

Aus dem Institut für Pathologie
der Medizinischen Fakultät Mannheim
(Direktor: Prof. Dr. med. Alexander Marx)

Inhibition/*Knock-down* und Stimulation des kanonischen WNT/ β -Catenin-
Signalweges im Rhabdomyosarkom

Inauguraldissertation
zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades
der
Medizinischen Fakultät Mannheim
der Ruprecht-Karls-Universität
zu
Heidelberg

vorgelegt von
Florian Viehweger

aus
Chemnitz
2018

Dekan: Herr Prof. Dr. med. Sergij Goerd
Referent: Herr Prof. Dr. med. Alexander Marx

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	1
1 EINLEITUNG	2
1.1 Rhabdomyosarkom (RMS)	2
1.1.1 Klassifikation der RMS.....	2
1.1.2 Embryonale RMS (ERMS).....	3
1.1.3 Alveoläre RMS (ARMS)	3
1.2 Muskuläre Entwicklung und Differenzierung	4
1.2.1 Allgemeine Entwicklung der Muskulatur im Embryo	4
1.2.2 Molekulargenetische Grundlage der Myogenese	5
1.2.3 PAX- und MRF-Expression im RMS.....	6
1.3 Die Funktion des kanonischen WNT/β-Catenin-Signalweges in der Muskelentwicklung	6
1.3.1 Struktur des β -Catenin.....	7
1.3.2 Der kanonische WNT-Signalweg.....	7
1.3.3 β -Catenin als Protoonkogen	10
1.3.4 Die Bedeutung des kanonischen WNT/ β -Catenin-Signalweges für die Myogenese.....	10
1.3.5 Der kanonische WNT/ β -Catenin-Signaltransduktionsweg bei RMS ..	11
1.4 Ziel der Arbeit	11

2.2.4.1	Zellkultivierung für RNA-Isolation	23
2.2.4.2	Bestimmung der RNA-Konzentration und -Reinheit	23
2.2.4.3	Reverse Transkription – cDNA Synthese	24
2.2.4.4	Real-Time-quantitative-PCR (RTQ-PCR)	24
2.2.4.5	Relative Quantifizierung der qRT-PCR-Produkte	25
2.2.5	Proteinisolierung und Verarbeitung.....	26
2.2.5.1	Proteinisolierung.....	26
2.2.5.2	SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blotting	26
2.2.5.3	Immunologischer Proteinnachweis	28
2.2.6	Indirekte Immunfluoreszenz der kultivierten Zellen.....	29
2.2.7	Durchflusszytometrie	30
2.2.7.1	Annexin V/Propidiumiodid-Färbung.....	30
2.2.8	Statistische Auswertung	30
3	ERGEBNISSE	31
3.1	Inhibierung des kanonischen β-Catenin-Signalweges.....	31
3.1.1	Einfluss der pharmakologischen WNT/ β -Catenin-Inhibitoren FH535 und XAV939 auf die Proliferation von RMS-Tumorzellen	31
3.1.2	Einfluss eines spezifischen β -Catenin <i>Knock-down</i> auf die Proliferation von RMS-Tumorzellen.....	34
3.1.3	Einfluss der pharmakologischen Inhibitoren und der siRNA auf die Proteinexpression von β -Catenin	34
3.2	Stimulation des kanonischen WNT-Signaltransduktionsweges durch WNT3A.....	36
3.2.1	Einfluss von WNT3A auf die Proliferation von RMS-Tumorzellen	36
3.3	Einfluss einer simultanen Stimulation und Inhibierung auf RMS-Tumorzellen	37
3.4	Migrationsverhalten der RMS-Zellen	39

3.4.1	Zellmigration unter Inhibition mit FH535 und XAV939	39
3.4.2	Zellmigration unter Stimulation mit WNT3A	41
3.4.3	Zellmigration unter simultaner Inhibition und Stimulation.....	42
3.5	Auswirkung einer Inhibition und Stimulation des kanonischen WNT/β-Catenin-Signaltransduktionsweges auf die Apoptose.....	44
3.6	Auswirkung der Stimulation und Inhibierung des kanonischen WNT/β-Catenin-Signaltransduktionsweges auf die Expression muskuläre Differenzierungsgene.....	46
3.6.1	Inhibition und β -Catenin- <i>Knock-down</i>	46
3.6.2	Stimulation des kanonischen WNT-Signalweges mittels WNT3A.....	49
4	DISKUSSION	52
4.1	Die Inhibierung des kanonischen WNT/β-Catenin-Signalweges hat keinen Effekt auf das Wachstum und die Differenzierung von RMS-Tumorzellen	53
4.2	Der kanonische WNT/β-Catenin-Signalwege ist in RMS-Tumorzellen aktivierbar	54
4.3	Die Stimulation des kanonischen β-Catenin-Signalweges hat keinen Einfluss auf die myogene Differenzierung oder Proliferation der verwendeten RMS- Zelllinien.....	55
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	58
6	VERÖFFENTLICHUNGSNACHWEIS	59
7	LITERATURVERZEICHNIS.....	60

8 TABELLARISCHER ANHANG.....	71
9 LEBENSLAUF	72
10 DANKSAGUNG	73

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

APC	Adenomatous-polyposis-coli
ARMS	Alveoläres Rhabdomyosarkom
CKM	Kreatin-Kinase, M-Typ
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA/DNS	Desoxyribonukleinsäure
ERMS	Embryonales Rhabdomyosarkom
fAchR	fetaler Acetylcholinrezeptor
FBS	Fetales-Bovines-Serum
FKHR	Forkhead Protein
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GSK3	Glykogensynthase-Kinase 3
HRP	Horseradish-Peroxidase
IG	Immunglobulin
IGF2	Insulin-like Growth Factor 2
LEF	Lymphoid enhancer Factor
LRP	Lipoprotein Receptor-Related Protein
MRF	Myogene Regulationsfaktoren
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid
MUSK	Muskelspezifische Rezeptor-Tyrosinkinase
MyF5	Myogener Faktor 5
MyoD	Myogener Faktor 3
NF-κB	Nuclear Factor 'Kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
PAX	Paired-box-Gene
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RMS	Rhabdomyosarkom
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
SDS	Sodium dodecyl sulfate
siRNA	Small interfering RNA
TBS	Tris-buffered Saline
TCF	T-Zell Faktor
WHO	World Health Organisation

1 EINLEITUNG

1.1 Rhabdomyosarkom (RMS)

1854 beschrieb C. O. Weber in Bonn eine Neubildung quergestreifter Muskelfasern, die 92 Jahre später mit dem Begriff „Rhabdomyosarkom“ (griechisch: rhabdos= der Stab, mys=Muskel, sárx=Fleisch, -om=Tumor) belegt wurde^{1, 2}.

Rhabdomyosarkome (RMS) sind die mit einem Anteil von rund 60% häufigsten malignen Weichgewebstumoren im Kindesalter³. Die jährliche Inzidenzrate liegt bei 5,4 Fällen pro eine Million Kinder/Jugendliche. Betroffen sind vorrangig Kinder im Alter zwischen 0-14 Jahren, mit einem Häufigkeitsgipfel um das 5. Lebensjahr^{4, 5}. Ein Zusammenhang zwischen exogenen Risikofaktoren, wie dem fetalen Alkohol-/Hydantoin-Syndrom, einer intrauterinen Strahlenexposition oder dem Marihuana- und Kokainmissbrauch der Eltern wird vermutet⁶. Weiterhin wurde ein gehäuftes Vorkommen bei familiären Syndromen, wie den Neurofibromatosen und dem Li-Fraumeni-Syndrom beobachtet^{7, 8}.

1.1.1 Klassifikation der RMS

Nach neuer WHO-Klassifikation (2013) teilt man RMS in 4 Subtypen auf, die sich histologisch, therapeutisch und prognostisch zum Teil deutlich voneinander unterscheiden⁹. Bei Kindern spielen praktisch nur die sogenannten embryonalen bzw. alveolaren Rhabdomyosarkome (ERMS bzw. ARMS) eine Rolle (Tabelle 1.1). Die vor allem im Erwachsenenalter vorkommenden pleomorphen und spindelzell-/sklerosierenden RMS sind selten und wurden in der vorliegenden Arbeit nicht berücksichtigt.

Tabelle 1.1: ERMS und ARMS: Häufigkeit und Lokalisation bei Kindern¹⁰⁻¹³

Subtyp	Histologie	Häufigkeit (aller RMS)	Lokalisation
Embryonale RMS (ERMS)	kleine Spindelzellen mit eosinophilem Zytoplasma	~ 60%	Kopf-Hals-Region, Urogenitaltrakt
Alveoläre RMS (ARMS)	undifferenzierte, pleomorphe Zellen mit fibrösen Septen	~ 25%	Extremitäten, Rumpf

Die genaue Ätiologie der RMS ist, wie die vieler anderer Weichgewebstumoren, nicht eindeutig geklärt. Da sich RMS unabhängig von quergestreifter Muskulatur entwickeln und überall im Körper vorkommen können, werden als Ursprungszellen mesenchymale Stammzellen vermutet^{10, 14}. Weiterführende Hypothesen ordnen verschiedenen RMS Subtypen unterschiedliche Ursprungszellen zu, was die hohe Tumorheterogenität erklären könnte (Kapitel 1.1.1)¹⁵. Dabei scheinen für embryonale RMS myogene Vorläuferzellen eine wichtige Rolle zu spielen, wohingegen bei alveolären RMS mesenchymale Stammzellen im Mittelpunkt der Forschung stehen¹⁶.

1.1.2 Embryonale RMS (ERMS)

ERMS stellen mit rund 60% den häufigsten Subtyp aller Rhabdomyosarkome dar und treten vorrangig bei Kindern <10 Jahre im Kopf-Hals-Bereich (Orbita und Nasopharynx) und im Bereich des Urogenitaltraktes auf^{11, 17}. Im Gegensatz zu ARMS zeigt dieser Subtyp keine typischen Translokationen (siehe Kapitel 1.1.3). Vielmehr sind ERMS durch eine genetische Instabilität charakterisiert, die zahlreiche *losses and gains of functions* beinhaltet^{18, 19}. Im Gegensatz zu ARMS metastasieren ERMS erst spät und haben daher im Allgemeinen eine bessere Prognose. Die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt bei nicht metastasierten ERMS bis zu 88%^{17, 20}.

1.1.3 Alveoläre RMS (ARMS)

Im Vergleich zu ERMS weisen die oft früh metastasierenden ARMS ein wesentlich schlechteres Überleben auf, mit 5-Jahres-Überlebensraten (nach Metastasierung) von nur 30%^{17, 21}. Charakteristisch für ARMS ist eine chromosomale reziproke

Translokation zwischen einem *PAX*-Gen (*PAX3* oder *PAX7*) und dem *FKHR*-Gen (*fork head in rhabdomyosarcoma*) auf Chromosom 13²². Die wesentlich häufigere Translokation macht mit 70% die Fusion von *PAX3* (auf Chromosom 2) und *FKHR* aus (t(2; 13)(q35; q14)), während lediglich 10% auf die balancierte Translokation zwischen *PAX7* (auf Chromosom 1) und *FKHR* entfallen (t(1; 13)(p36; q14)). Das Fusionsprotein beider Translokationen (*PAX3/FKHR* bzw. *PAX7/FKHR*) besteht aus der DNA-Bindungsdomäne des *PAX*-Gens und der Transaktivierungsdomäne des *FKHR*-Gens²³. Dieses Protein bewirkt eine stärkere Aktivierung der Transkription als die ursprünglichen Produkte der einzelnen Gene und nimmt Einfluss auf Proliferation, Wachstumsgeschwindigkeit und Invasivität der ARMS^{24, 25}. Inzwischen sind weitere verwandte, allesamt sehr seltene Translokationen beschrieben worden, wie z.B. t(2; 2)(q35; p23), die ein Fusionsprotein zwischen *PAX3* und *NCOA1* (*Nuclear Receptor Coactivator 1*) erzeugt²⁶.

Zudem unterscheidet man noch ARMS ohne nachweisbare Translokation, jedoch histopathologischer ARMS-Charakteristik, die die restlichen 10-20% ausmachen und deren Metastasierungsneigung und genetische Charakteristika eher denen der ERMS gleichen²⁷⁻²⁹.

1.2 Muskuläre Entwicklung und Differenzierung

Die Pathogenese von RMS Tumoren ist bis heute nicht eindeutig geklärt. Aufgrund der unterschiedlichen Charakteristika von ERMS und ARMS Tumoren scheinen die Subtypen unterschiedlichen Stadien der Muskelentwicklung zu entsprechen (siehe Kapitel 1.1.2 und 1.1.3)³⁰.

1.2.1 Allgemeine Entwicklung der Muskulatur im Embryo

Die Entwicklung der quergestreiften Muskulatur im Embryo beginnt etwa ab dem 18. Tag nach Befruchtung (Konzeption) der Eizelle. Ausgehend von der medial gelegenen Chorda dorsalis führt die Sekretion verschiedener Signalmoleküle zur Anlage sogenannter Ursegmente, der Somiten, aus denen dorsolateral das Dermatomyotom hervorgeht³¹. Die weitere Entwicklung der myogenen Vorläuferzellen zu Myoblasten und letztlich Muskelzellen erfordert die Expression zweier Transkriptionsfaktoren, *PAX3* und *PAX7*, die für die Aufrechterhaltung des myogenen Potentials und das Überleben der muskulären Vorläuferzellen verantwortlich sind³². Dabei spielt *PAX3* eine übergeordnete Rolle bei der

Entwicklung der Muskulatur, während eine *PAX7* Expression vorrangig bei Satellitenzellen nachgewiesen wurde. Satellitenzellen sind ruhende Myoblasten bzw. adulte Muskelstammzellen, die für die Muskelregenerierung benötigt werden³³. Im weiteren Verlauf der Myogenese induzieren *PAX3* bzw. *PAX7* die Expression von MRFs (myogene Regulationsfaktoren), welche die Differenzierung, Determination, Proliferation und Migration der muskulären Vorläuferzellen regulieren³³⁻³⁶.

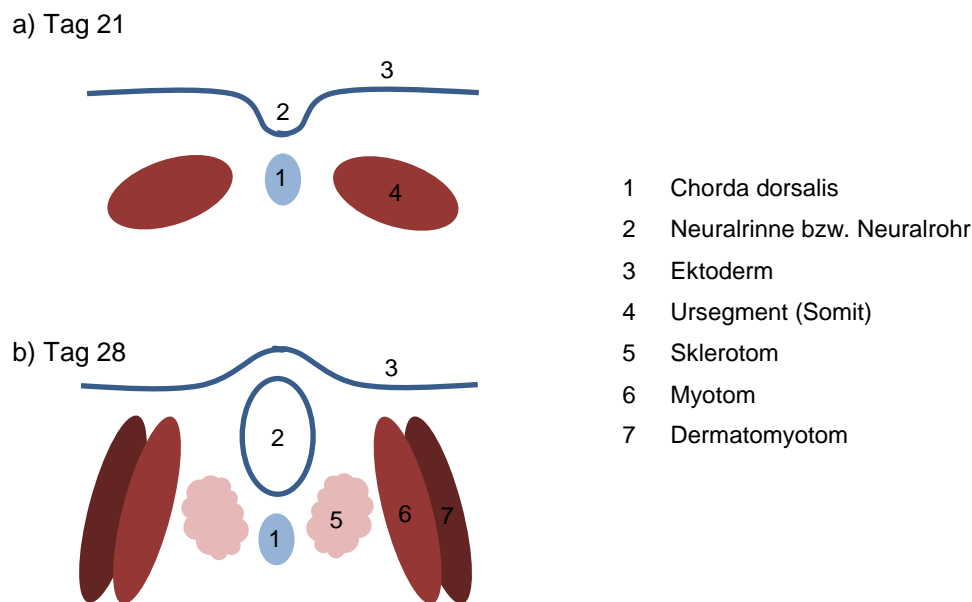


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der Entwicklung der Myotome (6) aus den paarigen Ursegmenten (4) unter molekularer Stimulation der Chorda dorsalis (1) und des Neuroektoderms (2)³⁷.

1.2.2 Molekulargenetische Grundlage der Myogenese

MRF sind eine Familie von Transkriptionsfaktoren, zu denen MYF5, MyoD, Myogenin und MRF4 zählen^{34, 38}. Besonders MyoD und MYF5 sind für die Differenzierung der myogenen Vorläuferzellen zu Myoblasten notwendig³⁵. Wie essentiell die beiden Faktoren für die Entwicklung sind, konnte anhand von MYF5/MyoD-Doppel-*knock-out*- Mäuse nachgewiesen werden, die keinerlei Muskulatur entwickeln und kurz nach der Geburt sterben³⁹. Im weiteren Verlauf der Myogenese induzieren Myogenin und MRF4 die Differenzierung der Myoblasten in vielzellige Myotuben, aus denen sich letztlich Muskelzellen (Myozyten) entwickeln^{40, 41}. Im gleichen Maße, wie die Expression der MRFs während der muskulären Differenzierung zunimmt, nimmt die Expression der beiden Homöoboxgene *PAX3* und *PAX7* ab⁴².

Phase	Proliferation	Determination	Differenzierung
Zelltyp	<i>Myogene Vorläuferzelle</i>	<i>Myoblast</i>	<i>Myotube/Myozyt</i>
MYF5	[Expression bar from Proliferation to end of Differenzierung]		
MyoD	[Expression bar from Proliferation to end of Differenzierung]		
Myogenin	[Expression bar from Determination to end of Differenzierung]		
MRF4	[Expression bar from Proliferation to end of Proliferation]	[Expression bar from Determination to end of Differenzierung]	
PAX3	[Expression bar from Proliferation to end of Proliferation]		
PAX7		[Expression bar from Determination to end of Differenzierung]	

Abbildung 1.2: Zeitlich schematische Darstellung der Expression der Regulationsfaktoren während der Myogenese^{35, 43}

1.2.3 PAX- und MRF-Expression im RMS

Im translokationspositiven ARMS (*PAX3/FKHR* bzw. *PAX7/FKHR*) werden je nach Translokation die Transkriptionsfaktoren *PAX3* bzw. *PAX7* exprimiert^{27, 28}. Die verstärkte Expression der beiden Homöoboxgene bedingt einen verminderten Differenzierungsstatus⁴⁴. Dabei reprimieren die Fusionsprodukte *PAX3-* und *PAX7-FKHR* direkt die Expression und Aktivität von muskulären Differenzierungsgenen wie *MYOD*^{45, 46}. Die Aktivierung des NFκB-Signaltransduktionsweges induziert zusätzlich die Proliferation der Tumorzellen⁴⁷. Neben den Fusionsprodukten bei translokationspositiven ARMS, konnte bei translokationsnegativen ARMS und ERMS ebenfalls die Expression der beiden Homöoboxgene *PAX3* und *PAX7* nachgewiesen werden⁴⁸. Da ERMS hauptsächlich *PAX7* exprimieren, vermutet man als Ursprungszelle für ERMS myogene Satellitenzellen, während ARMS zusätzlich späte Marker der Myogenese, wie Myogenin, sehr stark exprimieren^{49, 50}.

1.3 Die Funktion des kanonischen WNT/β-Catenin-Signalweges in der Muskelentwicklung

Der kanonische WNT/β-Catenin-Signalweg (siehe Kapitel 1.3.2) beeinflusst Zell-Zell-Interaktionen und die Embryogenese und steht auch in Zusammenhang mit der Tumorprogression vieler Karzinome (z.B. Kolorektales Karzinom, Hepatozelluläres Karzinom oder Lungenkarzinom)^{51, 52}.

1.3.1 Struktur des β -Catenin

β -Catenin gehört zur Familie der Armadillo-Proteine. Zentrales Element dieser Proteingruppe ist eine sich wiederholende, 42 Aminosäure lange Sequenz, die als ‚*armadillo repeat*‘ bezeichnet wird⁵³. Etwa 12 Wiederholungen bilden das Kernelement des β -Catenin-Proteins, die ‚*armadillo domain*‘ (ARM) (siehe Abbildung 1.3) die als Bindestelle für verschiedene Proteine, z.B. E-cadherin, AXIN, APC (Adenomatous-Polyposis-Coli) oder die Transkriptionsfaktoren TCF/LEF dient (siehe Kapitel 1.3.2)⁵⁴⁻⁵⁸. N- und C-terminales Ende des β -Catenin-Proteins unterscheiden sich sowohl strukturell als auch funktionell von der zentralen ARM-Domain. Am N-terminalen Ende des Proteins befindet sich eine Bindestelle für die E3-Ubiquitin-Ligase-TrCP1 (β -TrCP E3), die β -Catenin ubiquitinieren und zum proteasomalen Abbau markieren kann⁵⁹. Voraussetzung hierfür ist eine vorherige Phosphorylierung der Aminosäuren Serin (33/37/45) oder Threonin (41) durch die Glykogen Synthase Kinase 3 (GSK3) und die Casein Kinase 1 (CK1)^{60, 61}. Das C-terminale Ende des Proteins scheint für die Bindung verschiedener Koaktivatoren während der Transkription von Zielgenen des WNT-Signalweges verantwortlich zu sein⁶².

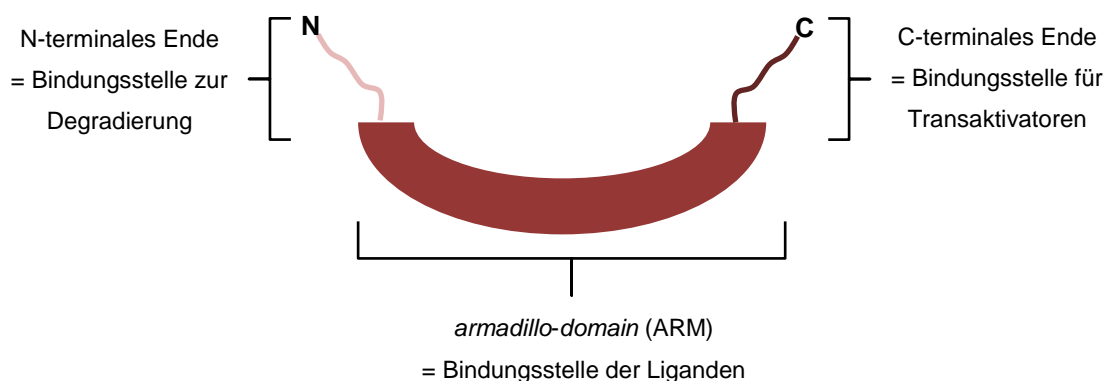


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung des β -Catenin mit der konvexen Außen- und konkaven Innenform der ARM-Region und den funktionell unterschiedlichen C- und N-terminalen Enden^{56, 63}.

1.3.2 Der kanonische WNT-Signalweg

Ausgangselement dieses Signalweges ist das zwischen verschiedenen Spezies hoch konservierte Glykoprotein WNT (Wingless-related integration site)^{64, 65}. Die Familie der WNT-Proteine umfasst aktuell 19 Mitglieder. Die WNT-Moleküle können an eine Reihe von G-Protein gekoppelten Transmembran-Rezeptoren binden, die als Frizzled-Rezeptoren (FZ) bezeichnet werden und von denen aktuell 11 bekannt sind.

Die Aktivierung des kanonischen β -Catenin/WNT-Signaltransduktionsweges ist dabei abhängig von der Kombination aus WNT-Molekül (WNT1, WNT2, WNT3, WNT8A, WNT8B, WNT10A, WNT10B) und FZ-Rezeptor sowie weiterer Korezeptoren, wie LRP-5/6 (*lipoprotein receptor-related protein*) oder RTK (Rezeptor-Tyrosinkinase)⁶⁶⁶⁷. Nach erfolgter Aktivierung bindet das Phosphorprotein Dishevelled (Dsh) an den FZ-Rezeptor und verändert die Stabilität des sogenannten β -Catenin-Destruktionskomplexes⁶⁸. Bei fehlendem WNT-Signal wird β -Catenin N-terminal durch die beiden Mitglieder des Destruktionskomplexes, GSK3 und CK1 phosphoryliert, ubiquitiniert und zur proteasomalen Degradierung freigesetzt (siehe Abbildung 1.4, 1A-1C)⁵². Dies verhindert die Akkumulation des β -Catenin im Zytoplasma und die Translokation in den Zellkern⁶⁹. Bei vorhandenem WNT-Signal wird Axin, ebenfalls ein Protein des Destruktionskomplexes, an Dsh gebunden und der Komplex in Richtung Zellmembran verschoben⁷⁰. Der Korezeptor LRP-5/6 sorgt dafür, dass die GSK3- und CK1-Aktivität gehemmt wird, wodurch β -Catenin nicht mehr phosphoryliert und für die Degradierung markiert werden kann. Als Folge akkumuliert β -Catenin im Zytoplasma und wandert bei entsprechender Konzentration in den Zellkern, wo es durch die Interaktion mit den Transkriptionsfaktoren TCF/LEF (*T-cell factor/lymphoid enhancing factor*) die Transkription von β -Catenin-Zielgenen induziert (siehe Abbildung 1.4, 2A-2C)^{71, 72}. Zu den Zielstrukturen des β -Catenin/TCF/LEF-Komplexes gehören unter anderem spezifische Gene, die für Proteine des kanonischen WNT-Signalweges, wie Axin, Frizzled7, β -TrCP oder LEF/TCF⁷³⁻⁷⁶ kodieren, aber auch eine Vielzahl von Proteinen, die während der Proliferation (Cyclin D1, cMyc, VEGF und FGF) eine Rolle spielen. Eine konstitutive Aktivierung des kanonischen β -Catenin/WNT-Signaltransduktionsweges, unter anderem durch Überexpression oder Mutation von β -Catenin, trägt dadurch nachweislich zur Progression vieler Karzinome bei (siehe Kapitel 1.3.3)⁷⁷⁻⁸¹.

