Fagotto et al. 1999: (Hrsg.) F. Fagotto, E. Jho, L. Zeng, T. Kurth, T. Joos, C. Kaufmann, F. Costantini: "Domains of axin involved in protein-protein interactions, Wnt pathway inhibition, and intracellular localization", *The Journal of cell biology*, (1999), Aufl. 4 , Seite 741 - 756; Tübingen (Deutschland)



Fu et al. 2008: (Hrsg.) X. Fu, J. Li, K. Li, X. Tian, Y. Zhang: "Hypermethylation of APC promotor 1 A is associated with moderate activation of Wnt signalling pathway in a subset of colorectal serrated adenomas", *Histopathology*, (2008), Aufl. 5 , Seite 554 - 563; Guangzhou (China)

Fukuzawa et al. 2004: (Hrsg.) R. Fukuzawa, R. W. Heathcott, M. Sano, I. M. Morison, K. Yun, A. E. Reeve: "Myogenesis in Wilms` tumors is associated with mutations of the WT1 gene and activation of Bcl-2 and the Wnt signaling pathway", *Pediatric and developmental pathology: the official journal of the Society for Pediatric Pathology and Paediatric Pathology Society*, (2004), Aufl. 7 , Seite 125 - 137; Dunedin (Neuseeland)

Fukuzawa et al. 2010: (Hrsg.) R. Fukuzawa, S.K. Holman, C.W. Chow, R. Savarirayan, A.E. Reeve, S.P. Robertson: "WTX mutations can occur both early and late in the pathogenesis of Wilms tumour", *Journal of medical genetics*, (2010), Aufl. - , Seite -; Dunedin (Neuseeland)

Gooding et al. 2004: (Hrsg.) J.M. Gooding, K.L. Yap, M. Ikura: "The cadherin-catenin complex as a focal point of cell adhesion and signalling: new insights from three-dimensional structures", *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, (2004), Aufl. 5 , Seite 497 - 511; Toronto (Kanada)

Gumbiner, 1997: (Hrsg.) B. M. Gumbiner: "Carcinogenesis: A balance between Beta-catenin and APC", *Current Biology*, (1997), Aufl. 7 , Seite R443 - R446; New York (USA)

Harris und Nelson, 2010: (Hrsg.) E.S. Harris, W.J. Nelson: "Adenomatous polyposis coli regulates endothelial cell migration independent of roles in beta-catenin signaling and cell-cell adhesion", *Molecular biology of the cell*, (2010), Aufl. 15 , Seite 2611 - 2623; Stanford (USA)

Hart et al. 1998: (Hrsg.) M. J. Hart, R. de los Santos, I. N. Albert, B. Rubinfeld, P. Polakis: "Downregulation of beta-catenin by human Axin and its association with the APC tumor suppressor, beta-catenin and GSK3beta", *Current biology*, (1998), Aufl. 10 , Seite 573 - 581; Richmond (USA)

Hennigar et al. 2001: (Hrsg.) R. A. Hennigar, P. A. O`Shea, J. D. Grattan-Smith: "Clinopathologic features of nephrogenic rests and nephroblastomatosis", *Advances in anatomic pathology*, (2001), Aufl. 5 , Seite 276 - 289; Atlanta (USA)

Hsu et al. 1981: (Hrsg.) S. M. Hsu, L. Raine, H. Fanger: "The use of antiavidin antibody and avidin-biotin-peroxidase complex in immunoperoxidase technics", *American journal of clinical pathology*, (1981), Aufl. 6 , Seite 816 - 821; USA

Huang und He, 2008: (Hrsg.) H. Huang, X. He: "Wnt/beta-catenin signaling: new (and old) players and new insights", *Current opinion in cell biology*, (2008), Aufl. 2 , Seite 119 - 125; Boston (USA)

Internet 1: (Hrsg.) <http://www.pathologie-online.de/meth/immunhisto.php#3>: "3.3.5 Die Avidin-Biotin-Methoden", *Methoden und Untersuchungstechniken in der Pathologie: Immunhistologie*

