

## 7 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit konnten auf molekularer Ebene neue Erkenntnisse über die Pathomechanismen, die zur Entstehung einer Untergruppe von stromareichen Wilms Tumoren mit *CTNNB1*- und *WT1*-Mutationen führen, gewonnen werden. Im Mittelpunkt stand dabei die Rolle des *CTNNB1*-Protoonkogens, das durch Mutationen stabilisiert wird und dadurch zur Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs führt.

Zu Beginn war bekannt, dass somatische Mutationen des *CTNNB1*-Gens in etwa 15% der Wilms Tumoren auftreten, häufig assoziiert mit Mutationen des *WT1*-Genlokus vorliegen und eine Zellkern-Translokation des *CTNNB1*-Proteins zur Folge haben. Um dies zu bestätigen, wurden verschiedene molekulare Analysen auf DNA- und Protein-Ebene durchgeführt. Durch die *CTNNB1*-Mutationsanalyse an Gesamt Tumor-DNA eines großen Wilms Tumor -Patientenkollektivs und die Ausdehnung auf mikrodissizierte Tumorareale verschiedener histologischer Zelltypen konnten die molekularen Grundlagen von *CTNNB1*-Mutationen in Wilms Tumoren ermittelt werden. Dabei waren folgende Ergebnisse von besonderem Interesse für die Tumorentstehung:

- 1.) *CTNNB1*-Mutationen, die Exon 3 des Gens betreffen, stellen mit einer Mutationsrate von 30% ein häufiges Ereignis während der Entwicklung von Wilms Tumoren dar.
- 2.) In Wilms Tumoren besteht eine zu 100% invariable Assoziation von *WT1*-Mutationen mit *CTNNB1*-Mutationen, die bei der Entstehung von Tumoren mit stromareicher und triphasischer Histologie durch eine Kooperation entscheiden beteiligt sind, aber in anderen histologischen Untergruppen eine untergeordnete Rolle spielen.
- 3.) Die genetische Heterogenität der *CTNNB1*-Mutationen beweist die Multifokalität dieser Tumoren molekular und zeigt, dass Tumorzellen mit *WT1*-Funktionsverlust einem starken Selektionsdruck für *CTNNB1*-Mutationen ausgesetzt sind.

Weitere Untersuchungen zur subzellulären Lokalisierung von *CTNNB1* und zur Expression der *CTNNB1*- und *WT1*-Proteine in Wilms Tumoren mit und ohne *CTNNB1*- und *WT1*-Mutationen erbrachten neue Einblicke in die Mechanismen, die der Entstehung dieser Wilms Tumoren zugrunde liegen. Die im Vergleich zu den stark *WT1*-exprimierenden blastem- und epithelreichen Tumoren festgestellte schwache oder abwesende Expression des *WT1*-Proteins zusammen mit einer starken *CTNNB1*-Expression in stromareichen Tumoren bestätigte den *WT1*-Funktionsverlust und die Stabilisierung von *CTNNB1* in diesen Tumorzellen. Die *CTNNB1*-Stabilisierung führt über eine Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs zur kontinuierlichen Zell-Proliferation und verhindert den Mesenchym-Epithel-Übergang während der Nierenentwicklung. Daraufhin findet in den Tumorzellen eine fehlregulierte mesenchymale Differenzierung, vor allem zu Rhabdomyoblasten statt.

Die für die Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs notwendige Translokation von CTNNB1 in den Zellkern konnte in dieser Arbeit nur in einigen stromareichen Wilms Tumoren mit CTNNB1-Mutation festgestellt werden. Dies führte zu der Vermutung, dass die nukleäre Lokalisation von CTNNB1 nicht die direkte Konsequenz einer Mutation in CTNNB1 ist, sondern erst über weitere genetische, epigenetische oder Umwelt-Einflüsse zur Zellkern-Translokation führen kann.

Es konnten erstmals Langzeitkulturen von Wilms Tumoren mit Keimbahn-WT1- und CTNNB1-Mutationen für funktionelle Studien an Tumoren dieser Untergruppe etabliert werden. Anhand dieser *in vitro* Modellsysteme konnten weitere bedeutsame Einblicke in die Auswirkungen von WT1 und einem deregulierten Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg auf die Tumorigenese erlangt werden. Die Charakterisierung der Tumorzellen zeigte, dass die Zellen sehr frühen mesenchymalen Nierenvorläufer-Zellen entsprechen und über einen aktiven Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg verfügen. Die Transkriptionsprofile der Tumorzellen offenbarten eine große Ähnlichkeit zu mesenchymalen Stammzellen. Dies bestätigte, dass die Tumorentstehung von stromareichen Wilms Tumoren auf die Transformation einer mesenchymalen Stammzelle zurückzuführen ist, und dass die etablierten Zellkultursysteme noch viele Stammzell-Charakteristika besitzen. Unter den Tumor-spezifischen Genen befanden sich viele an wichtigen Prozessen der Tumorprogression, z.B. Proliferation, Metastasierung, Angiogenese, Signaltransduktion und Transkriptionskontrolle beteiligte Gene. Der Vergleich der Tumor-Expressionsprofile untereinander identifizierte die Gene, die spezifisch in einem der drei Tumoren mit verschiedenen CTNNB1- und/oder WT1-Mutationen dereguliert wurden. Neben vielen mit dem Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg in Verbindung stehenden Genen, wurden hier einige Nieren- und Muskel-spezifische Gene, Regulatoren von Tumor-Proliferation, -Progression und -Metastasierung, sowie Gene, die auf eine frühe Entwicklungsstörung hinweisen, gefunden. In MD305- und 3082-Zellen fanden sich außerdem Anhaltspunkte für eine Interaktion des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs mit anderen Signalwegen, z.B. dem RAS- und Hh-Signalweg. Durch gezielte Inhibierung der CBP-abhängigen CTNNB1/TCF-vermittelten Transkription wurden neue putative Zielgene des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs in Wilms Tumoren identifiziert. In den Promotorsequenzen von 86% dieser potentiellen Zielgene konnten TCF-Bindestellen gefunden werden. Dies sprach für eine direkte CTNNB1/TCF-vermittelte Regulation der Kandidatengene, die zu den funktionellen Gruppen Metabolismus, Zellzyklus, Differenzierung und Organogenese, sowie Tumorentstehung und -Progression gehörten. Inwieweit es sich dabei tatsächlich um physiologische Zielgene handelt, muss in der Zukunft weiter untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde die ChIP-Methode etabliert, mit der die bekannten Wnt/ $\beta$ -Catenin-Zielgene *Cyclin D1* und *DKK1* über physikalische Bindung ihrer Promotorsequenzen an CTNNB1 als direkte CTNNB1/TCF-Zielgene in Wilms Tumoren bestätigt werden konnten.

Letztendlich wurden Hinweise auf eine Negativregulation von CTNNB1 durch Wildtyp-WT1 gefunden. Durch die Transfektion von Wildtyp-WT1 in HEK293-Zellen konnte eine Herunterregulation der CTNNB1-mRNA beobachtet werden.