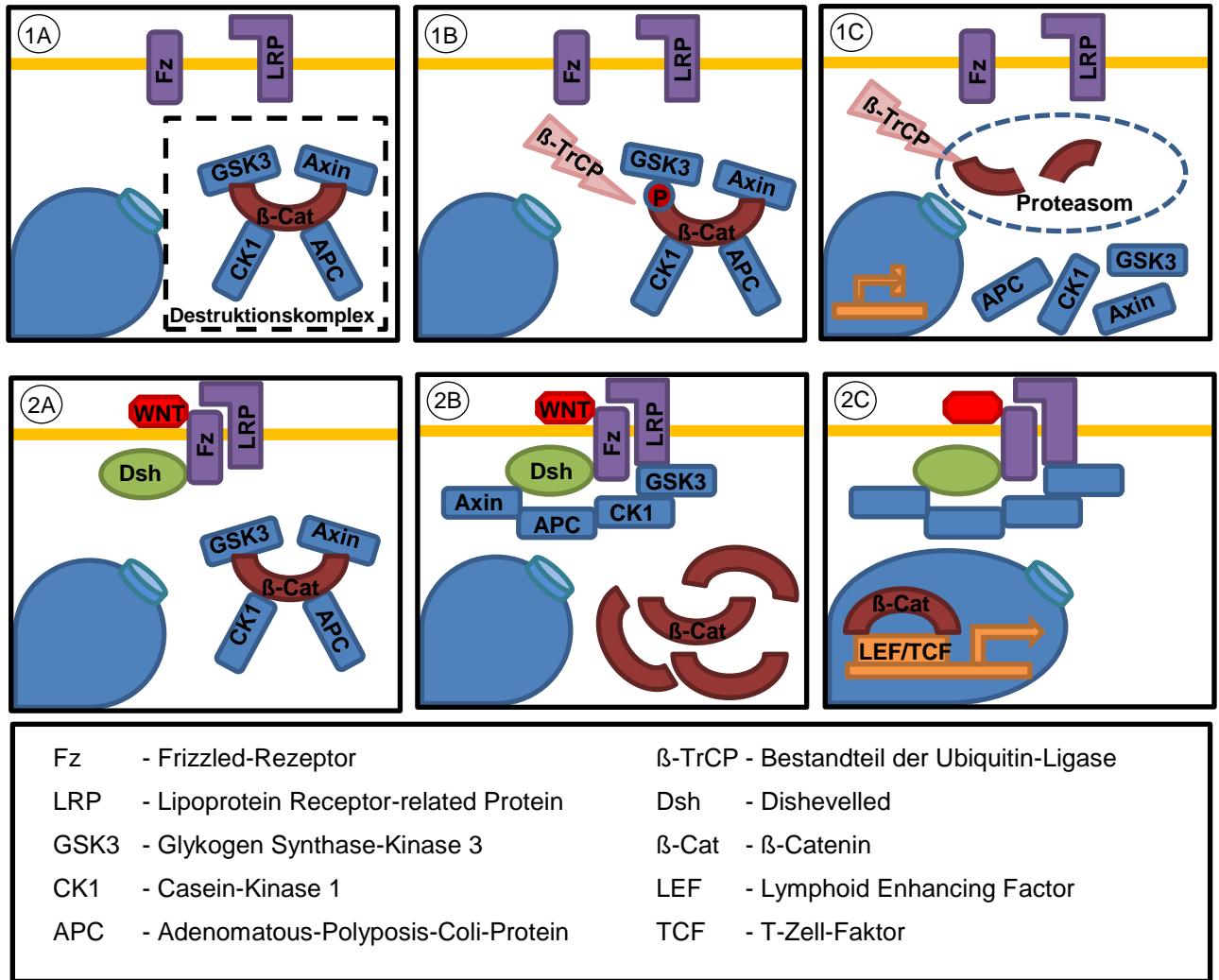


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung des kanonischen WNT-Signalweges ohne Stimulation (1A-1C) und unter Stimulation mit WNT (2A-2C)⁶⁸:

1A: Ohne WNT-Stimulation wird der Destruktionskomplex stabilisiert;

1B: β-Catenin wird N-terminal durch die GSK3 und CK1 phosphoryliert und für den Abbau markiert;

1C: β-Catenin wird proteosomally gespalten;

2A: Nach Stimulation durch WNT kommt es zur Bindung des Rezeptors (Fz) mit dem Korezeptor (LRP) und dem Vermittler-Protein (Dsh);

2B: Der Destruktionskomplex wird zum Rezeptorkomplex hin verschoben und β-Catenin akkumuliert im Zytoplasma;

2C: Nach Translokation von β-Catenin in den Zellkern wird die Transkription von Zielgenen durch die Interaktion mit LEF/TCF initiiert.

1.3.3 β -Catenin als Protoonkogen

Viele Tumorerkrankungen, wie z.B. kolorektale und hepatozelluläre Karzinome sowie Ovarialkarzinome sind mit einer konstitutiven Aktivierung des kanonischen WNT/ β -Catenin-Signalweges assoziiert⁸²⁻⁸⁴. In den meisten Fällen ist eine Mutation des β -Catenin-Gens ursächlich, welche die N-terminalen Anteile des Proteins verändert und die Degradation verhindert, wodurch β -Catenin im Zytoplasma, auch ohne Stimulation durch WNT, akkumuliert und letztlich in den Zellkern gelangt⁸⁵. Dadurch werden β -Catenin-Zielproteine, wie Cyclin D1 und cMyc, ohne Stimulation exprimiert. Proliferation und Wachstum des Tumors werden so unterstützt⁸⁶. Weiterhin können inaktivierende Mutationen bei Proteinen des Destruktionskomplexes, wie APC, den Abbau von β -Catenin vermindern⁸⁷. In den meisten Tumoren gilt die Überexpression von β -Catenin bzw. der verminderte Abbau des Proteins als klassischer onkogener Mechanismus, wodurch Proliferation und Metastasierung der Tumorzellen vorangetrieben werden^{88, 89}.

1.3.4 Die Bedeutung des kanonischen WNT/ β -Catenin-Signalweges für die Myogenese

Während der Embryogenese ist die Expression des β -Catenin essentiell für die Entwicklung der drei Keimblätter (Ektoderm, Mesoderm und Entoderm) und im weiteren Verlauf auch für die Bildung der Muskulatur⁹⁰. Wie bereits in Kapitel 1.2.1 beschrieben ist die Initiierung der Myogenese im paraxialem Mesoderm abhängig von der Stimulation umliegender Gewebe (Neuralrohr, Chorda dorsalis, dorsales Ektoderm) und der Expression spezifischer myogener Regulationsfaktoren (*PAX* und *MRF*, Kapitel 1.2.3)^{91, 92}. WNT-Glykoproteine, speziell WNT1 und WNT3A⁹³, führen zur Aktivierung des kanonischen WNT/ β -Catenin-Signalweges, der bereits in der frühen Phase der Myogenese detektiert werden kann, noch bevor andere Regulationsfaktoren, wie MYF5 oder MyoD, exprimiert werden⁹⁴. Bei Blockierung des kanonischen WNT-Signalweges ist die Expression von MYF5, einem der ersten myogenen Marker während der Muskelentwicklung, stark reduziert⁹⁵. Auch der Transkriptionsfaktor MyoD wird durch WNT-Glykoproteine reguliert. Einerseits ist *MYOD* ein direktes Zielgen des kanonischen β -Catenin-Signalweges, kann aber auch über den nicht-kanonischen WNT-Signalweg aktiviert werden^{96, 97}. Die Aktivität und die nukleäre Lokalisation des β -Catenin sind essentiell für den Eintritt der myogenen Vorläuferzellen in die skelettmuskelspezifische Differenzierung⁹⁸.

Postnatal findet in den mesenchymalen bzw. muskulären Stammzellen bei Aktivierung des kanonischen WNT-Signalweges ebenfalls eine muskuläre Differenzierung der Zellen statt^{99, 100}.

1.3.5 Der kanonische WNT/ β -Catenin-Signaltransduktionsweg bei RMS

Die Rolle des kanonischen WNT-Signalweges bei RMS ist bis heute nicht eindeutig geklärt. In anderen embryonalen Tumoren, wie dem Neuroblastom, dem Wilms-Tumor oder dem Hepatoblastom sind aktivierende Mutationen im *CTNNB1*-Gen mit einer schlechteren Prognose assoziiert¹⁰¹⁻¹⁰³. Für RMS sind lediglich zwei Fälle mit *CTNNB1*-Mutationen bekannt (beide ERMS), die zudem mit einem besseren Überleben für die Patienten assoziiert waren¹⁰⁴. Bei einem *in vivo* RMS-Mausmodell, mit *p53/c-fos* doppel-mutierten Mäusen, wurde eine Überexpression von Inhibitoren des kanonischen WNT-Signalweges (sFRP2, sFRP4, Dkk1, Nkd1)¹⁰⁵ nachgewiesen. Weiterhin spricht die überwiegende zytoplasmatische bzw. membranständige Lokalisation des β -Catenin bei RMS-Tumoren¹⁰⁶ dafür, dass der kanonische WNT/ β -Catenin-Signalweg bei RMS inaktiv ist. Bei Stimulierung des kanonischen WNT-Signalweges hingegen wurde eine erhöhte Expression myogener Regulationsfaktoren (MyoD, MYF5 oder Myogenin) bei ARMS Zelllinien nachgewiesen¹⁰⁷. In einer anderen Arbeit wurde zudem gezeigt, dass die Aktivierung des kanonischen WNT-Signalweges die Proliferation bei ERMS-Zelllinien reduziert¹⁰⁸. Die derzeitigen Forschungsergebnisse lassen darauf schließen, dass der kanonische WNT-Signalweg in RMS-Zellen aktivierbar ist, allerdings möglicherweise unterdrückt wird und seine Aktivierung einen antionkogenen Effekt haben könnte¹⁰⁹.

1.4 Ziel der Arbeit

Um die molekularen Mechanismen der RMS-Tumorentstehung oder deren Inhibierung als Voraussetzung neuer therapeutischer Ansätze besser zu verstehen, war es Ziel der vorliegenden Arbeit, mittels aktivierender und inhibierender pharmakologischer und siRNA-basierter Interventionen den Einfluss des kanonischen WNT/ β -Catenin-Signaltransduktionsweges auf Proliferation, Migration, Differenzierung und Apoptose an prototypischen RMS-Zelllinien *in vitro* zu untersuchen.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Die in der Arbeit verwendeten Geräte und Verbrauchsmaterialien sind im Anhang aufgelistet.

2.1.2 Antikörper

Alle in der Arbeit verwendeten Primärantikörper sind in Tabelle 2.1. und alle Sekundärantikörper in Tabelle 2.2 aufgelistet.

Tabelle 2.1: Primärantikörper

Antigen	Spezies (Klon)	Bezugsquelle
β-Aktin	mouse anti-human	Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA
β-Catenin	mouse anti-human	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

Tabelle 2.2: Sekundärantikörper

Antigen	Spezies (Klon)	Markierung	Bezugsquelle
IgG	goat anti-mouse	HRP	Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA
IgG	goat anti-mouse	TR (Texas Red)	Molecular Probes, Eugene, OR, USA

2.1.3 Kits

Folgende Kits wurden im Verlauf der Arbeit verwendet und sind in Tabelle 2.3 dargestellt.

Tabelle 2.3: Kits

Kit	Bezugsquelle
RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Scientific; Waltham, MA, USA
DyNAmo ColorFlash SYBR Green qPCR Kit	Thermo Scientific; Waltham, MA, USA
Super Signal West Dura Chemiluminescent Substrat	Thermo Scientific; Waltham, MA, USA

2.1.4 Zelllinien

In Tabelle 2.4 sind die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zelllinien und deren Kultivierungsbedingungen aufgelistet.

Tabelle 2.4: Zelllinien

Typ	Beschreibung	Kultivierungsmedium	Bezugsquelle
CRL2061	ARMS	RPMI/10% FBS	ATCC*, Menasses, VA, USA
FLOH1	ARMS	RPMI/10% FBS	Olgahospital, Stuttgart, Deutschland
RD	ERMS	DMEM/10% FBS	ATCC*, Menasses, VA, USA
L-WNT3A	Fibroblasten (Maus)	DMEM/10% FBS/ G-418 (0,4 mg/ml)	ATCC* CRL-2647, Menasses, VA, USA
L-Zellen	Fibroblasten (Maus)	DMEM/10% FBS	ATCC* CRL-2648, Menasses, VA, USA

*American Type Culture Collection

2.1.5 Zellkulturmedien

Für die Kultivierung der oben genannten Zellkulturen wurden die in Tabelle 2.5 genannten Medien und Reagenzien verwendet.

Tabelle 2.5: Zellkulturmedien

Medium/Reagenz	Bezugsquelle
DMEM (+4,5 g/L Glucose, + L-Glutamine, + Pyruvat)	Gibco, Carlsbad, CA, USA
RPMI 1640 (+ L-Glutamine)	Gibco, Carlsbad, CA, USA
WNT3A-Medium	Eigenherstellung*
L-Zell-Medium	Eigenherstellung*
FBS	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
PBS	Eigenherstellung
Trypsin-EDTA (0.05%)	Gibco, Carlsbad, CA, USA
Geneticin (G-418)	Gibco, Carlsbad, CA, USA

*Überstand nach Kultivierung der WNT3A-/L-Zellen

2.1.6 WNT/ β -Catenin-Inhibitoren

Die in Tabelle 2.6 aufgelisteten WNT/ β -Catenin-Inhibitoren wurden in vorliegender Arbeit verwendet.

Tabelle 2.6: WNT/ β -Catenin-Inhibitoren

Inhibitor	Bezugsquelle
FH535	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
XAV939	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA

2.1.7 Primer

Für die quantitative-Real-Time PCR (qRT-PCR) wurden die in Tabelle 2.7 aufgelisteten Primer eingesetzt.

Tabelle 2.7: Real-Time-quantitative-PCR Primer

Bezeichnung	Forward Primer-Sequenz	Reverse Primer-Sequenz
AXIN2	GCCAACGACAGTGAGATATCC	CTCGAGATCAGCTCAGCTGCA
CHRNA	GCGCTGGAGAAGCTAGAGAA	CACCAGGAACCACTCCTCAT
CKM	TGGTGTGGGTGAACGAGGAGGAT	AACTTGGGGTGCTTGCTCAGGTG
CTNNB	GAAACGGCTTTCAGTTGAGC	CTGGCCATATCCACCAGAGT
DESMIN	CATCGCGGCTAAGAACATTT	GCCTCATCAGGGAATCGTTA
GAPDH	TGCACCACCAACTGCTTAGC	GGCATGGACTGTGGTCATGAG
MYOGENIN	CCAGGGGATCATCTGCTCAC	CTGTGATGCTGTCCACGATG

2.1.8 siRNA

Für die siRNA-Experimente wurde kommerziell erhältliche siRNA der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) gemäß den Herstellerangaben verwendet.

Tabelle 2.8: siRNA der Firma Qiagen

siRNA	Ziel-Sequenz	Katalog Nr.
CTNNB1	CTC GGG ATG TTC ACA ACC GAA	SI02662478
AllStars negativ Kontroll-siRNA (scrambled)	firmenseitig keine Angabe	SI1027280

2.1.9 Proteingrößenbestimmung

Für die Bestimmung der Proteingrößen (Molekulargewichte) wurde die PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder eingesetzt (Fermentas, St. Leon-Roth, Deutschland).

2.1.10 Sonstige Reagenzien

Weitere verwendete Reagenzien sind in Tabelle 2.9 dargestellt.

Tabelle 2.9: Sonstige Reagenzien

Reagenz	Bezugsquelle
Acrylamid (Rotiporese® Gel 30)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
DMSO (Rotipuran® ≥99,8%)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Guanidine Hydrochlorid (G418)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
SYBR Green	Thermo Scientific; Waltham, MA, USA
TEMED	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
TRIZOL®	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Trypanblau	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivierung von Säugerzellen

2.2.1.1 Allgemeines Prinzip

Die adhärennten Zelllinien (Rhabdomyosarkom- und Fibroblastenzellen) werden im CO₂-Inkubator bei einer Temperatur von 37°C und einer CO₂-Konzentration von 5% kultiviert. Aufgrund unterschiedlicher Proliferationsgeschwindigkeiten der einzelnen Zelllinien werden die Kulturen alle 2-4 Tage gesplittet, sobald eine Konfluenz der Zellen von etwa 90% erreicht ist. Dabei wird den Kulturen unter der Sterilbank zunächst das Medium abgenommen und noch vorhandene Serumreste (FBS) mit 1X PBS (Tabelle 2.11) ausgewaschen. Anschließend werden die Zellen bei 37°C für 5-10 Minuten trypsinisiert, um diese enzymatisch vom Untergrund zu lösen¹¹⁰. Nach Zugabe von frischem Nährmedium erfolgt eine, der jeweiligen Zelllinie angemessene Passagierung (1:4 bis 1:10). Tabelle 2.10 fasst die Kultivierungsbedingungen für die verwendeten Zellkulturgefäße zusammen.

Tabelle 2.10: Kultivierungsgefäße und Bedingungen

Bezeichnung	Zelldichte beim Aussäen (x10 ⁵ /ml)	PBS (ml)	Trypsin (ml)	Kultivierungsmedium (ml)
T-75 Flasche	15	10	2	12
6-well-Platte	2	2	1	2
12-well-Platte	1	1	0,5	1
24-well-Platte	0,5	0,5	0,2	0,5
96-well-Platte	0,08	0,2	0,1	0,2

Tabelle 2.11: 10X PBS-Puffer (ad 1l H₂O)

10X PBS	Menge (in g)
Dinatriumhydrogenphosphatdihydrat	14,2
Kaliumchlorid	2
Kaliumdihydrogenphosphat	2,04
Natriumchlorid	80

2.2.1.2 Zellzählung

Vor dem Ansetzen eines Versuches wird die Zellzahl in einer Neubauerkammer (Precicolor, HBG, Deutschland) bestimmt. Dazu werden 10 µl der Zellsuspension mit 10 µl einer Trypanblau-Lösung vermischt und die Zellzahl unter dem Mikroskop bestimmt. Zwei gegenüberliegende große Quadrate (mit jeweils 16 kleinen Quadraten) werden ausgezählt und mit dem Faktor 10^4 multipliziert. Diese Zellzahl bezieht sich auf 1 ml Zellsuspension.

2.2.1.3 Kryokonservierung von Zellen

Zum Einfrieren der Zellen sollte sich die Kultur in der exponentiellen Wachstumsphase befinden. Zunächst werden die adhärenen Zelllinien trypsinisiert und gezählt. Anschließend werden die Zellen abzentrifugiert (300 x g für 5 Minuten bei Raumtemperatur (RT)), das Medium abgenommen und entsprechend der notwendigen Zellzahl von 1×10^6 – 1×10^7 Zellen/ml mit frischem Medium aufgefüllt¹¹⁰. Diese Zellsuspension wird im Verhältnis von 2:1 mit Einfriermedium (50% FBS; 20% DMSO; 30% Kulturmedium) vermischt und in ein 2ml-Kryoröhrchen (Thermo Scientific; Waltham, MA, USA) überführt. In einer Einfrierbox lagern die Röhrchen für 24 h bei -80°C und werden anschließend im Stickstofftank bei -150°C langzeitgelagert.

2.2.1.4 Auftauen von Zellen

Die tiefgefrorenen Kryoröhrchen werden mit Hilfe eines Schaumstoffschwimmers in einem Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Die Zellsuspension aus den Röhrchen wird in ein 15 ml Falcon, welches bereits 10 ml Kultivierungsmedium (bei RT) enthält, überführt. Nach Zentrifugation (300 x g für 5 Minuten bei RT) wird der Überstand abgenommen und das Zell-Pellet in frischem Kultivierungsmedium resuspendiert und in ein adäquates Zellkulturgefäß für die weitere Kultivierung überführt.

2.2.1.5 WNT3A-Medium und L-Zell-Medium

Zur Generierung der WNT3A- und korrespondierenden L-Zell-Überstände werden die WNT- und L-Zellen in der exponentiellen Phase 1:10 gesplittet und in T-150-Zellkulturflaschen für 4 Tage im CO_2 -Inkubator kultiviert. Das Medium wird anschließend abgenommen, steril filtriert (0,22µm, TPP, Trasadingen, Schweiz), in ein 50 ml Röhrchen aufgenommen und bei 4°C gelagert. Die Zellen werden anschließend für weitere 3 Tage in frischem Medium kultiviert. Das Medium wird

erneut abgenommen, filtriert und mit dem Medium des ersten Kultivierungsabschnittes vermischt. Die Zellen werden anschließend verworfen, da sie überwachsen sind. Die Medien können bei 4°C für 4 Wochen gelagert, oder bei -20°C für einige Monate eingefroren werden¹¹¹.

2.2.1.6 Pharmakologische Inhibitoren

Zur Inhibierung des WNT-Signalwegs wurden zwei Substanzen (siehe Abbildung 2.1), FH535 und XAV939, verwendet. FH535 ist ein *small-molecule*-Inhibitor, der den WNT/ β -Catenin-Signalweg hemmt, indem er vermutlich die Bindung von β -Catenin an TCF/LEF verhindert und so die Expression von Zielgenen stört^{112, 113}. Daneben blockiert das Molekül zusätzlich den Peroxisom-Proliferator-*activated*-Rezeptor-Signalweg (PPAR), da es eine strukturelle Ähnlichkeit mit dem PPARy-Antagonisten GW9662 aufweist^{112, 114}. XAV939 hingegen stabilisiert den Destruktionskomplex, indem es die Poly-ADP-Ribosyltransferase Tankyrase inhibiert, die Axin, ein Protein des Destruktionskomplexes, für den proteasomalen Abbau markiert. Durch die Inhibierung der Tankyrase wird Axin stabilisiert, der Destruktionskomplex bleibt intakt, so dass β -Catenin verstärkt abgebaut wird¹¹⁵.

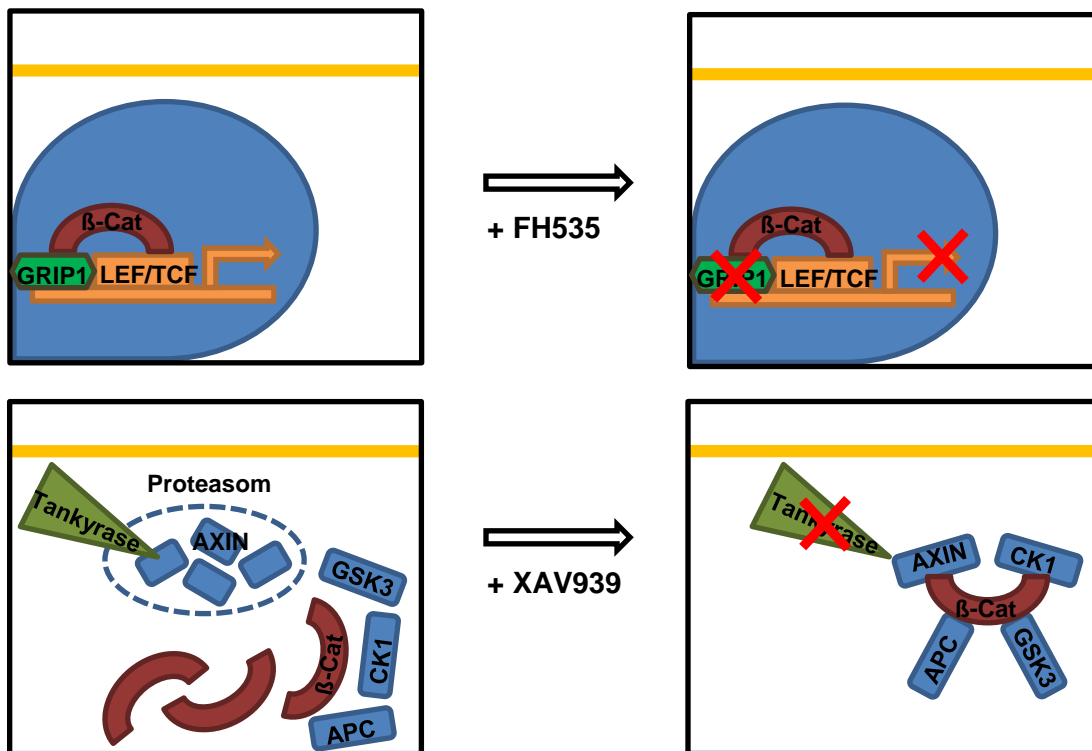


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der Inhibition des kanonischen WNT-Signalweges mittels FH535 (GRIP1 wird deaktiviert) und XAV939 (Inhibierung der Tankyrase und Stabilisierung des Destruktionskomplexes)^{112, 115}.

2.2.1.7 Chemische Transfektion – siRNA

In der vorliegenden Arbeit wurde eine transiente Transfektion zur Generierung eines β -Catenin *Knock-down* bei RMS-Tumorzellen verwendet. Zur Transfektion der β -Catenin spezifischen siRNA (*CTNNB1*, Qiagen, Hilden, Deutschland) werden chemische Transfektionsreagenzien (HiPerFect, Qiagen) verwendet und laut Herstellerprotokoll (Qiagen) verfahren. Dabei werden die Zellen zunächst trypsiniert, in frischem Medium aufgenommen und gezählt. In einer 6-*well* Platte werden 2×10^5 Zellen/*well* in einem Endvolumen von 2,4 ml ausgesät. 100 μ l siRNA-Mix (siehe Tabelle 2.12) werden für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend zu den Zellen gegeben und vermischt. Nach 6 h Inkubation bei 37°C im CO₂-Inkubator wird das Transfektionsmedium abgenommen und durch frisches Medium ersetzt. Die Zellen werden anschließend für maximal 72 h weiter inkubiert. .

Tabelle 2.12: siRNA-Transfektionsansatz

Komponente	Volumen (μ l)
siRNA	2,4
Medium (\emptyset FBS)	85,4
HiPerFect	12

2.2.2 MTT-Zytotoxizitätstest

2.2.2.1 Allgemeines Prinzip

Das Testprinzip basiert auf einer Reduktion des MTT (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), einem gelben Tetrazoliumsalz, durch metabolisch aktive Zellen in ein wasserunlösliches, blaues Formazan. Bei der Reduktion des 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid (MTT) dienen vor allem NADH und NADPH als Reduktionsäquivalent¹¹⁶. Der kalorimetrische Nachweis des Formazan erfolgt spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 565 nm mit einer Referenzwellenlänge von 670 nm in einem Mikroplatten-Lesegerät (Tecan, Männedorf, Schweiz). Je höher die Intensivität des Farbstoffes ist, desto höher ist die Anzahl metabolisch aktiver Zellen¹¹⁷.