Kadoya et al. 2000: (Hrsg.) T. Kadoya, S. Kishida, A. Fukui, T. Hinoi, T. Michiue, M. Asashima und A. Kikuchi: "Inhibition of wnt signaling pathway by a novel axin-binding protein", *Journal of Biological Chemistry*, (2000), Aufl. 47 , Seite 37030 - 37037; Hiroshima (Japan)

Kawahara et al. 2000: (Hrsg.) K. Kawahara, T. Morishita, T. Nakamura, F. Hamada, K. Toyoshima, T. Akiyama: "Down-regulation of beta-catenin by the colorectal tumor suppressor APC requires association with Axin and beta-catenin", *The Journal of biological chemistry*, (2000), Aufl. 12 , Seite 8369 - 8374; Tokyo (Japan)

Kikuchi, 1999: (Hrsg.) A. Kikuchi: "Roles of Axin in the Wnt signalling pathway", *Cellular signalling*, (1999), Aufl. 11 , Seite 777 - 788; Hiroshima (Japan)

King et al. 1999: (Hrsg.) R. King, K.N. Weilbaecher, G. McGill, E. Cooley, M. Mihm, D.E. Fisher: "Microphthalmia transcription factor. A sensitive and specific melanocyte marker for MelanomaDiagnosis", *The American journal of pathology*, (1999), Aufl. 3 , Seite 731 - 738; Albany (USA)

Kishida et al. 1999: (Hrsg.) S. Kishida, H. Yamamoto, S. Hino, S. Ikeda, M. Kishida, A. Kikuchi: "DIX domains of Dvl and axin are necessary for protein interactions and their ability to regulate beta-catenin stability", *Molecular and cellular biology*, (1999), Aufl. 6 , Seite 4414 - 4422; Hiroshima (Japan)

Koesters et al. 1999: (Hrsg.) R. Koesters, R. Ridder, A. Kopp-Schneider, D. Betts, V. Adams, F. Niggli, J. Briner, M. von Knebel Doeberitz: "Mutational activation of the beta-catenin proto-oncogene is a common event in the development of Wilms' tumors", *Cancer research*, (1999), Aufl. 16 , Seite 3880 - 3882; Heidelberg (Deutschland)

Koesters et al. 2003: (Hrsg.) R. Koesters, F. Niggli, M.v. Knebel Doeberitz, T. Stallmach : "Nuclear accumulation of beta-catenin protein in Wilms' tumours", *The Journal of pathology*, (2003), Aufl. 1 , Seite 68 - 76; Heidelberg (Deutschland)

Leung et al. 2002: (Hrsg.) J. Y. leung, F. T. Kolligs, R. Wu, Y. Zhai, R. Kuick, S. Hanash, K. R. Cho, E. R. Fearon: "Activation of Axin 2 expression by beta-catenin-T cell factor. A feedback repressor pathway regulating Wnt signaling", *The Journal of biological chemistry*, (2002), Aufl. 24 , Seite 21657 - 21665; Ann Arbor (USA)

Levy et al. 2006: (Hrsg.) C. Levy, M. Khaled, D.E. Fisher: "MITF: master regulator of melanocyte development and melanoma oncogene", *Trends in molecular medicine*, (2006), Aufl. 9 , Seite 406 - 414; Boston (USA)

Lonergan et al. 1998: (Hrsg.) G. J. Lonergan, M. I. Martínez-León, G. A. Agrons, H. Montemarano, E. S. Suarez: "Nephrogenic rest, nephroblastomatosis, and associated lesions of the kidney", *Radiographics: a review publication of the Radiological Society of North America*, (1998), Aufl. 4 , Seite 947 - 968; Washington (USA)

Maiti et al. 2000: (Hrsg.) S. Maiti, R. Alam, C.I. Amos, V. Huff: "Frequent association of beta-catenin and WT1 mutations in Wilms tumors", *Cancer research*, (2000), Aufl. 22 , Seite 6288 - 6292; Houston (USA)

Major et al. 2007: (Hrsg.) M.B. Major, N.D. Camp, J.D. Berndt, X. Yi, S.J. Goldenberg, C. Hubbert, T.L. Biechele, A.-C. Gingras, N. Zheng, M.J. MacCross, S. Angers, R.T. Moon: "Wilms tumor suppressor WTX negatively regulates WNT/beta-catenin signaling", *Science (New York, N.Y.)*, (2007), Aufl. 5827 , Seite 1043 - 1046; Seattle (USA)