2.2.2.2 MTT-Proliferationstests von RMS-Zellen, WNT/ β -Catenin-Inhibitoren

In der vorliegenden Arbeit wird der MTT Test verwendet um Änderungen in der Zellaktivität und im weiteren Sinne der Proliferation von RMS-Zelllinien nach Behandlung mit A) β -Catenin-Inhibitoren/siRNA und B) WNT3A-Stimulation nachzuweisen. Die Zellen (CRL2061, FLOH1 und RD) werden dazu in 96-well-Platten in einer Zelldichte von 8×10^3 Zellen/well (200 μ l Medium/well) ausgesät und für 24 h im CO²-Inkubator bei 37°C kultiviert. Das Medium wird daraufhin abgenommen und durch Medium mit Inhibitoren bzw. Stimulatoren (Tabelle 2.13) ersetzt. Die Testung erfolgt jeweils in Triplikaten. Als Negativkontrolle dienen unbehandelte Tumorzellen, bzw. falls erforderlich Tumorzellen, die mit dem Lösemittel (Vehikelkontrolle) der jeweiligen Inhibitoren versetzt werden (für FH535 und XAV939: DMSO). Nach gewünschter Inkubationszeit folgt die Zugabe von 20 μ l/well MTT-Lösung (5 mg/ml gelöst in PBS) und eine Inkubationszeit von 3 h bei 37°C. Nachfolgend wird der wässrige Überstand abgenommen und die Formazan-Kristalle werden durch die Zugabe von 200 μ l/well DMSO gelöst. Die spektrophotometrische Messung im Mikroplatten-Lesegerät erfolgt bei 565 nm mit einer Referenzwellenlänge von 670 nm. Abbildung 2.2 zeigt schematisch den Versuchsaufbau für die beiden Inhibitoren FH535 und XAV939. Zur Auswertung wird der Mittelwert eines Triplikats gebildet und die optische Dichte zum Zeitpunkt 0 h wird als 100% angesehen. Für weitere Zeitpunkte wird folgende Formel angewandt:

$$\text{Zunahme der Zellmasse (in \%)} = \frac{\text{Mittelwert der Absorption eines Triplikats (zum Zeitpunkt x)} \times 100}{\text{Mittelwert der Absorption eines Triplikats (0h)}}$$

Tabelle 2.13: Konzentration der Inhibitoren (MTT-Test)

Inhibitor	Konzentration 1 (in μ M)	Konzentration 2 (in μ M)	Konzentration 3 (in μ M)
FH535	20	40	80
XAV939	8	16*	(32)*

* in 1%igem DMSO gelöst

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
C	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	CRL2061
D	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	FLOH1
E	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	RD6
F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
	Kontrolle			XAV/FH Konz. 1			XAV/FH Konz. 2			XAV/FH Konz. 3			

Abbildung 2.2: Schematischer Aufbau eines MTT-Tests

Abbildung 2.3 zeigt den schematischen Aufbau des MTT-Tests wie er für die Kombination von WNT3A-Stimulation bei gleichzeitiger Inhibierung durch FH535 und XAV939 verwendet wurde (WNT/ β -Catenin-Inhibitor-Konzentration (FH535=40 μ M; XAV939=16 μ M). Das L-Zell-Medium dient als Kontrolle des WNT3A-Mediums.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
C	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	DMEM
D	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	L-Zell
E	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	WNT3A
F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
	Kontrolle			DMSO Kontrolle			FH535 40 μ M			XAV 16 μ M			

Abbildung 2.3: MTT-Test: WNT3A-Medium mit WNT/ β -Catenin-Inhibitoren (für eine Zelllinie dargestellt)

2.2.3 *In-vitro-Scratch-Assay*

Der *Scratch-Assay* dient der Untersuchung des Migrationsverhaltens, der Zell-Zell-Interaktionen und gibt auch Hinweise auf das Proliferationsverhalten der Zellen¹¹⁸. Für den *Scratch-Assay* werden die Zellen in einer Zelldichte von $0,5 \times 10^5$ Zellen/*well* in einer 12-*well*-Platte ausgesät und für 24 h im Nährmedium (1 ml/*well*) im CO²-Inkubator kultiviert. Im Anschluss wird das Medium abgenommen und die Platten mit den entsprechenden Kultivierungsmedien a) Normalmedium, b) Medium zur Stimulation (WNT3A) und c) Medium zur Inhibierung (FH535, XAV939 oder siRNA) vorbehandelt. Nach erneuter Inkubation bei 37°C für 24 h wird mit einer Pipettenspitze (200 µl) eine horizontal und vertikal verlaufende Linie auf dem Zellrasen gekratzt (*Scratch*). Um die mechanisch losgelösten Zellen und möglichen Zellschrot zu entfernen, wird das Medium abgenommen, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und frisches Kontroll-, Inhibitor- oder Stimulationsmedium zugegeben. Der Verlauf der Migration/ Proliferation wird zu verschiedenen Zeitpunkten (0, 4, 8, 12 und 24 h) mit einem inversen Mikroskop mit Phasenkontrast (Leica, Wetzlar, Deutschland) dokumentiert (0 h-Wert). Die Abbildung 2.4 veranschaulicht den Versuchsaufbau:

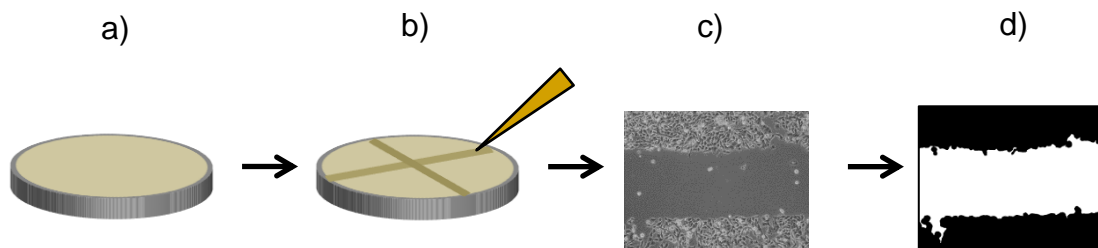


Abbildung 2.4: *Scratch-Assay* a) Kultivierung der behandelten Zellen bis zur Konfluenz bei 37°C, b) Mit einer 200 µl Pipettenspitze entsteht der *Scratch*, c) Aufnahme am inversen Mikroskop (0, 4, 8, 12 und 24 Stunden), d) Quantifizierung des Scratches mittels *ScratchAssayAnalyzer* (*ImageJ*)

Die Aufnahmen der Zellen entstehen bei einer 100fachen Vergrößerung und werden vom Mittelpunkt des ‚Scratches‘ in allen vier Richtungen (oben, unten, links, rechts) erzeugt. Dafür wird die Software LAS 4.4. (Leica, Wetzlar, Deutschland) genutzt. Für die Quantifizierung der *Scratch*-Fläche diente der *ScratchAssayAnalyzer*¹¹⁹, ein Plug-In des Bildverarbeitungsprogramms *ImageJ*¹²⁰.

2.2.4 RNA-Isolierung und Verarbeitung

Um Kontaminationen durch RNAsen zu vermeiden, werden alle Oberflächen und Arbeitsmaterialien (z.B. Pipetten und Pipettenspitzenboxen) vor der Aufbereitung der Proben mit *RNAse away* (Molecular BioProducts, San Diego, CA, USA) gereinigt.

2.2.4.1 Zellkultivierung für RNA-Isolation

Die Kultivierung von Zellen zur Isolierung von RNA erfolgt in 6-*well*-Platten. Pro *well* werden 2×10^5 Zellen ausgesät und für 24 h im CO₂-Inkubator kultiviert. Anschließend wird das Medium abgenommen und die Zellen mit den entsprechenden Konzentrationen a) Inhibitoren und b) Stimulationsmedien für 48 h bei 37°C behandelt. Zur Isolierung der RNA und Proteine (Kapitel 2.2.5.1) wird das Medium nach der Inkubationszeit abgenommen und 1 ml TRIzol® pro *well* (einer 6-*well*-Platte) zugegeben (siehe Abbildung 2.5). Alle weiteren Schritte erfolgen nach dem Herstellerprotokoll. Da sowohl RNA als auch Proteine isoliert werden, wird neben der wässrigen Phase, die nach Zugabe des Chloroforms und anschließender Zentrifugation den oberen Anteil der Lösung im Reaktionsgefäß ausmacht, auch die untere Lösemittelphase zur Proteinisolierung zurückbehalten (siehe Kapitel 2.2.5). Die RNA-Pellets werden in 20 µl DEPC-Wasser (Qiagen, Venlo, Niederlande) gelöst.

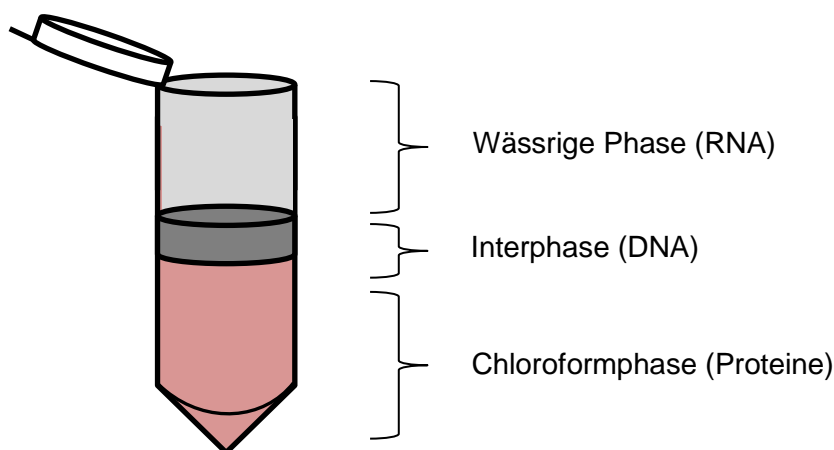


Abbildung 2.5: Phasentrennung nach Zugabe von TRIzol® und Chloroform und Zentrifugation

2.2.4.2 Bestimmung der RNA-Konzentration und -Reinheit

Mit Hilfe eines Spektrometers (NanoDrop®) wird die Konzentration der RNA unter Messung der optischen Dichte (OD) der Nukleinsäuren bei einer Wellenlänge von 260 nm wie folgt bestimmt (Lambert-Beer'sche Gesetz):

$$c(\mu\text{g/ml}) = \text{OD}_{260} \times V \times 40$$

V: Verdünnungsfaktor

40: Multiplikationsfaktor (dsRNA)

Der Absorptionsquotient A_{260}/A_{280} sollte bei der Messung zwischen 1,8 und 2,0 betragen, um eine mögliche Kontamination der RNA mit z.B. Proteinen (Absorption der aromatischen Aminosäuren bei 280nm) auszuschließen. Dieser Quotient spiegelt die Reinheit der RNA nach Isolation wider.

Für die Konzentrationsbestimmung wird eine Probenmenge von 2 μl eingesetzt.

2.2.4.3 Reverse Transkription – cDNA Synthese

Nach Isolierung und Konzentrationsbestimmung wird 1 μg RNA mit Hilfe des RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific; Waltham, MA, USA) laut Herstellerprotokoll in cDNA umgeschrieben. Dazu nutzt das Kit die Reverse Transkriptase aus dem *Moloney murine leukemia Virus* (MMLV-RT)¹²¹.

2.2.4.4 Real-Time-quantitative-PCR (RTQ-PCR)

Diese Form der PCR¹²² nutzt für die kontinuierliche Detektion der Menge an dsDNA nach jedem Zyklus einen fluoreszierenden, DNA-interkalierenden Farbstoff.¹²³ Im Verlauf dieser Arbeit wurde das DyNAmo ColorFlash SYBR Green qPCR Kit (Thermo Scientific; Waltham, MA, USA) laut Herstellerangaben verwendet¹²⁴. Neben dem Farbstoff enthält das Kit unter anderem noch RNasen, welche überschüssige mRNA in der Probe abbauen. Zur Detektion wird das ABI-StepOne Plus Real Time PCR Gerät (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) genutzt. Folgende Volumina werden pro *well* (96-*well*-Platte) eingesetzt (Primer siehe Tabelle 2.7):

cDNA (1:10 Verdünnung)	2 μl
SYBR Green	5 μl
Primer	2 μl
H ₂ O	1 μl

Jede Probe wird in technischen Duplikaten gemessen. Für die PCR gelten folgenden Bedingungen:

- | | | | |
|----|-------|--------|--------|
| 1. | 95 °C | 10 min | } 40 x |
| 2. | 95 °C | 15 sek | |
| 3. | 60 °C | 1 min | |

Um die Qualität bzw. Spezifität der Amplifikation zu bestimmen wird eine Schmelzkurvenanalyse im Anschluss an die PCR durchgeführt. Dabei wird die Probe über einen Zeitraum von 40 Minuten kontinuierlich um 0,3°C erhitzt. Bei einer für das Fragment spezifischen Temperatur löst sich der DNA-Doppelstrang in zwei Einzelstränge und das DNA-interkalierende SYBR Green wird freigesetzt. Die Änderung (Abnahme) der Fluoreszenz wird detektiert und kann grafisch mittels einer Schmelzkurve (*melting curve*) dargestellt werden. So kann die Bildung unspezifischer PCR-Produkte in der Probe ausgeschlossen werden¹²⁵.

2.2.4.5 Relative Quantifizierung der qRT-PCR-Produkte

Während sich die Amplifikation in der exponentiellen Phase befindet, hebt sich das Fluoreszenzsignal einer Probe signifikant von der Hintergrundfluoreszenz ab. Die Zykluszahl, in der dies passiert, wird als C_T-Wert (*Cycle Threshold*) bezeichnet. Dieser Wert wird für die relative Quantifizierung unter Verwendung der 2^{-ΔΔC_T}-Methode herangezogen¹²⁶:

$$\begin{aligned}\Delta C_T &= C_{T\text{Zielgen}} - C_{T\text{Referenzgen}} \\ \Delta\Delta C_T &= \Delta C_{T\text{Behandelt}} - \Delta C_{T\text{Kontrolle}} \\ \text{Ratio} &= 2^{-\Delta\Delta C_T}\end{aligned}$$

Referenzgen: In dieser Arbeit wurde die Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase (*GAPDH*) als *housekeeping gene* verwendet¹²⁷.

Voraussetzung für diese Berechnung ist die optimale PCR-Amplifikation, auch Effizienz (E) genannt. Zur Korrektur solcher Schwankungen kann folgende Formel herangezogen werden:

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{\text{Zielgen}})^{\Delta C_{T\text{Zielgen}}(\text{Kontrolle} - \text{Behandlung})}}{(E_{\text{Referenzgen}})^{\Delta C_{T\text{Referenzgen}}(\text{Kontrolle} - \text{Behandlung})}}$$

2.2.5 Proteinisolierung und Verarbeitung

Um einen Abbau der Proteine zu verhindern werden Proteinlösungen soweit möglich auf Eis aufgetaut und weiterverarbeitet.

2.2.5.1 Proteinisolierung

Für die Aufbereitung der Proteine aus den behandelten Zellen wird die aus der RNA-Isolierung mit TRIzol® übrig gebliebene Inter- und Chloroformphase (Abbildung 2.4) genutzt. Nach Zugabe von 0,3 ml Ethanol und Zentrifugation (2000 x g für 5 min) fällt die DNA aus und der proteinhaltige Überstand kann abgenommen werden. Dieser wird mit 1,5 ml Isopropanol versetzt und zentrifugiert (12.000 x g für 10 min). Dabei bildet sich am Boden des Reaktionsgefäßes ein Protein-Pellet. Nach dreifacher Waschung (0,3 M Guanidine Hydrochlorid in 95%igem Ethanol) wird das Pellet in 200 µl 1%iges SDS aufgenommen und kann anschließend quantifiziert werden. Die Protein-Lösungen werden bei -80°C gelagert.

2.2.5.2 SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blotting

Für diese Arbeit wird das von Laemmli¹²⁸ entwickelte diskontinuierliche elektrophoretische System (SDS-PAGE) zur Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe (Dalton) genutzt.

Für die Auftrennung der Proteine nutzt dieses System ein SDS-haltiges TRIS-Glycin-Puffersystem mit zwei unterschiedlichen Gelen, einem Trenn- und Sammelgel. Im Gegensatz zum Trenngel besitzt das Sammelgel einen niedrigeren pH-Wert (pH 6,8 Sammelgel, pH 8,8 Trenngel) und weitere Poren um eine Akkumulation der Proteine am Übergang von Sammel- und Trenngel zu ermöglichen. Zur Analyse des β -Catenin-Proteins mit einer Masse von etwa 90 kDa wird ein 10%iges Trenngel verwendet. Tabelle 2.14. zeigt die Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel. Die Mengenangaben sind ausreichend für zwei Mini-Gele. Pro Ansatz (Tasche) werden 20-30 µg Proteine verwendet, mit 20% Laemmli-Probenpuffer versetzt und bei 95°C für 5 Minuten denaturiert. Die Auftrennung der Proteine erfolgt bei einer Spannung von 100-120V in 1X Elektrophorese-Puffer.

Tabelle 2.14: Zusammensetzung des Sammel- und Trenngels

Pufferkomponente	Sammelgel	10% Trenngel (30-120 kDa)
Acrylamid (30%)	0,65 ml	3,3 ml
TRIS pH 8,8	-	2,5 ml
TRIS-Cl, pH 6,8	1,25 ml	-
SDS	50 µl	100 µl
APS	50 µl	100 µl
TEMED	10 µl	10 µl
H ₂ O	3 ml	4 ml

Die aufgetrennten Proteine werden anschließend auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF, GE Healthcare, Fairfield, CT, USA) immobilisiert. Dazu wird die Membran zunächst für 30 Sekunden in Methanol äquilibriert und anschließend zusammen mit dem Polyacrylamid-Gel, Whatman-Papier und Schwämmen in 1X Transferpuffer für 5-10 Minuten gespült. Aufgrund der Anlagerung des negativ geladenen SDS wandern Proteine von der Kathode zur Anode. Die Zusammensetzung der Kassetten der Transferkammer (Mini Trans-Blot® Cell, Biorad) erfolgt entsprechend der Proteinlaufrichtung (Abbildung 2.6). Anschließend werden die Kassetten in die Slots der Transferkammer geschoben. Bei einer Stromstärke von 60 mA pro Polyacrylamid-Gel erfolgt der Proteintransfer auf die PVDF-Membran über 3 h bei RT oder über Nacht bei 4°C¹²⁹.

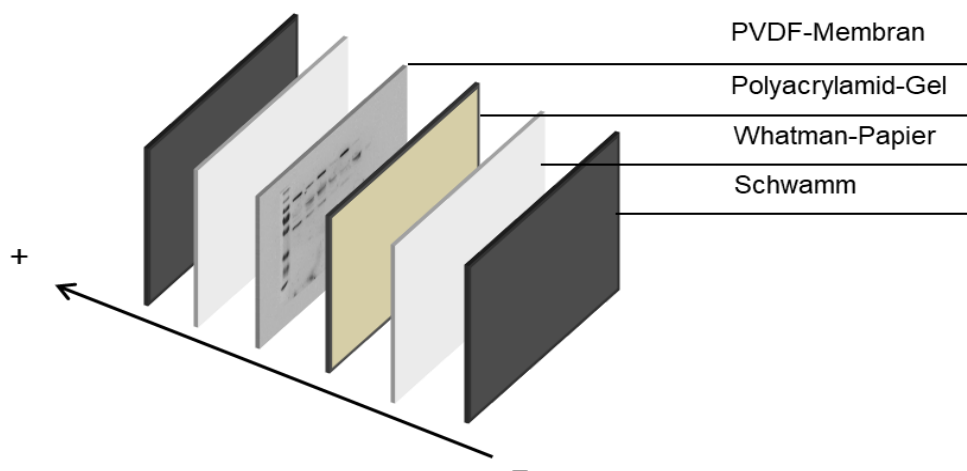


Abbildung 2.6: Zusammensetzung einer Kassetten eines Western Blots

Tabelle 2.15: Laemmli-Probenpuffer

Reagenz	Konzentration
TRIS	125 mM
Glycerin	20%
Natriumdodecylsulfat	4%
β -Mercaptoethanol	10%
Bromphenolblau	0,004 %

Tabelle 2.16: Elektrophorese-Puffer (10X)

Reagenz	Konzentration
TRIS	250 mM
Glycin	1,92 M
Sodiumdodecylsulfat	1%

Tabelle 2.17: Transferpuffer (10X)

Reagenz	Konzentration
TRIS	20 mM
Glycin	150 mM
Methanol	20%

Tabelle 2.18: TBS-T

Reagenz	Konzentration
TRIS (pH 8,0)	10 mM
Natriumchlorid	150 mM
Tween20	0,05%

2.2.5.3 Immunologischer Proteinnachweis

Nach dem Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran wird diese zum Blocken unspezifischer Antikörperbindungsstellen für 1 h in 5%iger Magermilch (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) bei Raumtemperatur geschwenkt. Danach wird der Blot in eine luftdicht verschweißte Folie unter Zugabe von β -Catenin-Primärantikörper (mouse anti-human) im Verhältnis 1:1000 in 1%iger Magermilch für 2 h bei RT oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Membran wird anschließend dreimal für 10 min in TBS-T gewaschen um schwach bzw. unspezifisch bindende Antikörper zu entfernen. Zur Detektion des Primärantikörpers wird die Membran mit einem HRP (Horseradish

peroxidase) gekoppelten anti-Maus-Sekundärantikörper im Verhältnis 1:1000 in 1%iger Magermilch für 1 h bei RT inkubiert. Es folgen drei weitere Waschvorgänge mit TBS-T für jeweils 10 min. Die Membran wird anschließend für 2 min in PBS geschwenkt. Der β -Catenin-Nachweis erfolgt mittels Zugabe eines ECL-Substrates, das nach Umsetzung durch die HRP chemiluminesziert und mithilfe eines Chemilumineszenz-Imaging-System sichtbar gemacht werden kann. Die Quantifizierung der Proteinbanden erfolgt mit der Fusion-Capt Analysesoftware (Peqlab, Erlangen, Deutschland).

Als Ladekontrolle erfolgt auf derselben Membran der Nachweis von β -Actin. Dazu werden zunächst alle gebundenen Antikörper unter Verwendung der *1X Re-Blot-Solution* (Millipore, Temecula, CA, USA) von der Membran gelöst (20 min bei RT). Nach dreimaliger Waschung mit PBS werden unspezifische Bindestellen auf der Membran mit 5%iger Magermilch geblockt und der β -Actin-Primärantikörper (*mouse anti-human*) im Verhältnis 1:1000 in 1%iger Magermilch zugegeben. Die weiteren Schritte erfolgen analog zum Proteinnachweis von β -Catenin.

2.2.6 Indirekte Immunfluoreszenz der kultivierten Zellen

Um den Effekt von WNT3A, eines Stimulus des β -Catenin-Signalweges, auf den Kerntransfer von β -Catenin zu visualisieren, wird die Methode der Immunfluoreszenz eingesetzt. Die Zellen werden auf Kammerobjektträgern (Leica, Wetzlar, Deutschland) ausgesät (5×10^3 Zellen/Kammer) und für 24 h bei 37°C kultiviert. Anschließend erfolgt die Zugabe des entsprechenden Mediums (DMEM-, L-Cell-, WNT3A-Medium) mit oder ohne *FH535* (40 μ M). Zu festgelegten Zeitpunkten (5 min, 30 min, 2 h, 6 h) werden die Zellen auf dem Objektträger fixiert (4% Formaldehyd in 1XPBS für 10 min bei RT), geblockt (5%BSA in 1XPBS für 1 h bei RT) und anschließend mit dem Primärantikörper (β -Catenin) im Verhältnis 1:200 in Antibody Diluent (DAKO, Santa Clara, CA, USA) für 1 h, oder alternativ über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach dreimaliger Waschung mit 1XPBS für jeweils 3 min erfolgt die Zugabe eines Texas Red markierten anti-Maus Sekundärantikörper (im Verhältnis 1:1000 in Antibody Diluent).¹³⁰ Im Anschluss werden die Kammern erneut für 3 min dreimal mit 1X PBS gewaschen. Das Eindeckmedium (Vector, Burlingame, CA, USA) enthält das für die Kern-Gegenfärbung notwendige DAPI. Die Auswertung erfolgt mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops von Olympus (Bx41, Shinjuku, Tokio, Japan) und der dazugehörigen Imaging-Software cellF (Olympus).

2.2.7 Durchflusszytometrie

Zur Darstellung apoptotischer Zellen mittels Annexin V/Propidiumiodid-Färbung wird ein Durchflusszytometer der Firma BD verwendet (FACSCanto™ II).

2.2.7.1 Annexin V/Propidiumiodid-Färbung

Zur Detektion der Apoptose wird eine Annexin V/Propidiumiodid-Färbung durchgeführt, nachdem die RMS-Zellen mit FH535, L-Zell-Medium oder WNT3A-Medium für 48 h behandelt wurden. Die Zellen werden im Anschluss an den Behandlungszeitraum trypsiniert. Zum Nachweis bereits abgeschwommener apoptotischer Zellen wird zudem der Überstand aufgehoben und zusammen mit den trypsinierten Zellen bei 800 x g für 3 Minuten pelletiert. Nach zweimaliger Waschung mit eiskaltem 1X PBS werden die Zellen gezählt und jeweils 2×10^5 Zellen in 100 µl Annexin V-Bindepuffer resuspendiert (BD Bioscience). Nach Zugabe von 5 µl fluoresceingekoppeltem Annexin V (BD Bioscience) und 10 µl Propidiumiodid (Sigma Aldrich) werden die Zellen für 15 min bei RT im Dunkeln inkubiert und anschließend mit weiteren 200 µl Annexin V-Bindepuffer versetzt. Im Anschluss erfolgt die durchflusszytometrische Analyse mit dem FACSCanto™ II (BD Bioscience).

2.2.8 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgt mit Hilfe der Software GraphPad Prism 6 (GraphPad, La Jolla, CA, USA). Der Student's t-Test wurde als statistisches Testverfahren angewandt. Als statistisch signifikant galten p-Werte kleiner als 0,05.

3 ERGEBNISSE

3.1 Inhibierung des kanonischen β -Catenin-Signalweges

Die im Rahmen der Arbeit vorgenommenen *in-vitro*-Untersuchungen wurden am Beispiel von drei RMS-Zelllinien, CRL2061, FLOH1 und RD, durchgeführt, die die drei häufigsten RMS-Subtypen repräsentieren (siehe Tabelle 3.1). Für die Stimulation des kanonischen WNT/ β -Catenin-Signalweges wurde ein mit WNT3A angereichertes Nährmedium verwendet (siehe Material und Methoden, Kapitel 2.1.5). Zur Inhibierung wurden zwei pharmakologische Wirkstoffe getestet, FH535 und XAV939, die an jeweils unterschiedlichen Stellen in der Signalkaskade des kanonischen β -Catenin-Signalweges eingreifen (siehe Abbildung 2). Weiterhin wurde eine β -Catenin-spezifische siRNA verwendet.

Tabelle 3.1: Verwendete Zelllinien^{131, 132}

RMS-Subtyp	Zelllinie
ARMS (PAX3-FKHR-positiv)	CRL2061
ARMS (translokations-negativ)	FLOH1
ERMS	RD

3.1.1 Einfluss der pharmakologischen WNT/ β -Catenin-Inhibitoren FH535 und XAV939 auf die Proliferation von RMS-Tumorzellen

Zunächst wurde der Einfluss der beiden Inhibitoren des β -Catenin-Signalweges, FH535 und XAV939, auf die Proliferations- und Überlebensraten der verwendeten RMS-Zelllinien untersucht. Abbildung 3.1 zeigt die Wachstumskurven der drei Zelllinien nach Behandlung mit FH535 und XAV939 mit jeweils zwei unterschiedlichen Konzentrationen (siehe Material und Methoden; Tabelle 2.13) über einen Zeitraum von 72 h.

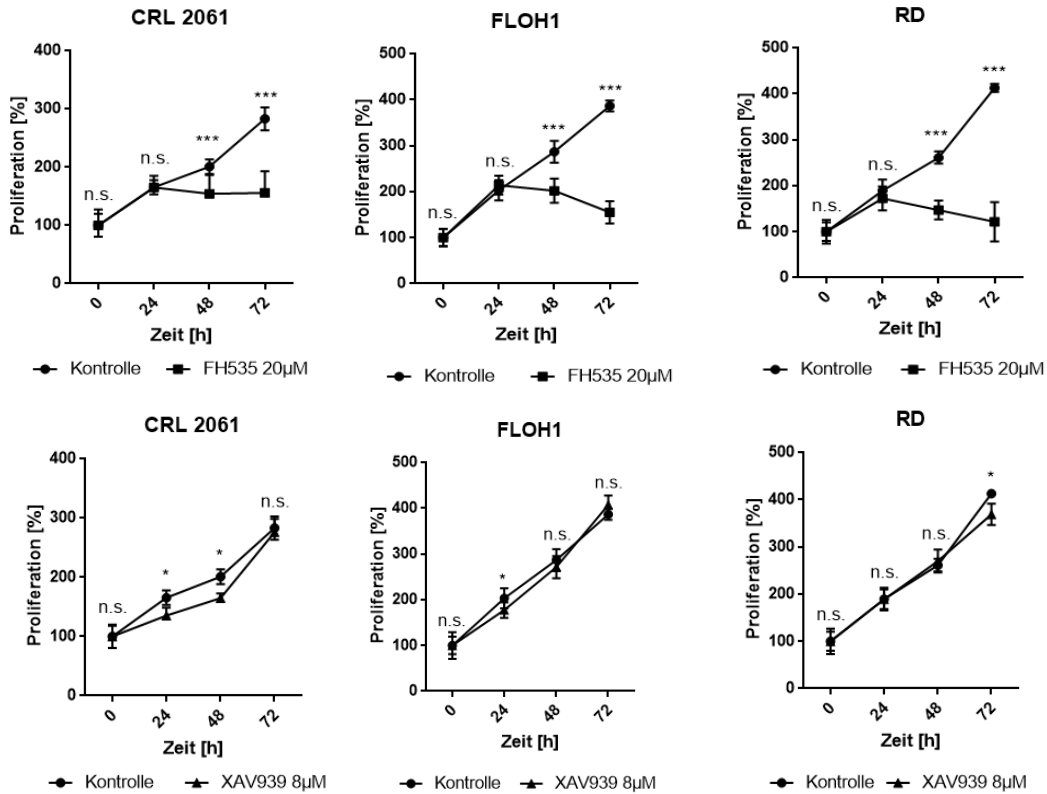


Abbildung 3.1: MTT-Test zur Untersuchung des Einfluss der Inhibitoren FH535 und XAV939 auf die proliferative Aktivität der RMS-Zelllinien CRL2061, FLOH1 und RD (8×10^3 Zellen/well) über einen Zeitraum von 72 h. Gezeigt sind jeweils die Behandlungen mit 20 µM FH535 und 8 µM. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zelllinien. Die Behandlung erfolgte in Triplikaten in drei unabhängigen Versuchen. Dargestellt ist der Mittelwert der drei unabhängigen Experimente mit der Standardabweichung. $p^* < 0,01$, $*** p < 0,005$

Mit FH535 behandelte Zellen weisen nach 48 stündiger Inkubationsdauer eine verminderte proliferative Aktivität auf, die für FLOH1 und RD im weiteren Beobachtungszeitraum kontinuierlich abnimmt, während die ARMS-Zelllinie CRL2061 im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen einen Proliferationsarrest zeigt (Abbildung 3.1). Für XAV939 hingegen wurde keine wesentliche Beeinflussung der Proliferationsrate im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle beobachtet (Abbildung 3.1). Höhere Konzentrationen an FH535 (40 µM) verstärken den beobachteten Effekt (Abbildung 3.2) mit signifikant verminderten Proliferationsraten bereits nach 24 h. Die Eskalation der Wirkstoffkonzentration auf 80 µM erwies sich bereits nach 24 h als letal (nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu beeinflusst eine Konzentrationssteigerung des XAV939 auf 16 µM weder die Proliferationsrate der ARMS-Zelllinien (CRL2061 und FLOH), noch die der ERMS-Zelllinie RD

(Abbildung 3.2 (A)). Allerdings wurde bei hohen XAV939 Konzentrationen eine Kristallbildung im Nährmedium beobachtet (siehe Abbildung 3.2 (B)), sodass eine Erhöhung des XAV939 Lösemittels DMSO auf 1% nötig und eine weitere Konzentrationssteigerung nicht möglich war. Die weiteren Behandlungen und Versuchsreihen wurden daher mit 40 μM FH535 und maximal 16 μM XAV939 durchgeführt.

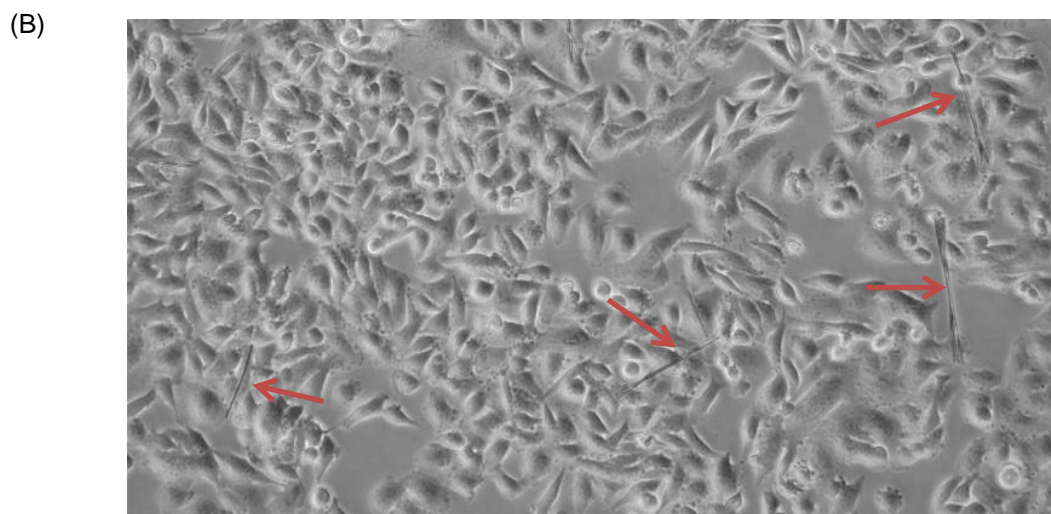
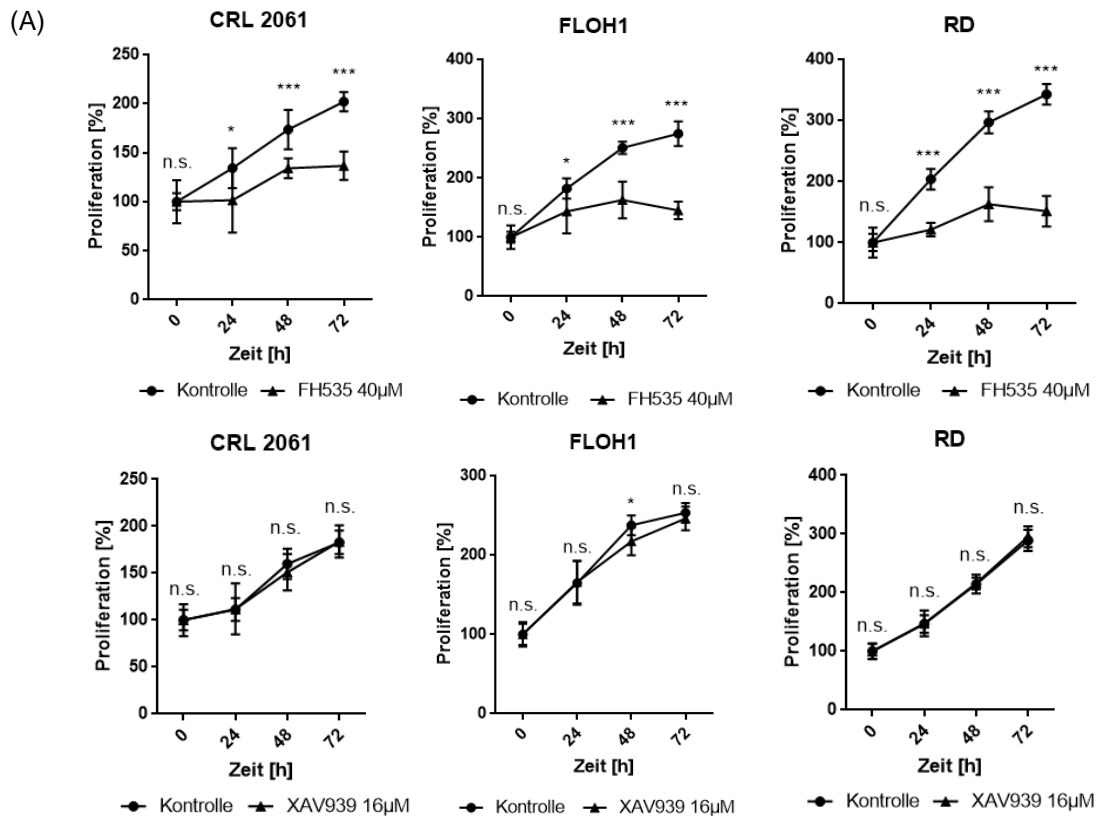


Abbildung 3.2: Einfluss der Inhibitoren FH535 und XAV939 auf die proliferative Aktivität der RMS-Zelllinien CRL2061, FLOH1 und RD. (A) MTT-Test der RMS-Zelllinien (8×10^3 Zellen/well) über einen Zeitraum von 72 h unter Behandlung mit 40 μM FH535 und 16 μM XAV939. Als Kontrolle dienten

unbehandelte Zelllinien. Die Behandlung erfolgte in Triplikaten in drei unabhängigen Versuchen. Dargestellt ist der Mittelwert der drei unabhängigen Experimente mit der Standardabweichung, * $p < 0,05$, *** $p < 0,005$; (B) Präzipitate (roter Pfeil) nach Behandlung der Zellen mit XAV939 in höherer Konzentration ($>16 \mu\text{M}$). Hier dargestellt sind repräsentativ die FLOH1-Zellen nach 24 stündiger Behandlung. Vergrößerung X100.

3.1.2 Einfluss eines spezifischen β -Catenin *Knock-down* auf die Proliferation von RMS-Tumorzellen

Zur Einschätzung möglicher unspezifischer Nebeneffekte der beiden pharmakologischen Inhibitoren wurde zudem die Expression von β -Catenin durch eine β -Catenin-spezifische siRNA gehemmt. Wie in Abbildung 3.3 gezeigt wird die Proliferationsfähigkeit bei keiner der Zelllinien beeinträchtigt und entspricht, wie im Falle des pharmakologischen Inhibitors XAV939, der unbehandelten Kontrolle.

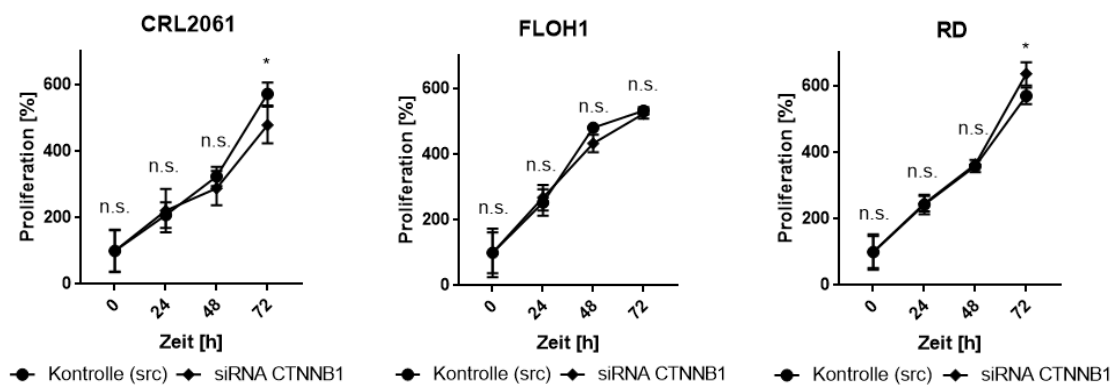


Abbildung 3.3: Einfluss spezifischer β -Catenin siRNA auf die proliferative Aktivität der RMS-Zelllinien CRL2061, FLOH1 und RD. MTT-Test der RMS-Zelllinien (8×10^3 Zellen/well) über einen Zeitraum von 72 h nach β -Catenin-*Knock-down*. Als Kontrolle diente die Behandlung mit *scrambled* (src)-siRNA. Die Behandlung erfolgte in Triplikaten in zwei unabhängigen Versuchen. Dargestellt sind der Mittelwert der beiden unabhängigen Experimente und die Standardabweichung. * $p < 0,05$.

3.1.3 Einfluss der pharmakologischen Inhibitoren und der siRNA auf die Proteinexpression von β -Catenin

Im nächsten Schritt wurde der Einfluss der beiden pharmakologischen Inhibitoren und der siRNA auf die β -Catenin-Proteinexpression quantifiziert. Sowohl für FH535 als auch XAV939 wurde eine verminderte β -Catenin-Expression in allen Zelllinien nachgewiesen, wobei die ARMS-Zelllinie CRL2061 das geringste Ansprechen auf die Behandlung aufweist (Abbildung 3.4 (A)).

Ein *Knock-down* mittels spezifischer siRNA führt in allen drei Zelllinien zu einer Reduzierung der Expression von β -Catenin auf Protein- und RNA-Ebene (Abbildung 3.4 (B, C)).

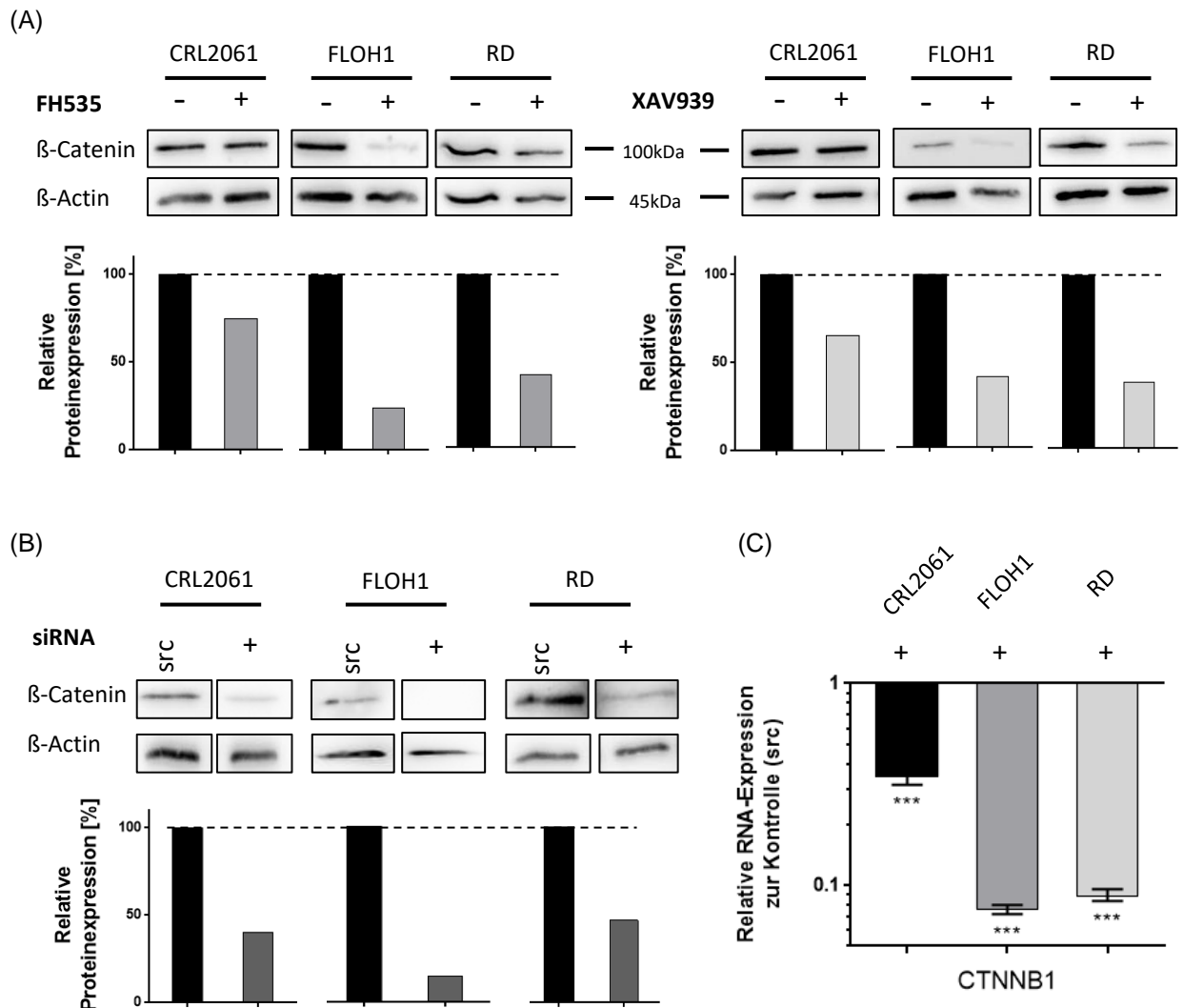


Abbildung 3.4: Einfluss der pharmakologischen Inhibitoren, FH535 und XAV939, des kanonischen β -Catenin-Signaltransduktionsweges (A) und der spezifischen β -Catenin siRNA (B) auf die β -Catenin-Proteinexpression in den RMS-Zelllinien CRL2061, FLOH1 und RD. (A) β -Catenin-Western Blot der RMS-Zelllinien nach Behandlung mit 40 μ M FH535 (linke Seite) oder 16 μ M XAV939 (rechte Seite) über einen Zeitraum von 48 h. β -Actin diene als Ladekontrolle. Als Kontrolle dienten mit DMSO behandelte Zellen. Zur Quantifizierung wurde die β -Catenin-Expression auf β -Actin normalisiert und die Expression DMSO behandelter Zellen wurde als 100% festgelegt (schwarze Balken). Hier aufgezeigt ist jeweils die quantitative Analyse eines repräsentativen Western Blots. (B) Western Blot-Analyse der β -Catenin-Expression 48 h nach β -Catenin *Knock-down* durch eine spezifische siRNA. β -Actin diene als Ladekontrolle. Unspezifische *scrambled* siRNA (src) diene als Kontrolle. Die β -Catenin-Expression wurde auf β -Actin normalisiert und die Expression mit *scrambled* siRNA behandelten Zellen wurde als 100% festgelegt (schwarze Balken). Hier aufgezeigt ist jeweils die

quantitative Analyse eines exemplarischen Western Blots. (C) qRT-PCR der β -Catenin-Expression nach siRNA vermitteltem *Knock-down*. GAPDH diente der Normalisierung. Die Expression von *scr*-behandelten Zellen wurde auf 1 festgelegt. Dargestellt sind Mittelwert zweier unabhängiger Experimente und der Standardfehler des Mittelwertes. *** $p < 0.005$

3.2 Stimulation des kanonischen WNT-Signaltransduktionsweges durch WNT3A

Im nächsten Schritt wurden die Effekte einer Stimulation des β -Catenin-Signalweges näher untersucht. Dazu wurden die RMS-Zelllinien über einen Zeitraum von 72 h mit WNT3A-Medium behandelt. Als Kontrolle dieses Mediums diente L-Zell-Medium.

3.2.1 Einfluss von WNT3A auf die Proliferation von RMS-Tumorzellen

Die Aktivierung des WNT/ β -Catenin-Signalweges mit WNT3A-Medium geht in der translokationsnegativen ARMS-Zelllinien FLOH1 und in der ERMS-Zelllinie RD mit einer signifikanten Reduktion des Proliferationsverhaltens im Vergleich zu unbehandelten Zellen einher. Allerdings konnte in diesen Zelllinien ebenfalls ein signifikant vermindertes Wachstumsverhalten mit dem WNT3A-negativem L-Zell-Medium nachgewiesen werden, wobei nur in der FLOH1-Zelllinie ein signifikanter Unterschied zwischen L-Zell-Medium und WNT3A-Medium besteht (Abbildung 3.5). Die translokationspositive ARMS-Zelllinie CRL2061 hingegen weist im Wachstumsverhalten keine Unterschiede nach 72 h auf.

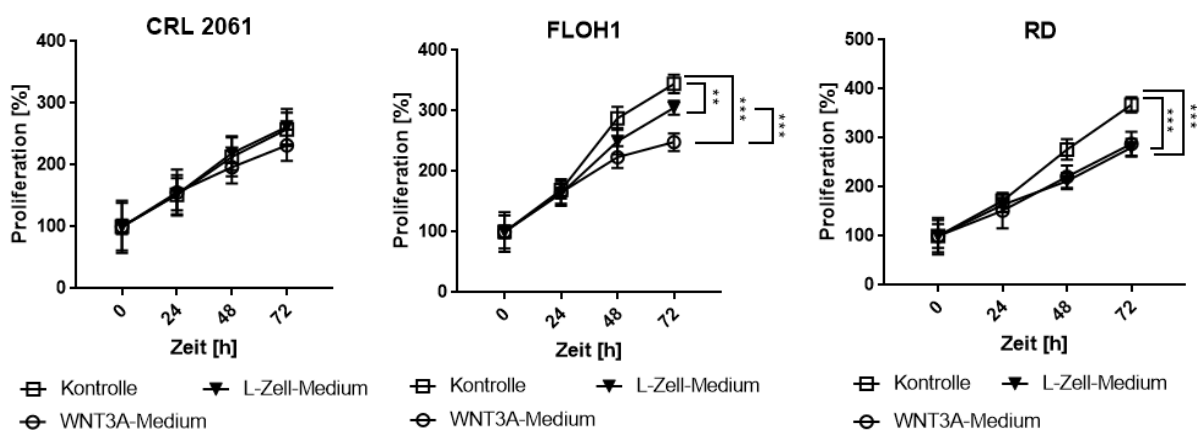


Abbildung 3.5: Einfluss einer Stimulation des kanonischen WNT/ β -Catenin-Signaltransduktionsweges durch WNT3A auf die proliferative Aktivität der RMS-Zelllinien CRL2061, FLOH1 und RD. Dargestellt ist ein MTT-Test der RMS-Zelllinien (8×10^3 Zellen/well) über einen Zeitraum von 72 h unter Behandlung mit WNT3A. Als Kontrolle dienten mit L-Zell-Medium behandelte Zellen und unbehandelte

Zelllinien. Die Behandlung erfolgte in Triplikaten in drei unabhängigen Versuchen. Dargestellt ist der Mittelwert der drei unabhängigen Experimente mit der Standardabweichung. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$

Infolge der Stimulation des kanonischen β -Catenin-Signaltransduktionsweges mit WNT3A wurde im Vergleich zum Kontrollmedium (L-Zell-Medium) im Western Blot eine verstärkte β -Catenin Proteinkonzentration nachgewiesen. Ähnlich wie bei den Inhibitor-Experimenten bereits beobachtet, reagiert die translokationspositive ARMS-Zelllinie CRL2061 kaum auf die Stimulation im Vergleich zu der translokationsnegativen ARMS-Zelllinie FLOH1 und der ERMS-Zelllinie RD.

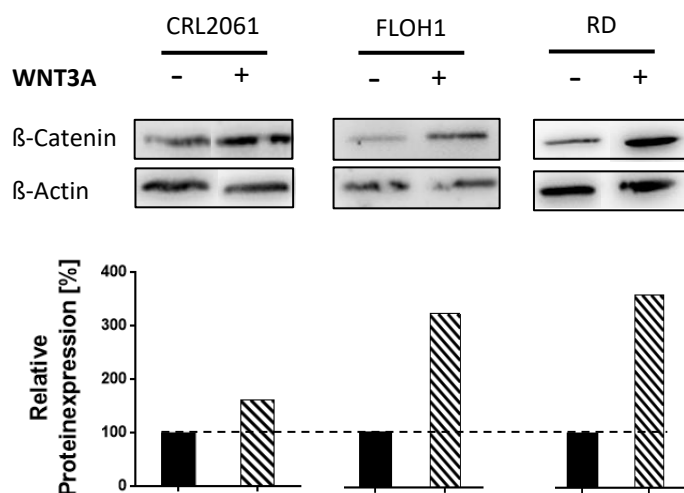


Abbildung 3.6: Einfluss einer Stimulation des kanonischen WNT/ β -Catenin-Signaltransduktionsweges durch WNT3A auf die β -Catenin-Proteinexpression. Oben: Western Blot-Analyse nach einem Behandlungszeitraum von 48 h. β -Actin diente als Ladekontrolle. RMS-Zellen nach Behandlung mit L-Zell-Medium dienten der Kontrolle. Unten: Quantifizierung der β -Catenin-Expression. Die β -Catenin-Expression wurde auf β -Actin normalisiert; mit L-Zell-Medium behandelte Zellen wurden auf 100% festgelegt (schwarze Balken). Hier aufgezeigt ist jeweils die quantitative Analyse eines repräsentativen Western Blots.

3.3 Einfluss einer simultanen Stimulation und Inhibierung auf RMS-Tumorzellen

Inwieweit sich die Proliferationsrate der Zelllinien nach Inhibierung des kanonischen WNT/ β -Catenin-Signaltransduktionsweges verändert, wenn dieser zeitgleich durch WNT3A stimuliert wird, zeigt Abbildung 3.7. Wie bereits dargestellt (Abbildung 3.2 und 3.5) führt sowohl eine Inhibierung mit FH535 in allen Zelllinien, als auch eine Stimulation des kanonischen WNT-Signalweges mit WNT3A in der FLOH1- und RD-Zelllinie zu einer Senkung der Proliferationsrate. Gleichzeitige Stimulation mit

WNT3A und Inhibierung mit FH535 verstärken den beobachteten Effekt und führen bei den FLOH1- und RD-Zelllinien zu einer verminderten Proliferationsrate im Vergleich zur Einzelbehandlung (Abbildung 3.7). Eine simultane Stimulation mit WNT3A-Medium und Inhibierung entweder mit XAV939 oder spezifischer β -Catenin siRNA führt derweil zu keiner maßgeblichen Verminderung der Proliferationsraten bei allen drei Zelllinien.

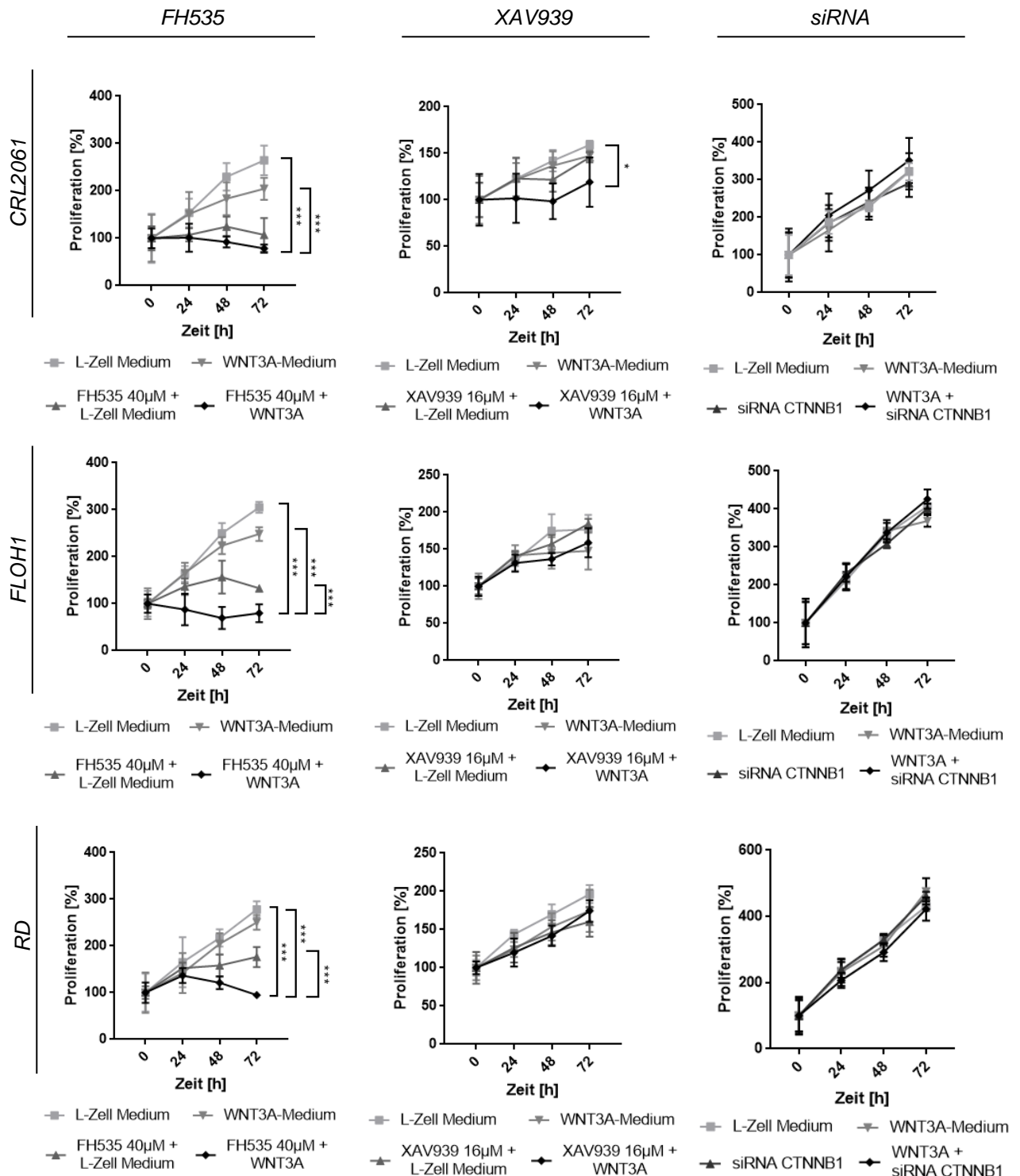


Abbildung 3.7: Einfluss einer simultanen Stimulation und Inhibition/*Knock-down* des kanonischen β -Catenin-Signaltransduktionsweges auf die proliferative Aktivität der RMS-Zelllinien CRL2061, FLOH1 und RD. MTT-Test der RMS-Zelllinien (8×10^3 Zellen/well) über 72 h unter Stimulation (WNT3A-Medium), Inhibition (40 μ M FH535/ 16 μ M XAV939) bzw. *Knock-down* (spezifische β -Catenin siRNA) sowie einer Kombinationsbehandlung aus WNT3A und Inhibierung/*Knock-down*. Die Behandlung erfolgte in Triplikaten in drei (Stimulation und Inhibition) bzw. zwei (Stimulation und *Knock-down*) unabhängigen Versuchen. Dargestellt ist der Mittelwert aller drei Experimente mit der Standardabweichung. * $p < 0,05$; *** $p < 0,005$

3.4 Migrationsverhalten der RMS-Zellen

Da die simultane Inhibierung und Aktivierung des kanonischen Signalweges im Falle von FH535 nicht aber bei XAV939 und spezifischer siRNA Einfluss auf das Proliferationsverhalten der RMS-Zelllinien genommen hat, wurde im nächsten Schritt analysiert, inwieweit die Behandlung Einfluss auf das Migrationsverhalten der Zellen hat. Dazu wurde ein *in-vitro-Scratch-Assay* (siehe Kapitel 2.2.3) durchgeführt, der Analyse des Wanderungs-/Proliferationsverhaltens der Zellen nach Stimulation und Inhibierung des kanonischen WNT-Signalweges dienen soll.