Maschietto et al. 2008: (Hrsg.) M. Maschietto, B. de Camargo, H. Brentani, P. Grundy, S.T. Sredni, C. Torres, L.D. Mota, I.W. Cunha, D.F. Patrao, C.M. Costa, F.A. Soares, R.R. Brentani, D.M. Carraro: "Molecular profiling of isolated histological components of wilms tumor implicates a common role for the Wnt signaling pathway

in kidney and tumor development", *Oncology*, (2008), Aufl. 1-2 , Seite 81 - 91; Sao Paulo (Brasilien)

Massalme, 2004: (Hrsg.) S. Massalme: "26.8.2. Nephroblastom", *Crashkurs Pathologie: Repititorium zum Gegenstandskatalog 3 mit Einarbeitung der wichtigsten Prüfungsfakten*, (2004), Aufl. 1 , Seite 262; München (Deutschland)

Miao et al. 2002: (Hrsg.) J. Miao, T. Kusafuka, Y. Udatsu, A. Okada: "Axin, the main component of the Wnt signaling pathway, is not mutated in kidney tumors in children", *International journal of molecular medicine*, (2002), Aufl. 4 , Seite 377 - 379; Suita (Japan)

Midgley et al. 1997: (Hrsg.) C.A. Midgley, S. White, R. Howitt, V. Save, M.G. Dunlop, P.A. Hall, D.P. Lane, A.H. Wyllie, V.J. Bubb: "APC expression in normal human tissues", *The Journal of pathology*, (1997), Aufl. 4 , Seite 426 - 433; Dundee (U.K.)

Miettinen et al. 2001: (Hrsg.) M. Miettinen, M. Fernandez, K. Franssila, Z. Gatalica, J. Lasota, M. Sarlomo-Rikala: "Microphthalmia transcription factor in the immunohistochemical diagnosis of metastatic melanoma: comparison with four other melanoma markers", *The American journal of surgical pathology*, (2001), Aufl. 2 , Seite 205 - 211; Washington (USA)

Miller et al. 2004: (Hrsg.) A.J. Miller, J. Du, S. Rowan, C.L. Hershey, H.R. Widlund, D.E. Fisher: "Transcriptional regulation of the melanoma prognostic marker melastatin (TRPM1) by MITF in melanocytes and melanoma", *Cancer research*, (2004), Aufl. 2 , Seite 509 - 516; Boston (USA)

Monga, 2009: (Hrsg.) S. P. Monga: "Role of Wnt/beta-catenin signaling in liver metabolism and cancer", *The international journal of biochemistry and cell biology*, (2009), Aufl. , Seite ; Pittsburgh (USA)

Nakamura et al. 1998: (Hrsg.) T. Nakamura, F. Hamada, T. Ishidate, K. Anai, K. Kawahara, K. Toyoshima, T. Akiyama: "Axin, an inhibitor of the Wnt signalling pathway, interacts with beta-catenin, GSK-3beta and APC and reduces the beta-catenin level", *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms*, (1998), Aufl. 6 , Seite 395 - 403; Suita (Japan)

Polakis, 2000: (Hrsg.) P. Polakis: "Wnt signaling and cancer", *Genes & development*, (2000), Aufl. 15 , Seite 1837 - 1851; San Francisca (USA)

Ramburan et al. 2005: (Hrsg.) A. Ramburan, F. Oladiran, C. Smith, G.P. Hadley, D. Govender: "Microsatellite analysis of the adenomatous polyposis coli (APC) gene and immunoexpression of beta catenin in nephroblastoma: a study including 83 cases treated with preoperativ chemotherapy", Journal of clinical pathology, (2005), Aufl. 1 , Seite 44 - 50; Durban (South-Africa)

Ruteshouser et al. 2008: (Hrsg.) E.C. Ruteshouser, S.M. Robinson, V. Huff: "Wilms tumor genetics: mutations in WT1, WTX, and CTNNB1 account for only about one-third of tumors", Genes, chromosomes & cancer, (2008), Aufl. 6 , Seite 461 - 470; Houston (USA)