3.4.1 Zellmigration unter Inhibition mit FH535 und XAV939

Abbildung 3.8 zeigt repräsentative Aufnahmen der Zelllinie FLOH1 zu verschiedenen Zeitpunkten und unter Behandlung mit FH535 und XAV939. Die Abnahme der *Scratch*breite dient als Kriterium für die Migrations- und Proliferationsfähigkeit der Zelllinien. Die Behandlung der RMS-Zelllinien mit FH535 führt bei der ARMS-Zelllinie CRL2061 und den ERMS-Zelllinien RD und FLOH1 im Beobachtungszeitraum im Vergleich zu unbehandelten Zellen zu einem signifikanten Unterschied bei fehlender Verminderung der *Scratch*breite. Nach Kultivierung der Zellen mit XAV939 (16 μ M) ergibt sich hingegen kein signifikanter Unterschied im Proliferations- und Migrationsverhalten im Vergleich zur Kontrolle während des 24 stündigen Behandlungszeitraum (Abbildung 3.8 (B)).

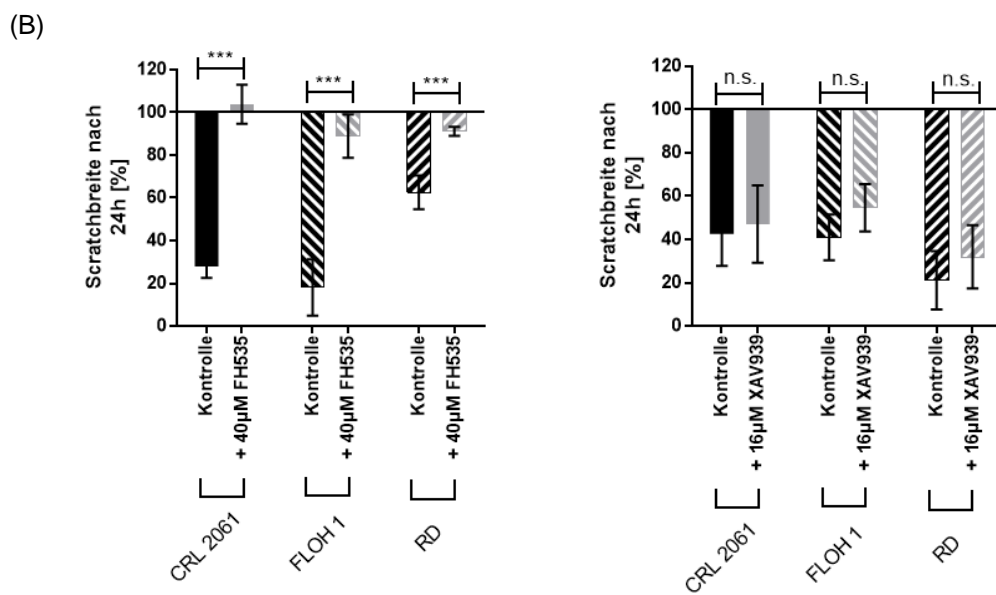
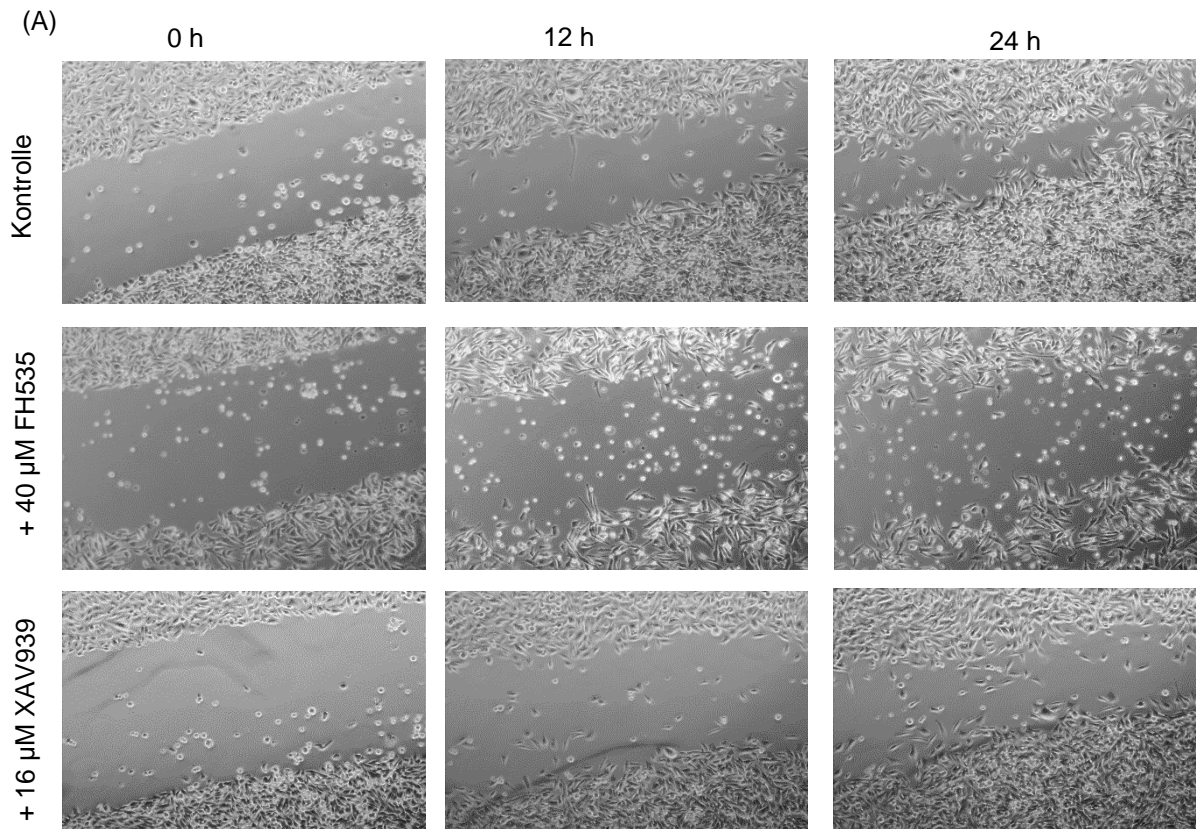


Abbildung 3.8: *In-vitro-Scratch-Assay* (Migrationsassay) der drei RMS-Zelllinien CRL2061, FLOH1 und RD. Die Zellen wurden in einer Zelldichte von 5×10^4 Zellen/well in einer 12-well Platte ausgesät. Nach 24 h Präinkubation wurde der konfluente Zellrasen mit einer 200 µl-Pipettenspitze durchbrochen und die Zellen mit 40 µM FH535 oder 16 µM XAV939 behandelt. Zur Kontrolle dienen unbehandelte Zellen. (A) Exemplarische mikroskopische Aufnahmen der Veränderung der Spaltbreite bei FLOH1 nach 0 h, 12 h und 24 h nach Behandlung mit FH535 und XAV939. Die Kontrolle zeigt unbehandelte Zellen; Vergrößerung X50. (B) Abnahme der *Scratch*breite nach Behandlung der drei Zelllinien mit

40µM FH535 (links) und 16µM XAV939 (rechts) nach 24 h . Die *Scratch*breite zum Zeitpunkt 0 h wurde mit 100% angenommen. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert aus drei unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung des Mittelwertes. *** p < 0,005

3.4.2 Zellmigration unter Stimulation mit WNT3A

Die Inhibierung des kanonischen β -Catenin-Signalweges wirkt sich nur bei FH535 auf Zellwachstum und Migrationsverhalten aus. Für die Inhibierung mit XAV939 wurde keine wesentliche Beeinträchtigung nachgewiesen. Im Gegensatz dazu vermindert die Stimulation der Zellen mit WNT3A die Proliferationsrate in der FLOH1-Zelllinie (siehe Abbildung 3.5). Auch im *Scratch*-Test wurde eine verminderte Migration/Proliferation der Tumorzellen beobachtet. Wie Abbildung 3.9 zeigt führt die Zugabe von konditioniertem WNT3A-Medium zu einer verminderten Proliferation/Migration aller drei untersuchten RMS-Zelllinien im Vergleich zu den mit L-Zell Medium behandelten Kontrollen.

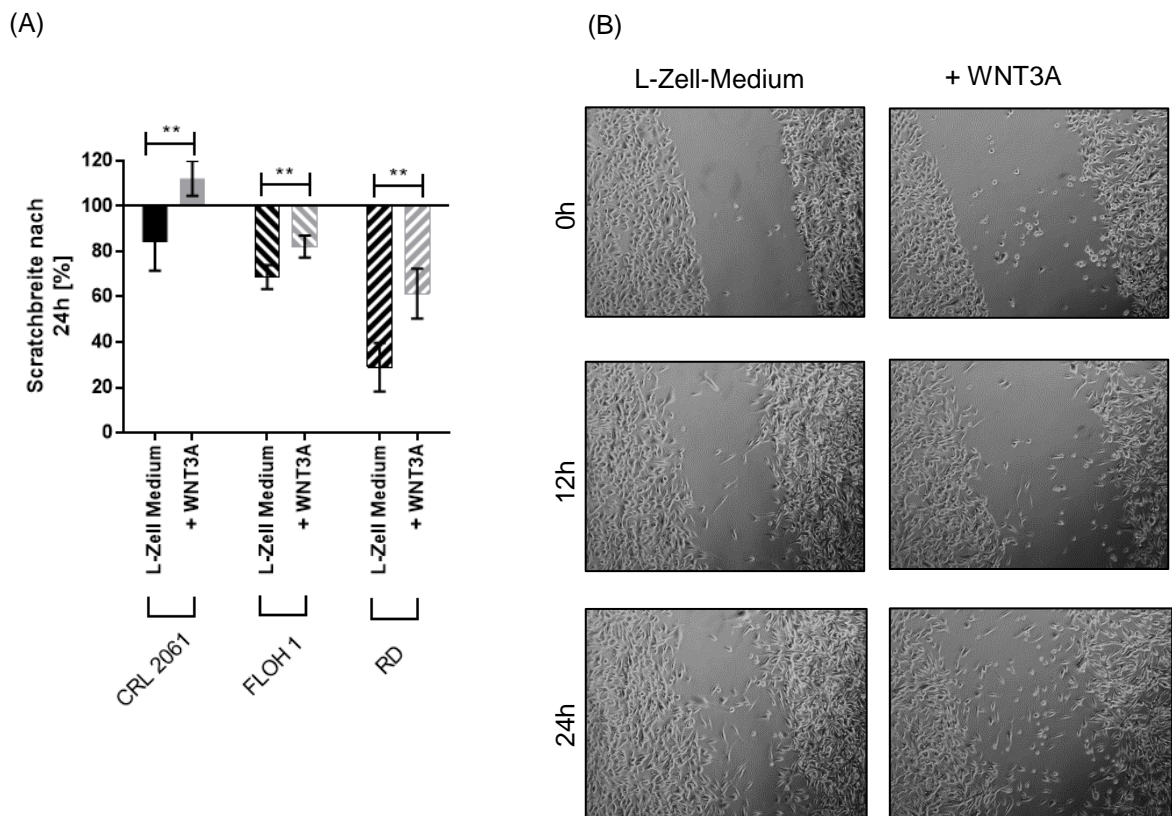


Abbildung 3.9: *In-vitro-Scratch-Assay* (Migrationsassay) bei den drei RMS-Zelllinien CRL2061, FLOH1 und RD. Die Zellen wurden in einer Zelldichte von 5×10^4 Zellen/well in einer 12-well Platte ausgesät. Nach 24 h Präinkubation wurde der Zellrasen mit einer 200 µl-Pipettenspitze durchbrochen und die Zellen mit WNT3A-Medium für 24 h behandelt. Zur Kontrolle dient die Behandlung der Zellen mit L-Zell-Medium. (A). Balkendiagramm nach Behandlung der drei Zelllinien mit WNT3A-Medium nach

24 h (B) Repräsentative mikroskopische Aufnahmen der Veränderung der *Scratch*breite der RD-Zelllinie nach 0 h, 12 h und 24 h nach Behandlung mit WNT3A-Medium. Dargestellt sind jeweils der Mittelwert aus drei unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung des Mittelwertes.
** $p < 0,01$

3.4.3 Zellmigration unter simultaner Inhibition und Stimulation

Im weiteren Schritt wurde untersucht, welchen Effekt die Inhibierung des kanonischen WNT-Signalweges bei gleichzeitiger Stimulation hat. Abbildung 3.10 zeigt, dass die gleichzeitige Behandlung der Zellen mit 40 μM FH535 und WNT3A-Medium zu einer Zunahme der *Scratch*breite führt (siehe (A)). Auch hier konnten bereits mit dem L-Zell-Medium, das eigentlich als Kontrolle zum WNT3A-Medium dienen sollte, ähnliche aber mildere Effekte beobachtet werden. Bei der Betrachtung der mikroskopischen Aufnahmen fällt auf, dass sich die RMS-Zellen unter diesen Bedingungen vom Plattenboden gelöst haben (siehe (C)). Die Inhibierung bzw. Stimulation des kanonischen β -Catenin-Signalweges mit FH535 bzw. WNT3A hemmt in beiden Fällen Proliferation/ Migration der RMS-Zellen. Dieser Effekt wird durch die simultane Behandlung der Zellen mit beiden Wirkstoffen verstärkt. Bei simultaner Behandlung der Zellen mit 16 μM XAV939 und WNT3A konnte dieser Effekt für die ARMS-Zelllinien nicht nachgewiesen werden, die ERMS-Zelllinie (RD) hingegen zeigt ein geringeres Migrations-/Proliferationsverhalten bei simultaner Behandlung im Vergleich zu unbehandelten Zellen und alleiniger Inhibierung mit XAV939 (siehe (B)).

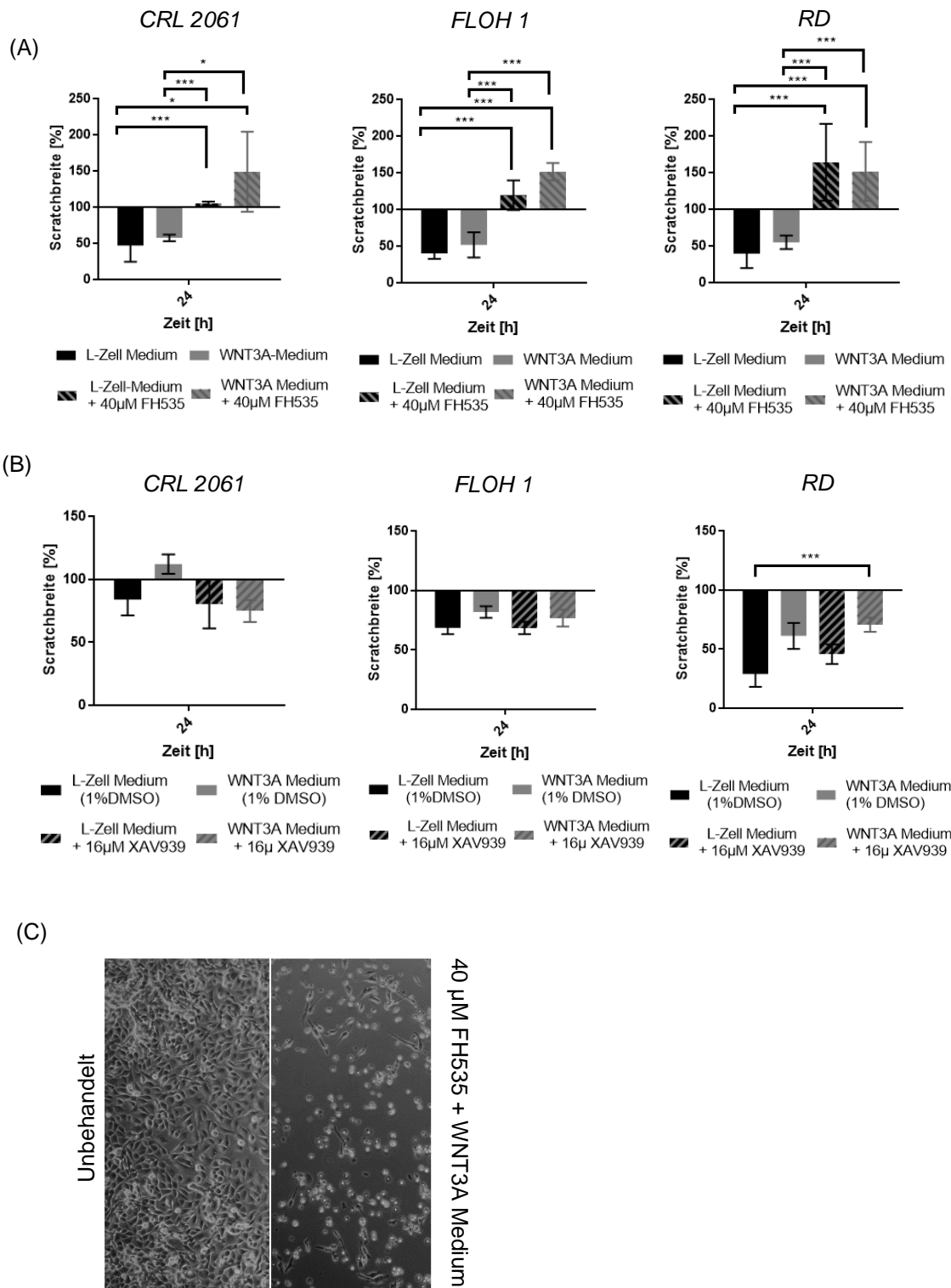


Abbildung 3.10: *In-vitro-Scratch-Assay* (Migrationsassay) der drei RMS-Zelllinien CRL2061, FLOH1 und RD. Die Zellen wurden in einer Zelldichte von 5×10^4 Zellen/well in einer 12-well Platte ausgesät. Nach 24 h Präinkubation wurde der Zellrasen mit einer 200 µl-Pipettenspitze durchbrochen und die Zellen mit L-Zell-Medium, WNT3A-Medium bzw. einer Kombination aus L-Zell-Medium/WNT3A-Medium und einem Inhibitor (40µM FH535 oder 16 µM XAV939) für 24 h behandelt. (A) Balkendiagramm nach Behandlung der drei Zelllinien mit L-Zell-Medium, WNT3A-Medium, L-Zell-Medium + 40 µM FH535 und WNT3A-Medium + 40µM FH535 (von links nach rechts) nach 24 h. (B)

Balkendiagramm nach Behandlung der drei Zelllinien mit L-Zell-Medium (1% DMSO), WNT3A-Medium (1% DMSO), L-Zell-Medium + 16 μ M XAV939 und WNT3A-Medium + 16 μ M XAV939 (von links nach rechts) nach 24 h. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert aus drei unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung des Mittelwertes, * $p < 0,05$, *** $p < 0,005$ (C) Repräsentative mikroskopische Aufnahme der ARMS-Zelllinie CRL2061 nach 24 h Kultivierung ohne Behandlung (links) und gleichzeitiger Behandlung mit 40 μ M FH535 und WNT3A-Medium (rechts). Vergrößerung X50

3.5 Auswirkung einer Inhibition und Stimulation des kanonischen WNT/ β -Catenin-Signaltransduktionsweges auf die Apoptose

Inwieweit die unter den Abschnitten 3.2 und 3.3 beschriebenen Effekte im Proliferations- und Migrationsverhalten der RMS-Zelllinien auf einen verstärkten Zelltod zurückzuführen sind, wurde im Folgenden untersucht. Dazu wurden die RMS-Zelllinien nach Behandlung mit FH535 bzw. WNT3A mit Annexin V / Propidiumiodid gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert.

In Abbildung 3.11 kann man zunächst die Auswirkung von 40 μ M FH535 auf das Apoptoseverhalten sehen. Sowohl der Anteil Annexin V-einfach-positiver (früh-apoptotisch), als auch der Anteil doppelt-positiver-Zellen (spät-apoptotisch und nekrotisch) nimmt in allen drei RMS-Zelllinien, besonders aber bei der ERMS-Zelllinie (RD) nach 48 stündiger Inkubation mit 40 μ M FH535 zu.

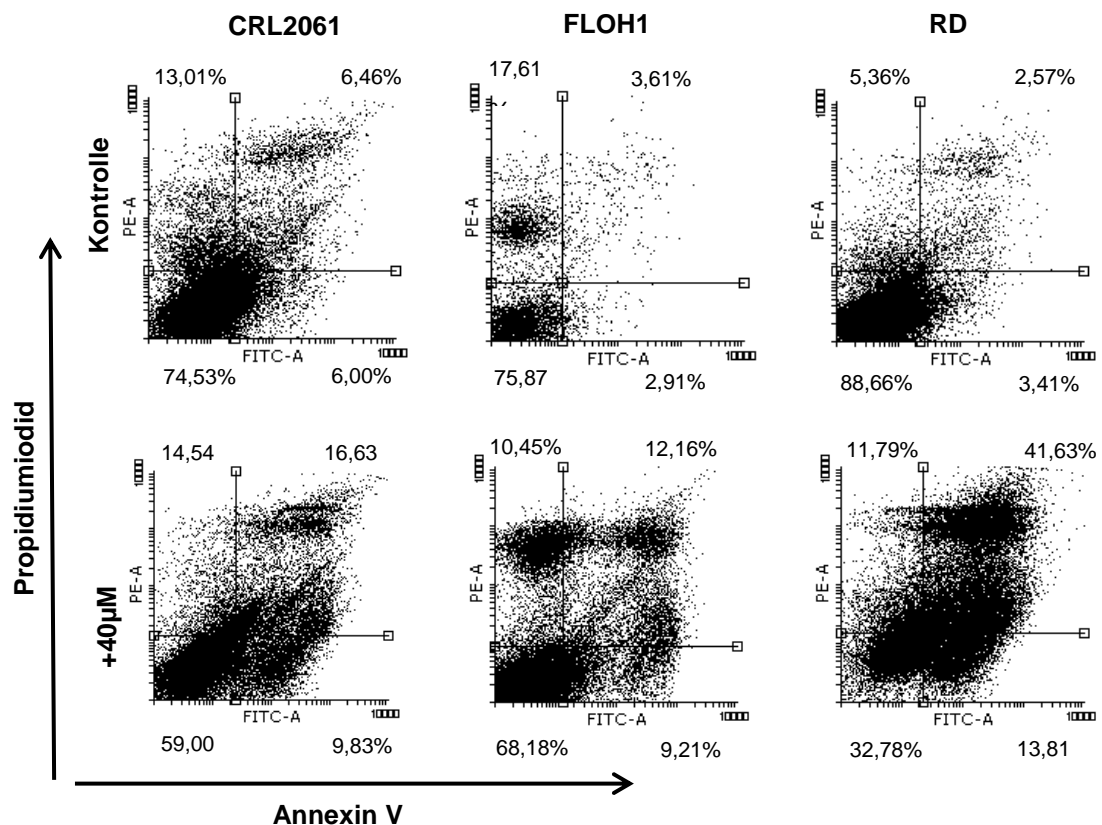


Abbildung 3.11: Einfluss des kanonischen WNT-Signalweg-Inhibitors FH535 (40 μ M) auf die Apoptose der drei RMS-Zelllinien. Zur Kontrolle dienen unbehandelte Zellen. Zu sehen ist ein *Dot-Blot* einer Annexin V/PI-Färbung nach 48 h Inkubationszeit.

Die Stimulation mit WNT3A-Medium hingegen hat keine apoptotische Wirkung (Abbildung 3.12).

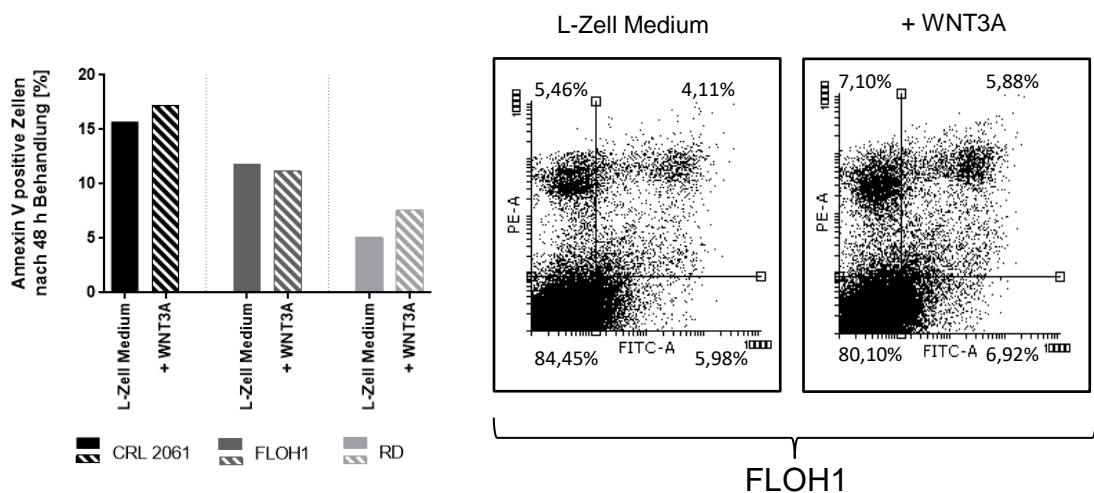


Abbildung 3.12: Einfluss einer Stimulation des kanonischen WNT-Signalweges mit WNT3A auf die Apoptose der drei RMS-Zelllinien (CRL2061, FLOH1, RD) nach 48 h Behandlung. Zur Kontrolle dienen mit L-Zell-Medium behandelte Zellen. Im Balkendiagramm (links) ist der prozentuale Anteil Annexin V-positiver Zellen nach 48 h Behandlung dargestellt. Der *Dot-Blot* (rechts) zeigt exemplarisch eine Annexin V/PI-Färbung nach 48 h Inkubationszeit mit bzw. ohne Stimulation mit WNT3A an der translokationsnegativen ARMS-Zelllinie (FLOH1). Hier dargestellt ist ein repräsentatives Experiment nach 3-facher unabhängiger Messung.

Eine simultane Inhibition und Stimulation (WNT3A-Medium und 40 μ M FH535) zeigt im Proliferations- und Migrationsverhalten (siehe Kapitel 3.2 und 3.3) den größten hemmenden Effekt. In Bezug auf die Apoptose zeigt sich auch hier, dass die simultane Behandlung der Zelllinien nach 48 h zu einer verstärkten Apoptose führt (siehe Abbildung 3.13).