Saito et al. 2003: (Hrsg.) H. Saito, K. Yasumoto, K. Takeda, K. Takahashi, H. Yamamoto, S. Shibahara: "Microphthalmia-associated transcription factor in the Wnt signaling pathway", Pigment cell research, (2003), Aufl. 3 , Seite 261 - 265; Sendai (Japan)

Schepsky et al. 2006: (Hrsg.) A. Schepsky, K. Bruser, G. J. Gunnarsson, J. Goodall, J. H. Hallsson, C. R. Goding, E. Steingrimsson, A. Hecht: "The microphthalmia-associated transcription factor Mitf interacts with beta-catenin to determine target gene", Molecular and cellular biology, (2006), Aufl. 23 , Seite 8914 - 8927; Reykjavik (Island)

Seidensticker und Behrens, 2000: (Hrsg.) M. J. Seidensticker, J. Behrens: "Biochemical interactions in the wnt pathway", Biochimica et biophysica acta, (2000), Aufl. 2 , Seite 168 - 182; Berlin (Deutschland)

Senda et al. 2005: (Hrsg.) T. Senda, A. Shimomura, A. Iizuka-Kogo: "Adenomatous polyposis coli (APC) tumor suppressor gene as a multifunctional gene", Anatomical science international / Japanese Association of Anatomists, (2005), Aufl. 3 , Seite 121 - 131; Toyoake (Japan)

Shibahara et al. 2001: (Hrsg.) S. Shibahara, K. Takedo, K. Yasumoto, T. Uono, K. Watanabe, H. Saito, K. Takahashi: "Microphthalmia-associated transcription factor (MITF): multiplicity in structure, function, and regulation", The journal of investigative dermatology, (2001), Aufl. 1 , Seite 99 - 104; Sendai (Japan)

SIOP, 2001/ GPOH: (Hrsg.) Studienleiter N. Graf: "Therapieoptimierungsstudie zur Behandlung von Kindern und Jugendlichen mit einem Nephroblastom", International

Society of Paediatric Oncology/ Gesellschaft für pädiatrische Onkologie und Hämatologie, (2003), Aufl. 2.0 , Seite 31 - 49; Homburg/ Saar (Deutschland)

Steingrimsson et al. 2004: (Hrsg.) E. Steingrimsson, N.G. Copeland, N.A. Jenkins: "Melanocytes and the microphthalmia transcription factor network", Annual review of genetics, (2004), Aufl. - , Seite 365 - 411; Reykjavik (Island)

Sun, 2009: (Hrsg.) Y. C. Sun: "Examination of effects of GSK3beta phosphorylation, beta-catenin phosphorylation, and beta-catenin degradation on kinetics of Wnt signaling pathway using computational method", Theoretical biology and medical modelling, (2009), Aufl. , Seite 13; Taipei (Taiwan)

Takayasu et al. 2001: (Hrsg.) H. Takayasu, H. Horie, E. Hiyama, T. Matsunaga, Y. Hayashi, Y. Watanabe, S. Suita, M. Kaneko, F. Sasaki, K. Hashizume, T. Ozaki, K. Furuuchi, M. Tada, N. Ohnuma, A. Nakagawara: "Frequent deletions and mutations of the beta-catenin gene are associated with overexpression of cyclin D1 and fibronectin and poorly differentiated histology in childhood hepatoblastoma", Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research, (2001), Aufl. 4 , Seite 901 - 908; Chiba (Japan)

Thomas et al. 1996: (Hrsg.) C. Thomas, P. Schmitz-Moormann, G. Gebert: "8.3. Nephroblastische Tumoren", Spezielle Pathologie, (), Aufl. 1 , Seite 364; Stuttgart (Deutschland)

Thomas, 1993: (Hrsg.) C. Thomas: "8.1.7.4. Nephroblastische Tumoren", Makropathologie: Lehrbuch und Atlas für die Kurse der allgemeinen und speziellen Pathologie, (1993), Aufl. 8 , Seite 208 - 209; Stuttgart (Deutschland)

Tycko et al. 2007: (Hrsg.) B. Tycko, C.M. Li, R. Buttyan: "The Wnt/beta-catenin pathway in Wilms tumors and prostate cancers", Current molecular medicine, (2007), Aufl. 5 , Seite 479 - 489; New York (USA)