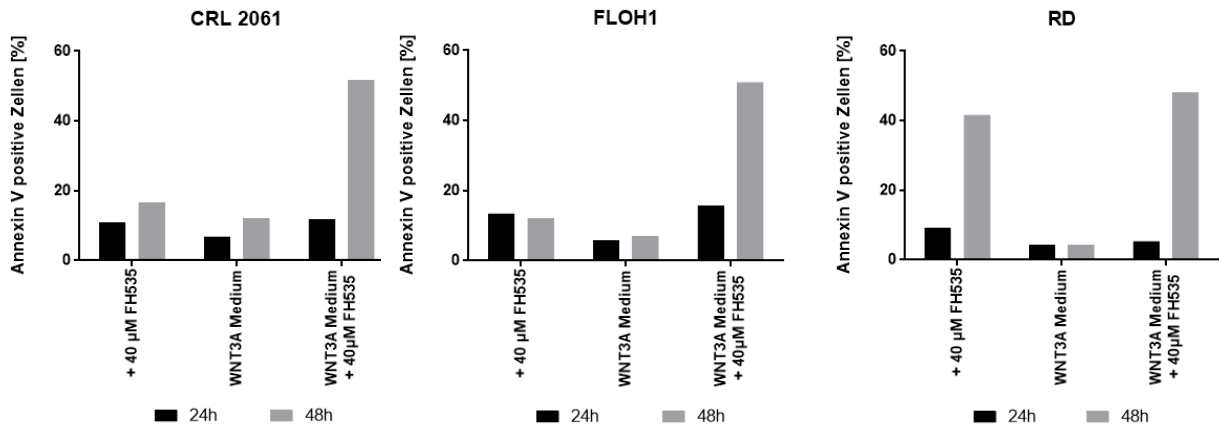


Abbildung 3.13: Einfluss einer simultanen Stimulation und Inhibition des kanonischen WNT-Signalwegs mit WNT3A und FH535 auf die Apoptose der drei RMS-Zelllinien (CRL2061, FLOH1, RD) und die Einzelbehandlung mit WNT3A-Medium oder 40 µM FH535 nach 24 h und 48 h Behandlung. Zur Kontrolle dienen unbehandelte Zellen. Im Balkendiagramm ist der prozentuale Anteil Annexin V-einfach und AnnexinV/PI-doppelt-positiver Zellen nach 24 h bzw. 48 h Behandlung dargestellt.

3.6 Auswirkung der Stimulation und Inhibierung des kanonischen WNT/ β -Catenin-Signaltransduktionsweges auf die Expression muskuläre Differenzierungsgene

Da die Stimulation mit WNT3A-Medium keinen Effekt auf die Apoptoserate hat, jedoch Veränderungen im Proliferations- und Migrationsverhalten der RMS-Zellen bedingt, wurde im nächsten Schritt untersucht, ob sich die Differenzierung der RMS-Zellen verändert. Dazu wurde die Expression ausgewählter muskulärer Differenzierungsgene untersucht.

3.6.1 Inhibition und β -Catenin-*Knock-down*

Abbildung 3.14 zeigt den Einfluss der beiden pharmakologischen Inhibitoren FH535 und XAV939 sowie eines spezifischen β -Catenin *Knock-down* auf die Expression muskulärer Differenzierungsgene (CHRNA3 (fetaler Acetylcholinrezeptor), CKM, Desmin und Myogenin) und die Expression des β -Catenin auf RNA-Ebene. Eine Inhibition des kanonischen WNT-Signalweges mittels FH535 und XAV939 hat in keiner der untersuchten Zelllinien Einfluss auf die Expression des β -Catenin (*CTNNB1*) auf RNA-Ebene (Abbildung 13 A, B). Ein *Knock-down* mittels β -Catenin-spezifischer siRNA reduziert hingegen, wie erwartet, in allen drei Zelllinien die Expression des β -Catenin (siehe Abbildung 13 C).

Die Expressionsprofile der untersuchten Zelllinien in Bezug auf die Expression muskulärer Differenzierungsgene weisen abhängig vom eingesetztem Inhibitor oder der Behandlung mit siRNA keine signifikanten Unterschiede auf. Nach Behandlung mit FH535 zeigt sich jedoch tendenziell eine Herabregulation einiger untersuchter Muskeldifferenzierungsgene, speziell von Myogenin und des fetalen Acetylcholinrezeptors bei der ARMS-Zelllinie CRL2061 und der ERMS-Zelllinie RD. Die Expression bei FLOH1 bleibt davon unbeeinflusst. Die Behandlung mit XAV939 oder eines siRNA-abhängigen β -Catenin-*Knock-downs* scheint hingegen keinen signifikanten Einfluss auf die Geneexpression der untersuchten Gene zu haben. (siehe (B) und (C)).

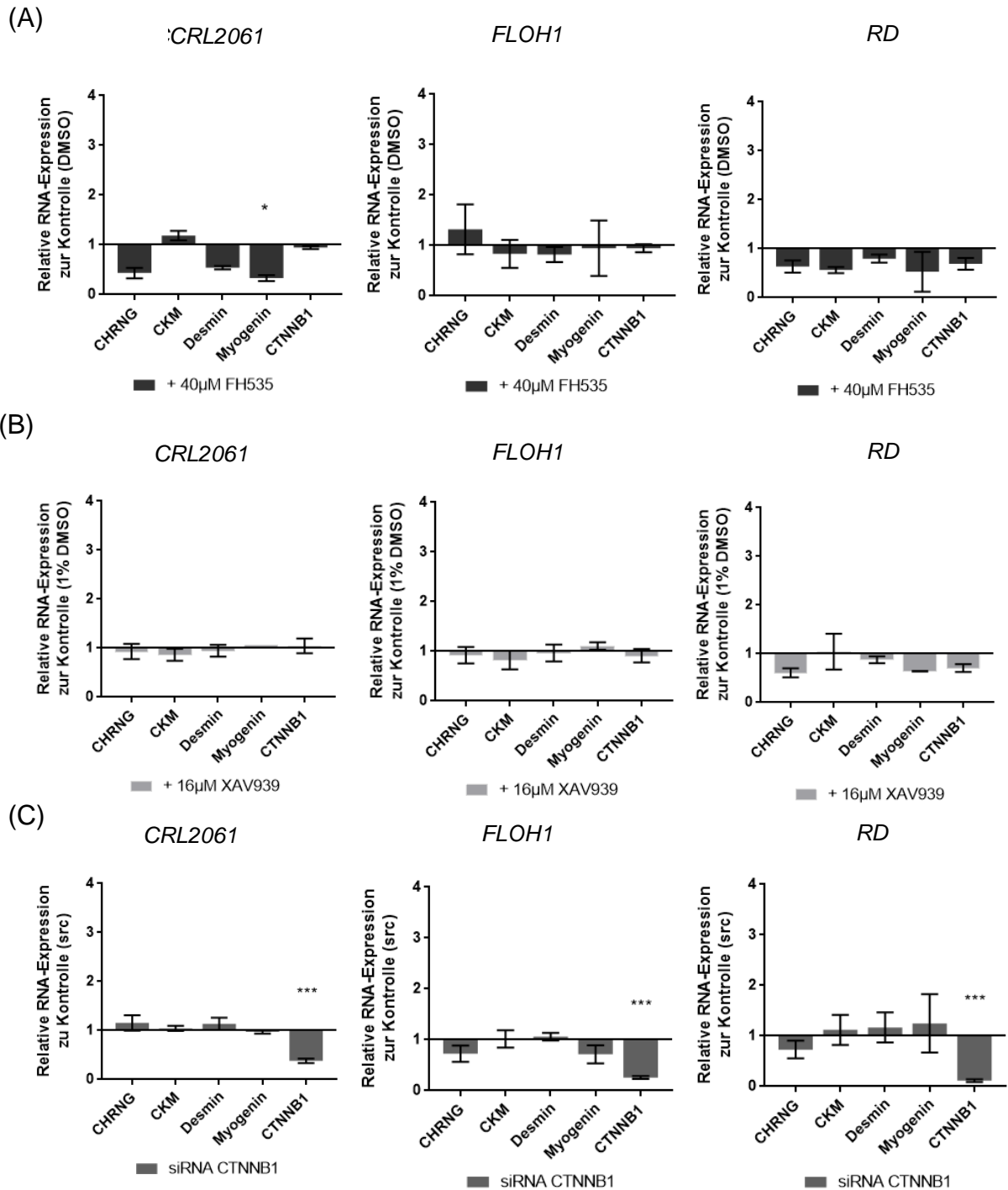
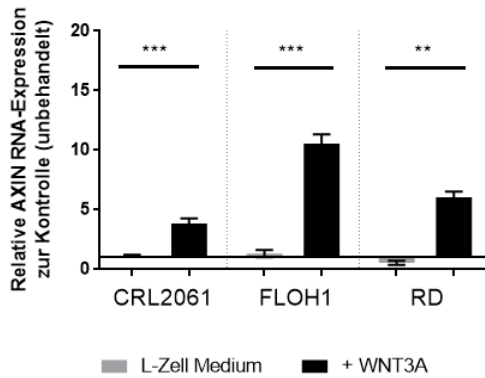


Abbildung 3.14: qRT-PCR Analyse der RMS-Zelllinien CRL2061, FLOH1 und RD hinsichtlich der Expression von *CHRNG*, *CKM*, *Desmin*, *Myogenin* und *CTNNB1* nach Behandlung der Zellen mit 40 μM FH535 (A), 16 μM XAV939 (B) und einer spezifischen β -Catenin siRNA (C) für jeweils 48 h. Als Kontrolle dienen mit DMSO behandelte oder mit *scr*-transfizierte Kontroll-Zellen, deren Expression als 1 angenommen wird. Die Expression in den RMS-Zellen wurde zu *GAPDH* normalisiert. Dargestellt sind der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten, die jeweils in Duplikaten gemessen wurden und deren Standardfehler (SEM). * $p < 0.05$, *** $p < 0.005$

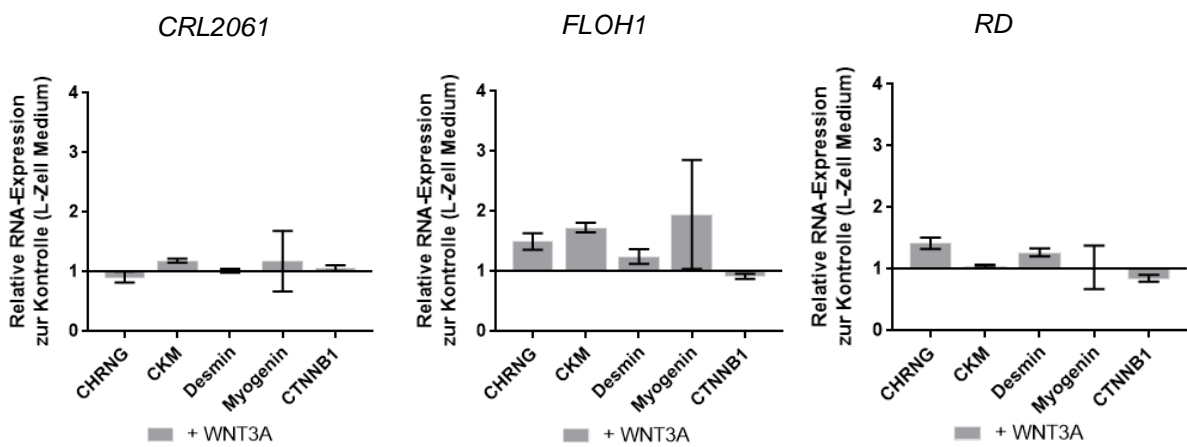
3.6.2 Stimulation des kanonischen WNT-Signalweges mittels WNT3A

In Abbildung 3.15 ist zu sehen, dass eine Stimulation des kanonischen WNT-Signalweges mittels WNT3A in allen drei RMS-Zelllinien zu einer signifikanten RNA-Expressionssteigerung des *AXIN2*, einem Ziel- und Kontrollgen der WNT3A-Stimulation, führt (siehe (A)). Weiterhin findet sich in allen drei untersuchten Zelllinien hinsichtlich des Expressionsprofils myogener Differenzierungsgene (*Desmin*, *CKM*, *CHRNA* und *Myogenin*) keine signifikante Veränderung der Genexpression (siehe (B)). Es zeigt sich eine gering erhöhte Expression der Gamma-Untereinheit des fetalen Acetylcholinrezeptors (*CHRNA*) und der muskulären Kreatin-Kinase (*CKM*) in der translokationsnegativen ARMS-Zelllinie FLOH1. Das Zielgen der Stimulation mit WNT3A, das β -Catenin (*CTNNA1*), zeigt in allen drei Zelllinien keine signifikant erhöhte Expression auf RNA-Ebene. Nach Stimulation mit WNT3A erfolgt der Kerntransfer des β -Catenin, um dessen Zielgene zu transkribieren. Hierfür wurde eine Immunfluoreszenzanalyse durchgeführt (siehe (C)) und zeigte bei Behandlung mit WNT3A-Medium diese Kernlokalisierung des β -Catenin. Bei Behandlung mit dem L-Zell-Medium konnte der Kerntransfer bzw. eine Kernlokalisierung nicht gezeigt werden.

(A)



(B)



(C)

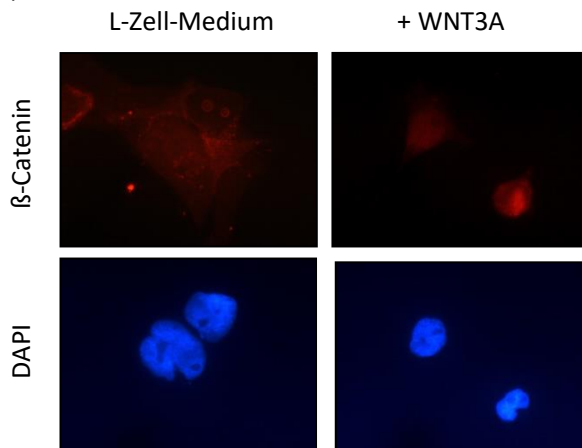


Abbildung 3.15: (A) qRT-PCR Analyse der RNA-Expression des β -Catenin-Zielgens *AXIN2* (A) sowie der muskulären Differenzierungsmarker (*CHRNG*, *CKM*, *Desmin* und *Myogenin*) und *CTNNB1* (B) und Immunfluoreszenzanalysen der β -Catenin-Expression nach Behandlung der RMS-Zelllinien mit WNT3A (C). (A) und (B): qRT-PCR-Analyse der RMS-Zellen nach Behandlung mit WNT3A-Medium für 48 h. Als Kontrolle dienten mit L-Zell-Medium behandelte Zellen. Die Expression in den RMS-Zellen wurde zur *GAPDH*-Expression normalisiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten, die jeweils in Duplikaten gemessen wurden sowie deren Standardfehler (SEM). ** $p < 0.01$; *** $p < 0.005$ (C): Immunfluoreszenzanalyse der β -Catenin-Expression (Texas Red)

am Beispiel der translokationspositiven ARMS-Zelllinie (CRL2061) nach Behandlung mit WNT3A-Medium für 6 h. Zur Kerngegenfärbung wurde DAPI verwendet. Als Kontrolle dienen mit L-Zell-Medium behandelte Zellen.

Eine simultane Inhibierung des kanonischen WNT/ β -Catenin-Signalweges mit FH535, XAV939 oder einer β -Catenin-spezifischen siRNA wiederum reprimiert die Expression des WNT3A-Zielgenes *AXIN2* und belegt die Wirkung der untersuchten Inhibitoren (siehe Abbildung 3.16).

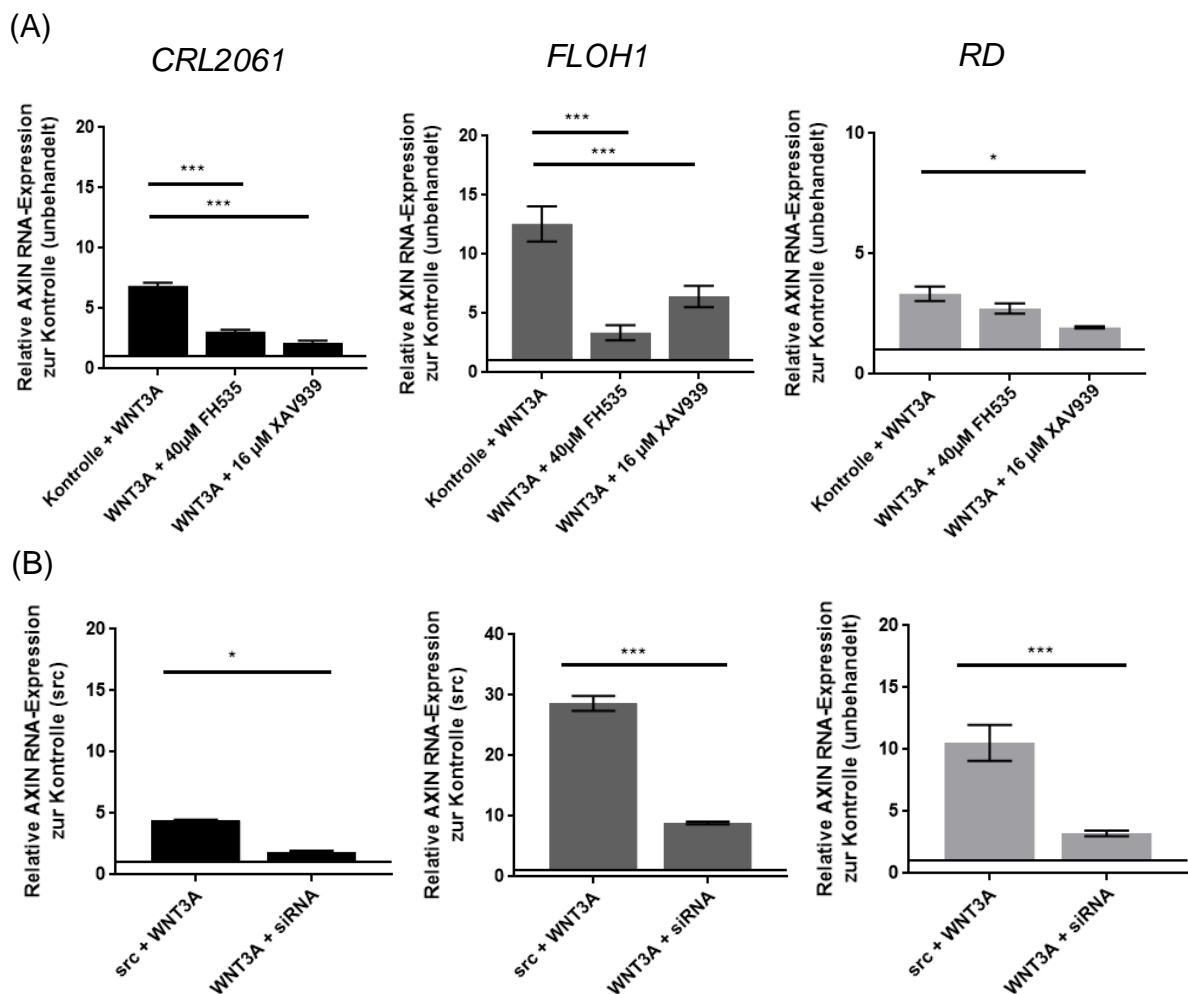


Abbildung 3.16: qRT-PCR Analyse der RNA-Expression des β -Catenin-Zielgens *AXIN2* nach Behandlung der RMS-Zelllinien mit simultaner Inhibierung (FH535 bzw. XAV939) und Stimulation mit WNT3A (A) sowie nach Behandlung mit der β -Catenin-spezifischen siRNA und WNT3A (B). Als Kontrolle dienen unbehandelte (A) oder mit *src*-transfizierte Zellen (B), deren Expression als 1 angenommen wird. Die Expression in den RMS-Zellen wurde zu *GAPDH* normalisiert. Dargestellt sind der Mittelwert aus zwei unabhängigen Experimenten, die jeweils in Duplikaten gemessen wurden und der Standardfehler (SEM). * $p < 0.05$, *** $p < 0.005$

4 DISKUSSION

Die Fehlregulation des kanonischen WNT/ β -Catenin-Signaltransduktionsweg spielt eine wesentliche Rolle bei der Tumorgenese verschiedener maligner Tumore, wie z.B. dem primären hepatozellulärem Karzinom, dem Ovarialkarzinom oder auch dem kolorektalem Karzinom^{82, 133, 134}. Mechanismen, die zur Aktivierung des kanonischen WNT/ β -Catenin-Signalweges in diesen Tumoren führen, resultieren in einer verstärkten Proliferation der Tumorzellen durch Aktivierung von Zellzyklusgenen^{79, 135}, einer erhöhten Metastasierungs- und einer verminderten Apoptoserate sowie einer eingeschränkten Differenzierung der Tumorzellen¹³⁶. Während der Embryogenese hingegen, ist die Aktivierung des kanonischen WNT/ β -Catenin-Signalweges entscheidend für die Differenzierung^{96, 137}. Bei humanen embryonalen Stammzellen (hESC) konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung des Signalweges für die Differenzierung von Stammzellen eine entscheidende Rolle spielt¹³⁸. Damit scheint der kanonische WNT/ β -Catenin-Signalweg abhängig vom zellulären Kontext sowohl die Differenzierung, wie bei humanen embryonalen Stammzellen gezeigt, als auch die Proliferation und Metastasierung bei vielen Tumorzellen, zu steuern.

Bei vielen der bereits untersuchten kindlichen Tumoren ließ sich durch die Aktivierung des kanonischen WNT/ β -Catenin-Signalweges eine tumorfördernde Wirkung nachweisen¹³⁹⁻¹⁴¹. Folgerichtig konnte gezeigt werden, dass die Inhibierung des Signalweges durch XAV939 sowohl beim Medulloblastom¹⁴² als auch beim Neuroblastom¹⁴³ eine tumorinhibierende Wirkung aufweist. Welche Wirkung β -Catenin-Inhibitoren auf RMS-Tumore besitzen, wurde bisher kaum untersucht, und wenig ist über den Einfluss des kanonischen WNT/ β -Catenin-Signalweges bei RMS bekannt. Einige Arbeiten konnten zeigen, dass, ähnlich wie bei hESC beobachtet, eine β -Catenin Aktivierung zur Differenzierung von RMS-Tumorzellen führen kann^{105, 107, 108}, wohingegen andere Arbeiten dem kanonischen WNT/ β -Catenin-Signalweg keinerlei Bedeutung für Tumorprogression, Metastasierung oder Differenzierung von RMS beimessen¹⁴⁴. Die Verwendung verschiedener β -Catenin-Inhibitoren erlaubte in der vorliegenden Arbeit einen Perspektivwechsel der den kanonischen WNT/ β -Catenin-Signalweg an einer bisher nicht untersuchten Stelle unterbricht und somit eine Neueinordnung der bisher beschriebenen Ergebnisse ermöglicht.

4.1 Die Inhibierung des kanonischen WNT/ β -Catenin-Signalweges hat keinen Effekt auf das Wachstum und die Differenzierung von RMS-Tumorzellen

Eine aktivierende Mutation bzw. eine Dysregulation der Regulatorproteine des β -Catenin-Signalweges führen in einigen malignen Tumoren, wie z.B. dem kolorektalen Karzinom zu einer Überexpression von β -Catenin⁸⁵. Die Inhibition des kanonischen β -Catenin-Signalweges führt folgerichtig zu einem verminderten Tumorstadium *in vivo* und einer geringeren Proliferations- und Migrationsrate *in vitro*¹⁴⁵⁻¹⁴⁷. Zurzeit werden diverse Inhibitoren, die an unterschiedlichen Punkten der WNT-Signalkaskade wirken, in klinischen Studien erprobt^{148, 149}. Bislang sind für RMS-Tumoren in der Literatur nur sieben Fälle mit aktivierenden β -Catenin-Mutationen beschrieben worden¹⁵⁰⁻¹⁵². In sechs Fällen wurde die Mutation im ERMS und eine einzige Mutation in einem translokationsnegativen ARMS nachgewiesen. Die Spannweite des Tumorstadiums (IRS-modifiziertes TNM-Stadium¹⁵³) der sieben Patientenproben reicht von Stadium 1 bis 4. In der Mehrzahl der untersuchten Fälle wurden bei RMS-Tumoren allerdings weder eine β -Catenin-Mutationen entdeckt, noch konnte eine nukleäre Lokalisierung von β -Catenin gezeigt werden^{107, 154}, was als Voraussetzung für die Aktivierung des kanonischen WNT/ β -Catenin-Signalweges gilt¹⁵⁵. In jedem Fall ist offensichtlich, dass die drei von mir in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien für das gesamte Spektrum klinisch vorkommender RMS nicht repräsentativ sind. Es konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass eine Inaktivierung des Signaltransduktionsweges mittels spezifischem *Knock-down* (β -Catenin siRNA) bzw. Inhibition mit dem β -Catenin-Inhibitor XAV939 *in vitro* weder zu einer verminderten Proliferations-, und Migrationsrate führt, noch einen Einfluss auf die muskuläre Differenzierung der RMS-Zelllinien hat. Im Gegensatz dazu führte eine Behandlung mit dem β -Catenin-Inhibitor FH535 zu einer signifikanten Inhibierung der Proliferation und Migration in allen RMS-Zelllinien und zu einer verminderten Expression von Differenzierungsgenen bei CRL2061 und RD Zellen. Gleichzeitig kam es zu einer effektiven Induktion der Apoptose in den untersuchten Zelllinien. Dieser antiproliferative und proapoptotische Effekt von FH535 wurde bereits für Kolon-, Mamma- und hepatozelluläre Karzinome beschrieben¹⁵⁶⁻¹⁵⁸.

Grund dieser Diskrepanzen zwischen den Inhibitoren ist ein *off-target*-Effekt von FH535, das nicht nur den kanonischen WNT/ β -Catenin-Signalweg, sondern zusätzlich den Peroxisom- Proliferator-*activated*-Rezeptor-Signalweg (PPAR) blockiert, weil es eine strukturelle Ähnlichkeit mit dem PPARy-Antagonist GW9662

aufweist^{112, 114}. Tatsächlich konnte im Rahmen einer laborinternen Masterarbeit gezeigt werden, dass eine FH535- nicht aber eine XAV939-Behandlung die PPAR γ -Expression auch bei RMS-Tumorzellen auf Proteinebene vermindert (nicht in dieser Arbeit dargestellt). Da die beschriebenen Effekte auf Proliferation, Migration, Apoptose und Differenzierung (vorrangig bei CRL2061 und RD) lediglich im Falle einer FH535, nicht aber bei der Behandlung mit spezifischer β -Catenin siRNA oder XAV939 auftraten, scheint eine Einflussnahme von PPAR γ/δ auf das RMS-Wachstum wahrscheinlich. Dabei ist die Herabregulation der Differenzierungsgene (bei CRL2061 und RD) am ehesten über die verstärkte Apoptoseinduktion durch FH535 zu erklären, in deren Verlauf die Genexpression gestoppt und der schrittweise Zellabbau beginnt. Auch dies konnte mit spezifischen PPAR γ/δ -Inhibitoren bei RMS-Tumorzellen in einer laborinternen Masterarbeit gezeigt werden. Die spezifische Inhibierung des kanonischen WNT/ β -Catenin-Signalweges hat allerdings keinen Einfluss auf die untersuchten RMS-Tumorzellen.