Wegert et al. 2009: (Hrsg.) J. Wegert, S. Wittmann, I. Leuschner, E. Geissinger, N. Graf, M. Gessler: "WTX inactivation is a frequent, but late event in Wilms tumors without apparent clinical impact", Genes, chromosomes & cancer, (2009), Aufl. 12 , Seite 1102 - 1111; Würzburg (Deutschland)

Yang et al. 2010: (Hrsg.) L.H. Yang, H.T. Xu, Y. Han, Q.C. Li, Y. Liu, Y. Zhao, Z.Q. Yang, Q.Z. Dong, Y. Miao, S.D. Dai, E.H. Wang: "Axin downregulates TCF-4

transcription via beta-catenin, but not p53, and inhibits the proliferation and invasion of lung cancer cells", *Molecular cancer*, (2010), Aufl. , Seite 25; Shenyang (China)

Yasumoto et al. 2002: (Hrsg.) K. Yasumoto, K. Takeda, H. Saito, K. Watanabe, K. Takahashi, S. Shibahara: "Microphthalmia-associated transcription factor interacts with LEF-1, a mediator of Wnt signaling", *The EMBO journal*, (2002), Aufl. 11 , Seite 2703 - 2714; Sendai (Japan)

Zavala-Pompa et al. 2001: (Hrsg.) A. Zavala-Pompa, A.L. Folpe, R.E. Jimenez, S.D. Lim, C. Cohen, J.N. Eble, M.B. Amin: "Immunohistochemical study of microphthalmia transcription factor and tyrosinase in angiomyolipoma of the kidney, renal cell carcinoma, and renal and retroperitoneal sarcomas: comparative evaluation with traditional diagnostic markers", *The American journal of surgical pathology*, (2001), Aufl. 1 , Seite 65 - 70; Monterrey (Mexiko)

## 8 Danksagungen

Meinem Doktorvater Herr Prof. Dr. Ivo Leuschner möchte ich für die freundliche Überlassung des hochinteressanten Themas und für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes herzlich danken. Ich verdanke ihm darüber hinaus, jede erdenkliche, hilfreiche Unterstützung und viele anregende Diskussionen. Jede Phase wurde von ihm intensiv, professionell und mit vielen Tipps begleitet. Sein kompetenter Rat und seine Hilfe kamen mir in zahlreichen Angelegenheiten sehr zu gute und waren ausschlaggebend für die erfolgreiche Fertigstellung der Arbeit.

Ich möchte auch ganz herzlich Herrn Prof. Dr. M. Gessler aus Würzburg danken, den ich zwar nie persönlich kennen lernen durfte, der aber für die Vorauswahl und genetische Untersuchung meiner Präparate verantwortlich ist und im Rahmen seiner SIOP-Studie den Grundstein meiner Arbeit legte und diese dadurch maßgebend beeinflusste.

Mein besonderer Dank gilt auch dem Team um Silvia Iwersen und Sabine Roggenbrodt für die Anfertigung meiner Schnitte und Färbungen, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Das Team hat die Grundlage und zwingende Voraussetzung zur Auswertung der Ergebnisse geliefert. Durch großes Engagement und viel Fleiß lagen alle Präparate in kürzester Zeit vor.

Für den Zugang zur Bibliothek des Instituts, um mich über äußere Form, Aufbau, Inhalt und Schreibweise einer Doktorarbeit informieren konnte, danke ich Dagmar Schmöe.

Besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir das Studium der Humanmedizin ermöglichten und mir auch während der Anfertigung der Doktorarbeit immer unterstützend und liebevoll zu Seite standen. Ganz besonders bedanke ich mich, dass sie immer das Beste für mich und meine Schwester tun und alles Erdenkliche bereit sind, dafür zu geben. Ich danke natürlich auch meiner Schwester Christin Borchert, dass sie immer für mich da ist und ich sie jederzeit um Rat oder Mithilfe bitten kann.



Ganz großer Dank geht an meinen Ehemann Christian Kamke. Seine Liebe bedeutet mir unbeschreiblich viel. Herzlichen Dank für jedwede Unterstützung und den großen Beistand, den er jederzeit zu geben bereit ist. Ohne ihn wären mein Studium und diese Arbeit nie zu einem erfolgreichen Ende gekommen.

Ich danke auch meiner lieben Freundin Esther Burger, die in liebevolle Kleinarbeit die Arbeit gelesen hat und so entscheidend an der Form beteiligt war. Sie stand mir immer mit Rat und Tat zur Seite und motivierte mich, die Hindernisse zu bewältigen. Ich danke auch all meinen weiteren Freunden, besonders Sarah Jäger und Julia Bremer, für die Geduld und Ruhe, womit sie mir stets zur Seite standen und mich immer wieder aufgemuntert haben.

## 9 Lebenslauf

### Angaben zur Person

---

Geburtsdatum und -ort	02.01.1986 in 39576 Stendal
Familienstand	verheiratet
Staatsangehörigkeit	deutsch

### Ausbildung

---

1992 - 1996	Grundschule Ludwig Uhland in 39307 Genthin
1996 - 2005	Bismarck-Gymnasium Genthin mit Abschluss Allgemeine Hochschulreife
seit 10.2005	Studium der Humanmedizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel - Vorklinik mit Abschluss 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung / 1. Staatsexamen am 21.08.2007 - Klinik mit Abschluss 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung / 2. Staatsexamen am 18.10.2011
27.10.2011	Approbation als Ärztin
31.10.2011	Exmatrikulation an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

### Berufliche Praktika

---

#### Krankenpflegepraktikum:

06.03. - 04.04.2006	Johanniter Krankenhaus Genthin-Stendal gGmbH, Klinik für Innere Medizin
01.08. - 29.09.2006	Johanniter Krankenhaus Genthin-Stendal gGmbH, Chirurgische Klinik

#### Famulaturen:

03.03. - 01.04.2008	Ernst-von-Bergmann-Klinikum Potsdam, Institut für Pathologie
25.08. - 23.09.2008	Ernst-von-Bergmann-Klinikum Potsdam, Klinik für Pädiatrie
23.02. - 24.03.2009	Praxis für Allgemeinmedizin Dipl. med. C. Abendroth, Genthin
14.09. - 13.10.2009	Zentrum für Integrative Psychiatrie (ZIP gGmbH) Kiel, Klinik für Kinder- und Jugendpsychiatrie und -psychotherapie

#### Praktisches Jahr:

30.08. - 19.12.2010	Spital Netz Bern, Spital Ziegler, Orthopädische und Chirurgische Klinik
20.12.10 - 10.04.11	Gemeinschaftspraxis Dr. I. Ramm und C. Grunwald, Kiel

11.04. - 31.07.2011 UKSH Schleswig-Holstein, Campus Kiel, Klinik für Innere Medizin

### **Dissertation**

---

2009 - 2014 UKSH Schleswig-Holstein, Campus Kiel, Institut für Pathologie bei Prof. Dr. med. I. Leuschner  
„Differenzierung der Komponenten des Wilms-Tumor im Kinder- und Jugendalter von den Komponenten der Nephroblastomatose“

### **Beruflicher Werdegang**

---

01.01. - 01.09 2012 Assistenzärztin mit Weiterbildung zur Fachärztin für Allgemeinmedizin in der Asklepios Klinik Nord Hamburg, Medizinische Geriatrie im Zentrum für Ältere  
seit 01.09.2012 Assistenzärztin mit Weiterbildung zur Fachärztin für Allgemeinmedizin in der Geriatrie der Asklepios Klinik Wandsbek, Hamburg

### **Sonstiges**

---

Fremdsprachen Englisch (9 Jahre Schulkenntnisse)  
Französisch (4 Jahre Schulkenntnisse)  
Latein mit Abschluss Kleines Latinum (3 Jahre Schulkenntnisse)  
Aktivitäten Fotografieren  
Fertigkeiten Sicherer Umgang mit SAP  
Beginn der Sonographieausbildung

Hamburg, den 22.05.2014

## 10 Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten und nicht veröffentlichten Schriften entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit ist in gleicher oder ähnlicher Form oder auszugsweise im Rahmen einer anderen Prüfung noch nicht vorgelegt worden.

Hamburg, den 22.05.2014

---

Stephanie Kamke