4.2 Der kanonische WNT/ β -Catenin-Signalwege ist in RMS-Tumorzellen aktivierbar

Annavarapu et al. zeigten anhand von Immunfluoreszenzanalysen *in vitro*, dass eine Stimulation des kanonischen WNT/ β -Catenin-Signalweges mit dem physiologischen Liganden, rekombinantem WNT3A (rWNT3A), möglich ist und zu einer perinukleären/nukleären Translokation von β -Catenin führt¹⁰⁶. Zudem zeigten diese Autoren, dass in den von ihnen untersuchten Zelllinien alle relevanten Proteine der Signalkaskade, wie z.B. GSK3 β , Dishevelled, Axin und LRP6, exprimiert werden, und eine Stimulation mit rWNT3A zur β -Catenin vermittelten Aktivierung eines TOP/FOP-Reporterassays führt. Daher ist davon auszugehen, dass der Signalweg selbst intakt ist¹⁰⁷. Andere Arbeiten konnten darüber hinaus zeigen, dass der Signalweg beim RMS auch pharmakologisch stimulierbar ist^{105, 108}. So nutzen Chen et al. für die Stimulierung einen Glykogen-Synthase-Kinase-3-Inhibitor (GSK3) und konnten eine Induktion von *AXIN2* und eine positive nukleäre β -Catenin-Expression nachweisen¹⁰⁸. Singh et al. hingegen verwendeten für die Analysen embryonale Rhabdomyosarkomzellen, die aus Tumoren einer *p53*^{-/-}/*c-fos*^{-/-}-doppelmultierten Maus entnommen wurden und stimulierten den kanonischen WNT/ β -Catenin-Signalweg mittels Lithiumchlorid (LiCl)¹⁰⁵. Auch in der hier vorliegenden Arbeit konnte nach Stimulation von RMS-Tumorzellen mit WNT3A-konditioniertem-Medium gezeigt

werden, dass der Signalweg funktionell aktiv ist und zur Induktion von *AXIN2* in allen drei verwendeten Zelllinien führt. Neben einer β -Catenin-Translokation in den Zellkern weisen WNT3A-behandelte Zellen im Western Blot eine höhere β -Catenin-Proteinmenge, aufgrund der Inaktivierung des Destruktionskomplexes, auf¹⁵⁹. Die Aktivierbarkeit des kanonischen WNT/ β -Catenin-Signalweges konnte somit nachgewiesen werden, allerdings lassen die im Zuge der Arbeit durchgeführten Blockadeexperimente vermuten, dass der kanonische WNT-Signalweg bei RMS-Tumorzellen *in vitro* inaktiv ist und Proliferation oder Migration nicht beeinflusst.

Vor diesem Hintergrund stellte sich daher die Frage, ob, ähnlich wie bei hESC¹³⁸, die Aktivierung des kanonischen WNT-Signalweges die myogene Differenzierung von RMS induzieren bzw. die ‚natürlich‘ Inaktivität des Signalswegs zur bekannten Differenzierungsblockade von RMS Tumorzellen beitragen könnte.

4.3 Die Stimulation des kanonischen β -Catenin-Signalweges hat keinen Einfluss auf die myogene Differenzierung oder Proliferation der verwendeten RMS- Zelllinien

Tatsächlich konnten Annavarapu et al. zeigen, dass eine Stimulation des kanonischen WNT/ β -Catenin-Signalweges mit rekombinantem WNT3A zu einer signifikanten verminderten proliferativen Aktivität und einer Induktion der myogenen Differenzierungsmarker Myogenin, MyoD und Myf5 in den untersuchten ARMS-Zelllinien (Rh4 und Rh30), nicht jedoch in den ERMS-Zelllinien (RD und RD18) führt¹⁰⁷. Anhand dieser Ergebnisse folgerten die Autoren, dass nach WNT-Stimulation eine β -Catenin-abhängige myogene Differenzierung in den ARMS-Zelllinien eingeleitet wird, der Signalweg eine mögliche tumorsuppressive Rolle spielt¹⁰⁷ und ähnliche Funktionen wie bei der Differenzierung von hESC übernimmt¹³⁸. Die vorliegende Arbeit konnte die von Annavarapu et al. beschriebenen Ergebnisse nur bedingt reproduzieren. Sowohl eine erhöhte proliferative Aktivität als auch eine erhöhte Expression und somit Induktion myogener Differenzierungsmarker, wie z.B. Myogenin oder Desmin, konnte in der verwendeten ERMS-Zelllinie RD und der translokationspositiven ARMS-Zelllinien CRL2061 nach WNT3A-Behandlung nicht nachgewiesen werden. Zwar wies die translokationsnegative ARMS-Zelllinie FLOH1 nach Stimulationsbehandlung mit WNT3A-konditioniertem Medium eine signifikant verminderte Proliferationsaktivität auf, konnte jedoch in den Expressionsanalysen der myogenen

Differenzierungsmarker auf RNA-Ebene keine erhöhte Expression aufzeigen. Ein weiterer Punkt ist, dass auch die Verwendung des Kontrollmedium (L-Zell-Medium ohne WNT3A) zu einer signifikant reduzierten Proliferation sowohl in den FLOH1, als auch in der RD-Zelllinie führte (siehe Abbildung 3.5). Aufgrund der Verwendung von Zellkulturüberständen ist es wahrscheinlich, dass die verminderte proliferative Aktivität auf den Verbrauch von Mediumbestandteilen oder die WNT3A-vermittelte Induktion eines bisher unbekanntes Inhibitors durch die WNT3A-Produktionszelllinien zurückzuführen und eher kein Effekt des im Medium enthaltenen WNT3A ist. Diese Hypothese konnte inzwischen durch zusätzliche Untersuchungen (nicht Teil dieser Arbeit) mit rekombinantem WNT3A bestätigt werden: Rekombinantes WNT3A aktivierte den WNT-Signalweg (gemessen als AXIN Expression) zwar in allen drei Zelllinien, beeinflusste aber in keiner, auch nicht in der FLOH1-Zelllinie, die Proliferationsrate. Weiterhin konnte bei Verwendung des rWNT3A (laborinterne Arbeit) die myogene Differenzierung der verwendeten Zelllinien ebenfalls nicht induziert werden. Bei gleichen Kultur- und Behandlungsbedingungen mit rekombinantem WNT3A besteht ein wesentlicher Unterschied der Arbeiten von Annavarapu et al. und der vorliegenden Arbeit in den verwendeten ARMS-Zelllinien. Möglicherweise deutet dies auf zelllinienspezifische Unterschiede im Ansprechen auf eine Behandlung mit WNT3A hin, so dass eine allgemeine Aussage bezüglich Proliferation und myogener Differenzierung unterschiedlicher ARMS-Zelllinien, nicht möglich ist¹⁶⁰.

Chen et al. und Singh et al. nutzten zur Stimulation des kanonischen WNT-Signalweges hingegen GSK3-Inhibitoren^{105, 108}. In beiden Arbeiten konnte in den untersuchten ERMS-Zelllinien eine Muskeldifferenzierung bzw. eine verstärkte Expression von MyoD und der Myosin-Heavy-Chain aufgezeigt werden^{105, 108}. Es ist offensichtlich, dass die unterschiedlichen pharmakologischen Interventionen zur Stimulation des WNT-Signalweges (WNT3A vs. GSK-3-Inhibitor) eine Ursache der unterschiedlichen Ergebnisse sein könnten. So verwendeten Chen et al., Annavarapu et al. als auch die vorliegende Arbeit die ERMS-Zelllinie RD. Während Chen et al. eine erhöhte myogene Differenzierung und reduzierte Proliferation und Selbsterneuerungskapazität in den ERMS-Zelllinie beschreibt¹⁰⁸ konnte in der vorliegenden Arbeit als auch bei Annavarapu et al. nach Stimulation mit rWNT3A kein Proliferationsblock und keine erhöhte Differenzierung bei der ERMS-Zelllinie RD

nachgewiesen werden¹⁰⁷. In der erst kürzlich veröffentlichten Arbeit von von Bharathy et al. konnte anhand eines humanen Xenotransplantat-Modells mit ERMS und ARMS gezeigt werden, dass die pharmakologische Aktivierung des kanonischen WNT/ β -Catenin-Signalweges mittels eines irreversiblen GSK3 β -Inhibitor (Tideglusib) keinen Einfluss auf Überleben, Wachstum und Differenzierung von RMS-Xenotransplantaten hat und somit den beiden oben genannten Arbeiten nach Stimulation mit einem GSK3-Inhibitor widerspricht¹⁴⁴. Eine mögliche Erklärung der Unterschiede ist der Einsatz eines GSK-3-Inhibitors mit einer hohen Spezifität für GSK3 β bei Bharaty et al.¹⁴⁴, wohingegen Chen et al. einen weniger spezifischen GSK3-Inhibitor einsetzte, der sowohl GSK3 α , als auch GSK3 β blockiert¹⁵⁷.

Die beschriebenen Diskrepanzen zeigen deutlich, dass die Stimulierbarkeit des kanonischen WNT/ β -Catenin-Signalweges nicht stabil und von den jeweiligen Laborbedingungen und eingesetzten Zelllinien und Stimulantien abhängig ist. Aufgrund der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen, die zeigen, dass weder die Inhibierung noch die Stimulation des kanonischen WNT/ β -Catenin-Signalweges einen Effekt auf Proliferation, Migration und Differenzierung von RMS-Tumorzellen haben, ist es wahrscheinlich, dass der kanonische WNT-Signalweg mit seinem zentralen Element β -Catenin eine eher untergeordnete Rolle in RMS (zumindest in RMS ohne Mutationen im β -Catenin-Gen, *CTNNB1*) spielt. Weiterführende Untersuchungen an einem murinen ERMS-Modell (*β -cat^{flox/flox}Ptch^{del/+}Myf5^{CreER/wt}*-Maus) untermauern die Ergebnisse der Arbeit, indem in der Maus gezeigt wird, dass ein β -Catenin-*Knock-out*, keinen Einfluss auf das Tumorwachstum hat (Ragab; Viehweger et al. (*under review*)).

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Prognose von Rhabdomyosarkomen, den häufigsten Weichgewebstumoren bei Kindern, ist besonders im Falle von Metastasen schlecht (5-Jahres-Überlebensrate: 30%)¹⁶¹. Vor diesem Hintergrund ist die biologische und potentiell therapeutische Relevanz des kanonischen WNT-Signalweges mit seinem zentralen Element, dem β -Catenin, für RMS bis heute umstritten, auch wenn klar ist, dass aktivierende Mutationen im *CTNNB1*-Gen bei RMS anders als in anderen embryonalen Tumoren (wie Neuroblastomen, Wilms-Tumoren, Hepatoblastom) so gut wie unbekannt sind¹⁰¹⁻¹⁰³. Mit dem Ziel, die umstrittene Rolle von β -Catenin bei RMS neu zu beleuchten, wurden in der vorliegenden Arbeit in einer embryonalen (RD) und zwei alveolären (CRL2061, FLOH1) RMS-Zelllinien 1) eine Inhibition des kanonischen WNT-Signalweges mittels der pharmakologischen Wirkstoffe XAV939 und FH535 sowie mittels β -Catenin-spezifischer siRNA; 2) eine Stimulation mit einem WNT3A-konditionierten Medium; und 3) Kombinationen der vorgenannten Interventionen durchgeführt und die Auswirkungen auf Proliferation, Migration, Apoptose und myogene Differenzierung untersucht^{111-113, 115}. Der spezifische Inhibitor XAV939 und der spezifische *Knock-down* des kanonischen β -Catenin-Signalweges zeigten in allen drei Zelllinien keine funktionellen Effekte. Eine Inhibition mit FH535 führte hingegen zu einer signifikant verminderten Proliferation und Migration sowie zur Apoptoseinduktion, was vermutlich auf die Inhibition des PPAR γ / δ -Signalwegs zurückzuführen, den FH535 neben dem WNT-Signalweg ebenfalls hemmt¹¹². Die Stimulation von RMS-Zellen mit WNT3A-konditioniertem Medium führte sowohl zu einer erhöhten Proteinexpression als auch zu einer Kerntranslokation von β -Catenin in allen drei Zelllinien. Ein funktioneller Effekt (erhöhte Proliferationsrate (außer CRL2061), verminderte Apoptoserate, erhöhte Expression myogener Differenzierungsgene) konnte nicht aufgezeigt werden. Aus diesen Ergebnissen ist zu schließen, dass der kanonische WNT/ β -Catenin-Signalweg eine untergeordnete Rolle in Bezug auf Proliferation, Migration, Apoptose und Differenzierung bei RMS spielt und als therapeutisches ‚Target‘ eher nicht in Frage kommen dürfte.

6 VERÖFFENTLICHUNGSNACHWEIS

Journal:

Ragab, N, Viehweger, F, Bauer, J, Geyer, N, Yang, M, Seils, A, Belharazem, D, Brembeck, F, Schildhaus, H, Marx, A, Hahn, H, Simon-Keller, K: The canonical WNT/ β -catenin signaling plays a subordinate role in rhabdomyosarcomas. *Frontiers in pediatrics*, 2018

Vortrag:

100. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie (DPG) am 19.05.2016 in Berlin; Kinder- und Fetalpathologie:
' β -Catenin-Inhibierung und Überexpression in RMS-Tumorzellen',
Vortragender: Florian Viehweger

7 LITERATURVERZEICHNIS

1. Weber, CO, Virchow, R: Anatomische Untersuchung einer hypertrophischen Zunge nebst Bemerkungen über die Neubildung quergestreifter Muskelfasern. *Archiv für Pathologische Anatomie und Physiologie und für Klinische Medicin*, 7: 115-125, 1854.
2. Stout, AP: Rhabdomyosarcoma of the Skeletal Muscles. *Annals of surgery*, 123: 447-471, 1946.
3. Steliarova-Foucher, E, Stiller, C, Lacour, B, Kaatsch, P: International Classification of Childhood Cancer, third edition. *Cancer*, 103: 1457-1467, 2005.
4. Wehkopf, T, Blettner, M, Dantonello, T, Jung, I, Klingebiel, T, Koscielniak, E, Luckel, M, Spix, C, Kaatsch, P: Incidence and time trends of soft tissue sarcomas in German children 1985-2004 - a report from the population-based German Childhood Cancer Registry. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, 44: 432-440, 2008.
5. Toro, JR, Travis, LB, Wu, HJ, Zhu, K, Fletcher, CD, Devesa, SS: Incidence patterns of soft tissue sarcomas, regardless of primary site, in the surveillance, epidemiology and end results program, 1978–2001: an analysis of 26,758 cases. *International Journal of Cancer*, 119: 2922-2930, 2006.
6. Klingebiel, T, Koscielniak, E: Weichteilsarkome. In: RÜBBEN, H. (Ed.) 5., vollständig überarbeitete Auflage ed. Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg, 2009.
7. Henze, G, Klingebiel, T, Schlegel, PG: Onkologie – Knochenmarktransplantation. In: *Pädiatrie*. edited by SPEER, C. P., GAHR, M., Springer Berlin Heidelberg, 2013, pp 637-665.
8. Sung, L, Anderson, JR, Arndt, C, Raney, RB, Meyer, WH, Pappo, AS: Neurofibromatosis in children with Rhabdomyosarcoma: a report from the intergroup Rhabdomyosarcoma study IV. *The Journal of Pediatrics*, 144: 666-668, 2004.
9. Fletcher, CDM: (Ed.) *WHO classification of tumours of soft tissue and bone : [reflects the views of a working group that convened for a consensus and editorial meeting at the University of Zurich, Switzerland, 18-20 april 2012]*, Lyon, Internat. Agency for Research on Cancer, 2013.
10. Treuner, J, Brecht, I: Weichteilsarkome. In: NIEMEYER, C., RITTER, J., GAEDICKE, G., GADNER, H. (Eds.) Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg, 2006.
11. Sultan, I, Qaddoumi, I, Yaser, S, Rodriguez-Galindo, C, Ferrari, A: Comparing adult and pediatric rhabdomyosarcoma in the surveillance, epidemiology and end results program, 1973 to 2005: an analysis of 2,600 patients. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 27: 3391-3397, 2009.
12. Mentzel, T: Spindelzelliges Rhabdomyosarkom des Erwachsenen. *Pathologe*, 31: 91-96, 2010.
13. Krams, M: (Ed.) *Kurzlehrbuch Pathologie*, Stuttgart [u.a.], Thieme, 2010.
14. Lisboa, S, Cerveira, N, Vieira, J, Torres, L, Ferreira, AM, Afonso, M, Norton, L, Henrique, R, Teixeira, MR: Genetic diagnosis of alveolar rhabdomyosarcoma in the bone marrow of a patient without evidence of primary tumor. *Pediatric blood & cancer*, 51: 554-557, 2008.

-
15. Hettmer, S, Wagers, AJ: Muscling in: Uncovering the origins of rhabdomyosarcoma. *Nature Medicine*, 16: 171-173, 2010.
 16. Linardic, CM, Downie, DL, Qualman, S, Bentley, RC, Counter, CM: Genetic modeling of human rhabdomyosarcoma. *Cancer research*, 65: 4490-4495, 2005.
 17. Schlag, PM, Budach, V, Hartmann, JT: *Weichgewebetumoren*, Springer-Verlag, 2011.
 18. Besnard-Guérin, C, Newsham, I, Winqvist, R, Cavenee, WK: A common region of loss of heterozygosity in Wilms' tumor and embryonal rhabdomyosarcoma distal to the D11S988 locus on chromosome 11p15.5. *Human genetics*, 97: 163-170, 1996.
 19. Anderson, J, Gordon, A, McManus, A, Shipley, J, Pritchard-Jones, K: Disruption of imprinted genes at chromosome region 11p15.5 in paediatric rhabdomyosarcoma. *Neoplasia (New York, NY)*, 1: 340-348, 1999.
 20. Koscielniak, E, Kosztyla, D, Dantonello, T, Kube, S, Kazanowska, B, Ladenstein, R, Niggli, F, Ljungman, G, Bielack, S, Leuschner, I, Schuck, A: Report of the CWS 2002P Study. *Pediatric blood & cancer*, 60: 32, 2013.
 21. Jane, LM, James, A, Alberto, SP, William, HM: Analysis of Prognostic Factors in Patients With Nonmetastatic Rhabdomyosarcoma Treated on Intergroup Rhabdomyosarcoma Studies III and IV: The Children's Oncology Group. *Journal of Clinical Oncology*, 24: 3844-3851, 2006.
 22. Slater, O, Shipley, J: Clinical relevance of molecular genetics to paediatric sarcomas. *Journal of clinical pathology*, 60: 1187-1194, 2007.
 23. Kempf, BE, Vogt, PK: A genetic analysis of PAX3-FKHR, the oncogene of alveolar rhabdomyosarcoma. *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research*, 10: 813, 1999.
 24. Fredericks, WJ, Galili, N, Mukhopadhyay, S, Rovera, G, Bennicelli, J, Barr, FG, F. J. Rauscher, r: The PAX3-FKHR fusion protein created by the t(2;13) translocation in alveolar rhabdomyosarcomas is a more potent transcriptional activator than PAX3. *Molecular and Cellular Biology*, 15: 1522-1535, 1995.
 25. Anderson, J, Ramsay, A, Gould, S, Pritchard-Jones, K: PAX3-FKHR Induces Morphological Change and Enhances Cellular Proliferation and Invasion in Rhabdomyosarcoma. *The American Journal of Pathology*, 159: 1089-1096, 2001.
 26. Wachtel, M, Dettling, M, Koscielniak, E, Stegmaier, S, Treuner, J, Simon-Klingenstein, K, Buhlmann, P, Niggli, FK, Schafer, BW: Gene expression signatures identify rhabdomyosarcoma subtypes and detect a novel t(2;2)(q35;p23) translocation fusing PAX3 to NCOA1. *Cancer research*, 64: 5539-5545, 2004.
 27. Rauscher, FJ, Mukhopadhyay, S, Barr, FG, Rovera, G, Emanuel, BS, Fredericks, WJ, Galili, N, Davis, RJ: Fusion of a fork head domain gene to PAX3 in the solid tumour alveolar rhabdomyosarcoma. *Nature Genetics*, 5: 230-235, 1993.
 28. Davis, RJ, D'Cruz, CM, Lovell, MA, Biegel, JA, Barr, FG: Fusion of PAX7 to FKHR by the variant t(1;13)(p36;q14) translocation in alveolar rhabdomyosarcoma. *Cancer research*, 54: 2869, 1994.
 29. Makawita, S, Ho, M, Durbin, A, Thorner, P, Malkin, D, Somers, G: Expression of insulin-like growth factor pathway proteins in rhabdomyosarcoma: IGF-2 expression is associated with translocation-negative tumors. *Pediatric and developmental pathology: the official journal of the Society for Pediatric Pathology and the Paediatric Pathology Society*, 12: 127-135, 2008.

-
30. Tonin, PN, Scrable, H, Shimada, H, Cavenee, WK: Muscle-specific gene expression in rhabdomyosarcomas and stages of human fetal skeletal muscle development. *Cancer research*, 51: 5100-5106, 1991.
 31. Stemple, DL: Structure and function of the notochord: an essential organ for chordate development. *Development*, 132: 2503-2512, 2005.
 32. Buckingham, M, Relaix, F: The role of Pax genes in the development of tissues and organs: Pax3 and Pax7 regulate muscle progenitor cell functions. *Annual review of cell and developmental biology*, 23: 645, 2007.
 33. von Maltzahn, J, Jones, AE, Parks, RJ, Rudnicki, MA: Pax7 is critical for the normal function of satellite cells in adult skeletal muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110: 16474-16479, 2013.
 34. Sebire, NJ, Malone, M: Myogenin and MyoD1 expression in paediatric rhabdomyosarcomas. *Journal of clinical pathology*, 56: 412-416, 2003.
 35. Ito, Y, Kayama, T, Asahara, H: A systems approach and skeletal myogenesis. *Comparative and functional genomics*, 2012: 759407, 2012.
 36. Massari, ME, Murre, C: Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms. *Mol Cell Biol*, 20: 429-440, 2000.
 37. Aumüller, G: *Anatomie : [mit ... zum Präp-Kurs]*, Stuttgart, Thieme.
 38. Sabourin, LA, Rudnicki, MA: The molecular regulation of myogenesis. *Clinical Genetics*, 57: 16-25, 2000.
 39. Rudnicki, MA, Schnegelsberg, PNJ, Stead, RH, Braun, T, Arnold, H-H, Jaenisch, R: MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle. *Cell*, 75: 1351-1359, 1993.
 40. Hasty, P, Bradley, A, Morris, JH, Edmondson, DG, Venuti, JM, Olson, EN, Klein, WH: Muscle deficiency and neonatal death in mice with a targeted mutation in the myogenin gene. *Nature*, 364: 501-506, 1993.
 41. Kassar-Duchossoy, L, Gayraud-Morel, B, Gomes, D, Rocancourt, D, Buckingham, M, Shinin, V, Tajbakhsh, S: Mrf4 determines skeletal muscle identity in Myf5:MyoD double-mutant mice. *Nature*, 431: 466-471, 2004.
 42. Mok, GF, Sweetman, D: Many routes to the same destination: lessons from skeletal muscle development. *Reproduction (Cambridge, England)*, 141: 301-312, 2011.
 43. Sassoon, DA: Myogenic regulatory factors: dissecting their role and regulation during vertebrate embryogenesis. *Developmental biology*, 156: 11-23, 1993.
 44. Olguin, HC, Patzlaff, NE, Olwin, BB: Pax7-FKHR transcriptional activity is enhanced by transcriptionally repressed MyoD. *Journal of cellular biochemistry*, 112: 1410-1417, 2011.
 45. Miller, PJ, Hollenbach, AD: The oncogenic fusion protein Pax3-FKHR has a greater post-translational stability relative to Pax3 during early myogenesis. *Biochimica et biophysica acta*, 1770: 1450-1458, 2007.
 46. Calhabeu, F, Hayashi, S, Morgan, JE, Relaix, F, Zammit, PS: Alveolar rhabdomyosarcoma-associated proteins PAX3/FOXO1A and PAX7/FOXO1A suppress the transcriptional activity of MyoD-target genes in muscle stem cells. *Oncogene*, 32: 651-662, 2013.
 47. Charytonowicz, E, Matushansky, I, Domenech, JD, Castillo-Martin, M, Ladanyi, M, Cordon-Cardo, C, Ziman, M: PAX7-FKHR fusion gene inhibits myogenic differentiation via NF-kappaB upregulation. *Clinical & translational oncology : official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico*, 14: 197-206, 2012.

-
48. Barr, FG, Fitzgerald, JC, Ginsberg, JP, Vanella, ML, Davis, RJ, Bennicelli, JL: Predominant expression of alternative PAX3 and PAX7 forms in myogenic and neural tumor cell lines. *Cancer research*, 59: 5443-5448, 1999.
 49. Seale, P, Sabourin, LA, Girgis-Gabardo, A, Mansouri, A, Gruss, P, Rudnicki, MA: Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. *Cell*, 102: 777-786, 2000.
 50. Dias, P, Chen, B, Dilday, B, Palmer, H, Hosoi, H, Singh, S, Wu, C, Li, X, Thompson, J, Parham, D, Qualman, S, Houghton, P: Strong Immunostaining for Myogenin in Rhabdomyosarcoma Is Significantly Associated with Tumors of the Alveolar Subclass. *The American Journal of Pathology*, 156: 399-408, 2000.
 51. Morin, PJ: beta-catenin signaling and cancer. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 21: 1021-1030, 1999.
 52. MacDonald, BT, Tamai, K, He, X: Wnt/ β -catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Developmental cell*, 17: 9-26, 2009.
 53. Peifer, M, Berg, S, Reynolds, AB: A repeating amino acid motif shared by proteins with diverse cellular roles. *Cell*, 76: 789-791, 1994.
 54. Huber, AH, Weis, WI: The structure of the beta-catenin/E-cadherin complex and the molecular basis of diverse ligand recognition by beta-catenin. *Cell*, 105: 391-402, 2001.
 55. Graham, TA, Weaver, C, Mao, F, Kimelman, D, Xu, W: Crystal structure of a beta-catenin/Tcf complex. *Cell*, 103: 885-896, 2000.
 56. Xing, Y, Clements, WK, Kimelman, D, Xu, W: Crystal structure of a beta-catenin/axin complex suggests a mechanism for the beta-catenin destruction complex. *Genes & development*, 17: 2753-2764, 2003.
 57. Minde, DP, Anvarian, Z, Rudiger, SG, Maurice, MM: Messing up disorder: how do missense mutations in the tumor suppressor protein APC lead to cancer? *Molecular cancer*, 10: 101, 2011.
 58. Huber, AH, Nelson, WJ, Weis, WI: Three-dimensional structure of the armadillo repeat region of beta-catenin. *Cell*, 90: 871-882, 1997.
 59. Wu, G, Xu, G, Schulman, BA, Jeffrey, PD, Harper, JW, Pavletich, NP: Structure of a beta-TrCP1-Skp1-beta-catenin complex: destruction motif binding and lysine specificity of the SCF(beta-TrCP1) ubiquitin ligase. *Molecular cell*, 11: 1445-1456, 2003.
 60. Hagen, T, Vidal-Puig, A: Characterisation of the phosphorylation of beta-catenin at the GSK-3 priming site Ser45. *Biochemical and biophysical research communications*, 294: 324-328, 2002.
 61. Liu, C, Li, Y, Semenov, M, Han, C, Baeg, GH, Tan, Y, Zhang, Z, Lin, X, He, X: Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell*, 108: 837-847, 2002.
 62. Vleminckx, K, Kemler, R, Hecht, A: The C-terminal transactivation domain of beta-catenin is necessary and sufficient for signaling by the LEF-1/beta-catenin complex in *Xenopus laevis*. *Mechanisms of development*, 81: 65-74, 1999.
 63. Gottardi, CJ, Peifer, M: Terminal regions of beta-catenin come into view. *Structure (London, England : 1993)*, 16: 336-338, 2008.
 64. Nusse, R, Brown, A, Papkoff, J, Scambler, P, Shackleford, G, McMahon, A, Moon, R, Varmus, H: A new nomenclature for int-1 and related genes: the Wnt gene family. *Cell*, 64: 231, 1991.
 65. Nusse, R: Wnt signaling in disease and in development. *Cell research*, 15: 28-32, 2005.

-
66. Siar, CH, Nagatsuka, H, Han, PP, Buery, RR, Tsujigiwa, H, Nakano, K, Ng, KH, Kawakami, T: Differential expression of canonical and non-canonical Wnt ligands in ameloblastoma. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*, 41: 332-339, 2012.
 67. Komiya, Y, Habas, R: Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis*, 4: 68-75, 2008.
 68. Rao, TP, Kuhl, M: An updated overview on Wnt signaling pathways: a prelude for more. *Circulation research*, 106: 1798-1806, 2010.
 69. Staal, FJ, Clevers, H: Tcf/Lef transcription factors during T-cell development: unique and overlapping functions. *The hematology journal : the official journal of the European Haematology Association / EHA*, 1: 3-6, 2000.
 70. Fiedler, M, Mendoza-Topaz, C, Rutherford, TJ, Mieszczanek, J, Bienz, M: Dishevelled interacts with the DIX domain polymerization interface of Axin to interfere with its function in down-regulating beta-catenin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108: 1937-1942, 2011.
 71. Klaus, A, Birchmeier, W: Wnt signalling and its impact on development and cancer. *Nature Reviews Cancer*, 8: 387-398, 2008.
 72. Metcalfe, C, Bienz, M: Inhibition of GSK3 by Wnt signalling – two contrasting models. *Journal of Cell Science*, 124: 3537-3544, 2011.
 73. Willert, J, Epping, M, Pollack, JR, Brown, PO, Nusse, R: A transcriptional response to Wnt protein in human embryonic carcinoma cells. *BMC Developmental Biology*, 2: 1-7, 2002.
 74. Spiegelman, VS, Slaga, TJ, Pagano, M, Minamoto, T, Ronai, Z, Fuchs, SY: Wnt/beta-catenin signaling induces the expression and activity of betaTrCP ubiquitin ligase receptor. *Molecular cell*, 5: 877-882, 2000.
 75. Hovanes, K, Li, TW, Munguia, JE, Truong, T, Milovanovic, T, Lawrence Marsh, J, Holcombe, RF, Waterman, ML: Beta-catenin-sensitive isoforms of lymphoid enhancer factor-1 are selectively expressed in colon cancer. *Nat Genet*, 28: 53-57, 2001.
 76. Roose, J, Huls, G, van Beest, M, Moerer, P, van der Horn, K, Goldschmeding, R, Logtenberg, T, Clevers, H: Synergy between tumor suppressor APC and the beta-catenin-Tcf4 target Tcf1. *Science*, 285: 1923-1926, 1999.
 77. Brannon, M, Gomperts, M, Sumoy, L, Moon, RT, Kimelman, D: A beta-catenin/XTcf-3 complex binds to the siamois promoter to regulate dorsal axis specification in *Xenopus*. *Genes & development*, 11: 2359-2370, 1997.
 78. He, TC, Sparks, AB, Rago, C, Hermeking, H, Zawel, L, da Costa, LT, Morin, PJ, Vogelstein, B, Kinzler, KW: Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science*, 281: 1509-1512, 1998.
 79. Shtutman, M, Zhurinsky, J, Simcha, I, Albanese, C, D'Amico, M, Pestell, R, Ben-Ze'ev, A: The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96: 5522-5527, 1999.
 80. Zhang, X, Gaspard, JP, Chung, DC: Regulation of vascular endothelial growth factor by the Wnt and K-ras pathways in colonic neoplasia. *Cancer research*, 61: 6050-6054, 2001.
 81. Shimokawa, T, Furukawa, Y, Sakai, M, Li, M, Miwa, N, Lin, YM, Nakamura, Y: Involvement of the FGF18 gene in colorectal carcinogenesis, as a novel downstream target of the beta-catenin/T-cell factor complex. *Cancer research*, 63: 6116-6120, 2003.

-
82. Morin, PJ, Sparks, AB, Korinek, V, Barker, N, Clevers, H, Vogelstein, B, Kinzler, KW: Activation of β -catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in β -catenin or APC. *Science*, 275: 1787-1790, 1997.
 83. Coste, AdL, Romagnolo, B, Billuart, P, Renard, C-A, Buendia, M-A, Soubrane, O, Fabre, M, Chelly, J, Beldjord, C, Kahn, A, Perret, C: Somatic mutations of the β -catenin gene are frequent in mouse and human hepatocellular carcinomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95: 8847-8851, 1998.
 84. Palacios, J, Gamallo, C: Mutations in the β -catenin gene (CTNNB1) in endometrioid ovarian carcinomas. *Cancer research*, 58: 1344-1347, 1998.
 85. Ferrari, GVD, Kohn, AD, Kaykas, A, Moon, RT: WNT and β -catenin signalling: diseases and therapies. *Nature Reviews Genetics*, 5: 691-701, 2004.
 86. Taketo, MM: Shutting down Wnt signal-activated cancer. *Nat Genet*, 36: 320-322, 2004.
 87. Sparks, AB, Morin, PJ, Vogelstein, B, Kinzler, KW: Mutational analysis of the APC/ β -catenin/Tcf pathway in colorectal cancer. *Cancer research*, 58: 1130-1134, 1998.
 88. Satoh, S, Daigo, Y, Furukawa, Y, Kato, T, Miwa, N, Nishiwaki, T, Kawasoe, T, Ishiguro, H, Fujita, M, Tokino, T: AXIN1 mutations in hepatocellular carcinomas, and growth suppression in cancer cells by virus-mediated transfer of AXIN1. *Nature genetics*, 24: 245-250, 2000.
 89. Uematsu, K, He, B, You, L, Xu, Z, McCormick, F, Jablons, DM: Activation of the Wnt pathway in non small cell lung cancer: evidence of dishevelled overexpression. *Oncogene*, 22: 7218-7221, 2003.
 90. Haegel, H, Larue, L, Ohsugi, M, Fedorov, L, Herrenknecht, K, Kemler, R: Lack of beta-catenin affects mouse development at gastrulation. *Development*, 121: 3529-3537, 1995.
 91. Tajbakhsh, S, Borello, U, Vivarelli, E, Kelly, R, Papkoff, J, Duprez, D, Buckingham, M, Cossu, G: Differential activation of Myf5 and MyoD by different Wnts in explants of mouse paraxial mesoderm and the later activation of myogenesis in the absence of Myf5. *Development*, 125: 4155-4162, 1998.
 92. Ikeya, M, Takada, S: Wnt signaling from the dorsal neural tube is required for the formation of the medial dermomyotome. *Development*, 125: 4969-4976, 1998.
 93. Parr, BA, Shea, MJ, Vassileva, G, McMahon, AP: Mouse Wnt genes exhibit discrete domains of expression in the early embryonic CNS and limb buds. *Development*, 119: 247-261, 1993.
 94. Schmidt, M, Tanaka, M, Munsterberg, A: Expression of (beta)-catenin in the developing chick myotome is regulated by myogenic signals. *Development*, 127: 4105-4113, 2000.
 95. Borello, U, Berarducci, B, Murphy, P, Bajard, L, Buffa, V, Piccolo, S, Buckingham, M, Cossu, G: The Wnt/ β -catenin pathway regulates Gli-mediated Myf5 expression during somitogenesis. *Development*, 133: 3723-3732, 2006.
 96. Brunelli, S, Relaix, F, Baesso, S, Buckingham, M, Cossu, G: Beta catenin-independent activation of MyoD in presomitic mesoderm requires PKC and depends on Pax3 transcriptional activity. *Developmental biology*, 304: 604-614, 2007.
 97. Kim, C-H, Neiswender, H, Baik, EJ, Xiong, WC, Mei, L: β -Catenin interacts with MyoD and regulates its transcription activity. *Molecular and cellular biology*, 28: 2941-2951, 2008.

-
98. Petropoulos, H, Skerjanc, IS: β -Catenin is essential and sufficient for skeletal myogenesis in P19 cells. *Journal of Biological Chemistry*, 277: 15393-15399, 2002.
 99. Brack, AS, Conboy, IM, Conboy, MJ, Shen, J, Rando, TA: A Temporal Switch from Notch to Wnt Signaling in Muscle Stem Cells Is Necessary for Normal Adult Myogenesis. *Cell Stem Cell*, 2: 50-59, 2008.
 100. Shang, Y, Zhang, C, Wang, S, Xiong, F, Zhao, C, Peng, F, Feng, S, Yu, M, Li, M, Zhang, Y, Li, Y: Activated β -catenin induces myogenesis and inhibits adipogenesis in BM-derived mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*, 9: 667-681, 2007.
 101. Fattet, S, Haberler, C, Legoix, P, Varlet, P, Lellouch-Tubiana, A, Lair, S, Manie, E, Raquin, MA, Bours, D, Carpentier, S: Beta-catenin status in paediatric medulloblastomas: correlation of immunohistochemical expression with mutational status, genetic profiles, and clinical characteristics. *The Journal of pathology*, 218: 86-94, 2009.
 102. Bläker, H, Hofmann, WJ, Rieker, RJ, Penzel, R, Graf, M, Otto, HF: β -catenin accumulation and mutation of the CTNNB1 gene in hepatoblastoma. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 25: 399-402, 1999.
 103. SU, MC, HUANG, WC, LIEN, HC: Beta-catenin expression and mutation in adult and pediatric Wilms' tumors. *Apmis*, 116: 771-778, 2008.
 104. Shukla, N, Ameer, N, Yilmaz, I, Nafa, K, Lau, C-Y, Marchetti, A, Borsu, L, Barr, FG, Ladanyi, M: Oncogene mutation profiling of pediatric solid tumors reveals significant subsets of embryonal rhabdomyosarcoma and neuroblastoma with mutated genes in growth signaling pathways. *Clinical Cancer Research*, 18: 748-757, 2012.
 105. Singh, S, Vinson, C, Gurley, CM, Nolen, GT, Beggs, ML, Nagarajan, R, Wagner, EF, Parham, DM, Peterson, CA: Impaired Wnt signaling in embryonal rhabdomyosarcoma cells from p53/c-fos double mutant mice. *The American journal of pathology*, 177: 2055-2066, 2010.
 106. Dräger, J, Simon-Keller, K, Pukrop, T, Klemm, F, Wilting, J, Sticht, C, Dittmann, K, Schulz, M, Leuschner, I, Marx, A: LEF1 reduces tumor progression and induces myodifferentiation in a subset of rhabdomyosarcoma. *Oncotarget*, 8: 3259, 2017.
 107. Annavarapu, SR, Cialfi, S, Dominici, C, Kokai, GK, Uccini, S, Ceccarelli, S, McDowell, HP, Helliwell, TR: Characterization of Wnt/ β -catenin signaling in rhabdomyosarcoma. *Lab Invest*, 93: 1090-1099, 2013.
 108. Chen, EY, DeRan, MT, Ignatius, MS, Grandinetti, KB, Clagg, R, McCarthy, KM, Lobbardi, RM, Brockmann, J, Keller, C, Wu, X: Glycogen synthase kinase 3 inhibitors induce the canonical WNT/ β -catenin pathway to suppress growth and self-renewal in embryonal rhabdomyosarcoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111: 5349-5354, 2014.
 109. Roma, J, Almazán-Moga, A, Sánchez de Toledo, J, Gallego, S: Notch, wnt, and hedgehog pathways in rhabdomyosarcoma: from single pathways to an integrated network. *Sarcoma*, 2012, 2012.
 110. Schmitz, S: *Der Experimentator: Zellkultur*, Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag, 2011.
 111. Willert, K, Brown, JD, Danenberg, E, Duncan, AW, Weissman, IL, Reya, T, Yates, JR, 3rd, Nusse, R: Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature*, 423: 448-452, 2003.

-
112. Handeli, S, Simon, JA: A small-molecule inhibitor of Tcf/beta-catenin signaling down-regulates PPARgamma and PPARdelta activities. *Molecular cancer therapeutics*, 7: 521-529, 2008.
 113. Li, H, Kim, JH, Koh, SS, Stallcup, MR: Synergistic Effects of Coactivators GRIP1 and β -Catenin on Gene Activation CROSS-TALK BETWEEN ANDROGEN RECEPTOR AND Wnt SIGNALING PATHWAYS. *Journal of Biological Chemistry*, 279: 4212-4220, 2004.
 114. Tanaka, S, Terada, K, Nohno, T: Canonical Wnt signaling is involved in switching from cell proliferation to myogenic differentiation of mouse myoblast cells. *Journal of molecular signaling*, 6: 12, 2011.
 115. Huang, SM, Mishina, YM, Liu, S, Cheung, A, Stegmeier, F, Michaud, GA, Charlat, O, Wiellette, E, Zhang, Y, Wiessner, S, Hild, M, Shi, X, Wilson, CJ, Mickanin, C, Myer, V, Fazal, A, Tomlinson, R, Serluca, F, Shao, W, Cheng, H, Shultz, M, Rau, C, Schirle, M, Schlegl, J, Ghidelli, S, Fawell, S, Lu, C, Curtis, D, Kirschner, MW, Lengauer, C, Finan, PM, Tallarico, JA, Bouwmeester, T, Porter, JA, Bauer, A, Cong, F: Tankyrase inhibition stabilizes axin and antagonizes Wnt signalling. *Nature*, 461: 614-620, 2009.
 116. Berridge, MV, Tan, AS: Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Archives of biochemistry and biophysics*, 303: 474-482, 1993.
 117. Mosmann, T: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, 65: 55-63, 1983.
 118. Liang, CC, Park, AY, Guan, JL: In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc*, 2: 329-333, 2007.
 119. Möller, B, Glaß, M, Misiak, D, Posch, S: Mitobo-a toolbox for image processing and analysis. *Journal of Open Research Software*, 4, 2016.
 120. Abramoff, MD, Magalhães, PJ, Ram, SJ: Image processing with ImageJ. *Biophotonics international*, 11: 36-42, 2004.
 121. Mülhardt, C: *Der Experimentator Molekularbiologie/Genomics*, Berlin, Heidelberg, Springer Spektrum, 2013.
 122. Saiki, Rea: A Novel Method for the Prenatal Diagnosis of Sickle Cell Anemia. *Amer Soc Human Genetics*: Oct. 9-13, 1985.
 123. Higuchi, R, Fockler, C, Dollinger, G, Watson, R: Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Bio/technology (Nature Publishing Company)*, 11: 1026-1030, 1993.
 124. Zipper, H, Brunner, H, Bernhagen, J, Vitzthum, F: Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Research*, 32: e103, 2004.
 125. Ririe, KM, Rasmussen, RP, Wittwer, CT: Product Differentiation by Analysis of DNA Melting Curves during the Polymerase Chain Reaction. *Analytical Biochemistry*, 245: 154-160, 1997.
 126. Livak, KJ, Schmittgen, TD: Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*, 25: 402-408, 2001.
 127. Apostolakos, MJ, Schuermann, WHT, Frampton, MW, Utell, MJ, Willey, JC: Measurement of Gene Expression by Multiplex Competitive Polymerase Chain Reaction. *Analytical Biochemistry*, 213: 277-284, 1993.

-
128. Laemmli, UK: Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685, 1970.
 129. Towbin, H, Staehelin, T, Gordon, J: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76: 4350-4354, 1979.
 130. Titus, JA, Haugland, R, Sharrow, SO, Segal, DM: Texas Red, a hydrophilic, red-emitting fluorophore for use with fluorescein in dual parameter flow microfluorometric and fluorescence microscopic studies. *Journal of immunological methods*, 50: 193-204, 1982.
 131. Douglass, EC, Valentine, M, Etcubanas, E, Parham, D, Webber, BL, Houghton, PJ, Houghton, JA, Green, AA: A specific chromosomal abnormality in rhabdomyosarcoma. *Cytogenetics and cell genetics*, 45: 148-155, 1987.
 132. McAllister, RM, Melnyk, J, Finkelstein, JZ, Adams, EC, Jr., Gardner, MB: Cultivation in vitro of cells derived from a human rhabdomyosarcoma. *Cancer*, 24: 520-526, 1969.
 133. Morin, PJ: β -catenin signaling and cancer. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 21: 1021-1030, 1999.
 134. de La Coste, A, Romagnolo, B, Billuart, P, Renard, C-A, Buendia, M-A, Soubrane, O, Fabre, M, Chelly, J, Beldjord, C, Kahn, A: Somatic mutations of the β -catenin gene are frequent in mouse and human hepatocellular carcinomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95: 8847-8851, 1998.
 135. Chien, AJ, Moore, EC, Lonsdorf, AS, Kulikauskas, RM, Rothberg, BG, Berger, AJ, Major, MB, Hwang, ST, Rimm, DL, Moon, RT: Activated Wnt/beta-catenin signaling in melanoma is associated with decreased proliferation in patient tumors and a murine melanoma model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106: 1193-1198, 2009.
 136. Hankey, W, Frankel, WL, Groden, J: Functions of the APC tumor suppressor protein dependent and independent of canonical WNT signaling: implications for therapeutic targeting. *Cancer metastasis reviews*, 37: 159-172, 2018.
 137. Miller, JR, Moon, RT: Signal transduction through beta-catenin and specification of cell fate during embryogenesis. *Genes & development*, 10: 2527-2539, 1996.
 138. Davidson, KC, Adams, AM, Goodson, JM, McDonald, CE, Potter, JC, Berndt, JD, Biechele, TL, Taylor, RJ, Moon, RT: Wnt/beta-catenin signaling promotes differentiation, not self-renewal, of human embryonic stem cells and is repressed by Oct4. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109: 4485-4490, 2012.
 139. Vega, OA, Lucero, CMJ, Araya, HF, Jerez, S, Tapia, JC, Antonelli, M, Salazar-Onfray, F, Las Heras, F, Thaler, R, Riester, SM, Stein, GS, van Wijnen, AJ, Galindo, MA: Wnt/beta-Catenin Signaling Activates Expression of the Bone-Related Transcription Factor RUNX2 in Select Human Osteosarcoma Cell Types. *Journal of cellular biochemistry*, 118: 3662-3674, 2017.
 140. Pridgeon, MG, Grohar, PJ, Steensma, MR, Williams, BO: Wnt Signaling in Ewing Sarcoma, Osteosarcoma, and Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumors. *Current osteoporosis reports*, 15: 239-246, 2017.
 141. Gao, Y, Lu, X: Decreased expression of MEG3 contributes to retinoblastoma progression and affects retinoblastoma cell growth by regulating the activity of Wnt/ β -catenin pathway. *Tumor Biology*, 37: 1461-1469, 2016.
 142. Renna, C, Salaroli, R, Cocchi, C, Cenacchi, G: XAV939-mediated ARTD activity inhibition in human MB cell lines. *PLoS one*, 10: e0124149, 2015.

-
143. Tian, XH, Hou, WJ, Fang, Y, Fan, J, Tong, H, Bai, SL, Chen, Q, Xu, H, Li, Y: XAV939, a tankyrase 1 inhibitor, promotes cell apoptosis in neuroblastoma cell lines by inhibiting Wnt/beta-catenin signaling pathway. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*, 32: 100, 2013.
 144. Bharathy, N, Svalina, MN, Settlemeyer, TP, Cleary, MM, Berlow, NE, Airhart, SD, Xiang, S, Keck, J, Hayden, JB, Shern, JF: Preclinical testing of the glycogen synthase kinase-3 β inhibitor tideglusib for rhabdomyosarcoma. *Oncotarget*, 8: 62976, 2017.
 145. Vilchez, V, Turcios, L, Marti, F, Gedaly, R: Targeting Wnt/beta-catenin pathway in hepatocellular carcinoma treatment. *World journal of gastroenterology*, 22: 823-832, 2016.
 146. Verma, UN, Surabhi, RM, Schmaltieg, A, Becerra, C, Gaynor, RB: Small interfering RNAs directed against beta-catenin inhibit the in vitro and in vivo growth of colon cancer cells. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 9: 1291-1300, 2003.
 147. Gurney, A, Axelrod, F, Bond, CJ, Cain, J, Chartier, C, Donigan, L, Fischer, M, Chaudhari, A, Ji, M, Kapoun, AM, Lam, A, Lazetic, S, Ma, S, Mitra, S, Park, IK, Pickell, K, Sato, A, Satyal, S, Stroud, M, Tran, H, Yen, WC, Lewicki, J, Hoey, T: Wnt pathway inhibition via the targeting of Frizzled receptors results in decreased growth and tumorigenicity of human tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109: 11717-11722, 2012.
 148. Krishnamurthy, N, Kurzrock, R: Targeting the Wnt/beta-catenin pathway in cancer: Update on effectors and inhibitors. *Cancer treatment reviews*, 62: 50-60, 2018.
 149. Leung, WK, He, M, Chan, AW, Law, PT, Wong, N: Wnt/beta-Catenin activates MiR-183/96/182 expression in hepatocellular carcinoma that promotes cell invasion. *Cancer letters*, 362: 97-105, 2015.
 150. Shukla, N, Ameer, N, Yilmaz, I, Nafa, K, Lau, CY, Marchetti, A, Borsu, L, Barr, FG, Ladanyi, M: Oncogene mutation profiling of pediatric solid tumors reveals significant subsets of embryonal rhabdomyosarcoma and neuroblastoma with mutated genes in growth signaling pathways. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 18: 748-757, 2012.
 151. Chen, X, Stewart, E, Shelat, AA, Qu, C, Bahrami, A, Hatley, M, Wu, G, Bradley, C, McEvoy, J, Pappo, A, Spunt, S, Valentine, MB, Valentine, V, Krafcik, F, Lang, WH, Wierdl, M, Tsurkan, L, Tolleman, V, Federico, SM, Morton, C, Lu, C, Ding, L, Easton, J, Rusch, M, Nagahawatte, P, Wang, J, Parker, M, Wei, L, Hedlund, E, Finkelstein, D, Edmonson, M, Shurtleff, S, Boggs, K, Mulder, H, Yergeau, D, Skapek, S, Hawkins, DS, Ramirez, N, Potter, PM, Sandoval, JA, Davidoff, AM, Mardis, ER, Wilson, RK, Zhang, J, Downing, JR, Dyer, MA: Targeting oxidative stress in embryonal rhabdomyosarcoma. *Cancer cell*, 24: 710-724, 2013.
 152. Shern, JF, Chen, L, Chmielecki, J, Wei, JS, Patidar, R, Rosenberg, M, Ambrogio, L, Auclair, D, Wang, J, Song, YK, Tolman, C, Hurd, L, Liao, H, Zhang, S, Bogen, D, Brohl, AS, Sindiri, S, Catchpoole, D, Badgett, T, Getz, G, Mora, J, Anderson, JR, Skapek, SX, Barr, FG, Meyerson, M, Hawkins, DS, Khan, J: Comprehensive genomic analysis of rhabdomyosarcoma reveals a landscape of alterations affecting a common genetic axis in fusion-positive and fusion-negative tumors. *Cancer discovery*, 4: 216-231, 2014.

-
153. Malempati, S, Hawkins, DS: Rhabdomyosarcoma: review of the Children's Oncology Group (COG) Soft-Tissue Sarcoma Committee experience and rationale for current COG studies. *Pediatric blood & cancer*, 59: 5-10, 2012.
 154. Soglio, DB-D, Rougemont, A-L, Absi, R, Giroux, L-M, Sanchez, R, Barrette, S, Fournet, J-C: Beta-catenin mutation does not seem to have an effect on the tumorigenesis of pediatric rhabdomyosarcomas. *Pediatric and Developmental Pathology*, 12: 371-373, 2009.
 155. Huber, O, Korn, R, McLaughlin, J, Ohsugi, M, Herrmann, BG, Kemler, R: Nuclear localization of β -catenin by interaction with transcription factor LEF-1. *Mechanisms of development*, 59: 3-10, 1996.
 156. Gedaly, R, Galuppo, R, Daily, MF, Shah, M, Maynard, E, Chen, C, Zhang, X, Esser, KA, Cohen, DA, Evers, BM: Targeting the Wnt/ β -catenin signaling pathway in liver cancer stem cells and hepatocellular carcinoma cell lines with FH535. *PloS one*, 9: e99272, 2014.
 157. Chen, Y, Rao, X, Huang, K, Jiang, X, Wang, H, Teng, L: FH535 Inhibits Proliferation and Motility of Colon Cancer Cells by Targeting Wnt/beta-catenin Signaling Pathway. *Journal of Cancer*, 8: 3142-3153, 2017.
 158. Iida, J, Dorchak, J, Lehman, JR, Clancy, R, Luo, C, Chen, Y, Somiari, S, Ellsworth, RE, Hu, H, Mural, RJ: FH535 inhibited migration and growth of breast cancer cells. *PloS one*, 7: e44418, 2012.
 159. MacDonald, BT, Tamai, K, He, X: Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell*, 17: 9-26, 2009.
 160. Seki, M, Nishimura, R, Yoshida, K, Shimamura, T, Shiraishi, Y, Sato, Y, Kato, M, Chiba, K, Tanaka, H, Hoshino, N, Nagae, G, Shiozawa, Y, Okuno, Y, Hosoi, H, Tanaka, Y, Okita, H, Miyachi, M, Souzaki, R, Taguchi, T, Koh, K, Hanada, R, Kato, K, Nomura, Y, Akiyama, M, Oka, A, Igarashi, T, Miyano, S, Aburatani, H, Hayashi, Y, Ogawa, S, Takita, J: Integrated genetic and epigenetic analysis defines novel molecular subgroups in rhabdomyosarcoma. *Nature communications*, 6: 7557, 2015.
 161. Malempati, S, Hawkins, DS: Rhabdomyosarcoma: Review of the Children's Oncology Group (COG) soft-tissue Sarcoma committee experience and rationale for current COG studies. *Pediatric blood & cancer*, 59: 5-10, 2012.

8 TABELLARISCHER ANHANG

Tabelle 7.1: Geräteliste

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Chemilumineszenz System	FUSION SL Advance	Peqlab
CO ₂ Inkubator	HERAcell 150	Heraeus
Durchflusszytometer	BD FACS Canto II	Becton Dickinson.
Elektrophoresekammer	MiniProtean®Tetra Electrophoresis	Biorad
Fluoreszenzmikroskop	Olympus Bx41	Olympus
Inverses Mikroskop	DFC 450 Kamera	Leica
Mikroskop (Labor)	DMIL	Leica
Mikrotiterplatten-Lesegerät	Infinite®M200	Tecan
Multipipettierer	-	Eppendorf
Pipettierhilfe	accut-jet® pro	Brand
RealTime Analyzer	StepOnePlus PCR System	Applied Biosystems
Sicherheitswerkbank	HERAsafe	Kendro
Spektrometer	ND100 NanoDrop Spektrometer	Peqlab
Stromgeber	Power Pac 200	Biorad
Thermocycler	peqSTAR 2X	Peqlab
Transferkammer	Mini Trans-Blot® Cell	Biorad
Vortex	REAX top	Heidolph
Waage	BP 301 S	Sartorius
Wippschüttler	WT12	Biometra
Zentrifuge	Centrifuge 5810 R	Eppendorf

Tabelle 7.2: Verbrauchsmaterialien für die Zellkultur

Medium/Reagenz	Bezugsquelle
T-75 Flaschen	Corning Life Sciences, Tewksbury, MA, USA
T-150 Flaschen	Corning Life Sciences, Tewksbury, MA, USA
10ml <i>Falcon</i> -Röhrchen	Corning Life Sciences, Tewksbury, MA, USA
50ml <i>Falcon</i> -Röhrchen	Corning Life Sciences, Tewksbury, MA, USA
Serologische Pipette (1ml – 50ml)	Corning Life Sciences, Tewksbury, MA, USA
Pasteur Pipetten	Hirschmann, Eberstadt, Deutschland
Pipettenspitze (10µl, 200µl, 1000µl)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
6- <i>well</i> -Platte	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
12- <i>well</i> -Platte	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
96- <i>well</i> -Platte (flach)	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich

9 LEBENS LAUF

PERSONALIEN

Name und Vorname: Viehweger, Florian
Geburtsdatum: 26.08.1990
Geburtsort: Chemnitz
Familienstand: ledig
Vater: Volker Viehweger
Mutter: Eva-Maria Brunhilde Viehweger

SCHULISCHER WERDEGANG

1997 – 2001 Grundschule Ebersdorf, Chemnitz
2001 – 2009 Dr. Wilhelm Andre Gymnasium, Chemnitz
20.06.2009 Abitur: 1,7

UNIVERSITÄRER WERDEGANG

WS2010/11 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der
 Medizinischen Fakultät Mannheim der Universität
 Heidelberg
18.09.2012 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M1): 1,5
15.10.2015 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M2): 2,0
Bis 22.11.2016 Hauptstudium,
 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M3): 1,83

BERUFLICHER WERDEGANG

Seit 03/2017 Institut für Pathologie am UKE, Hamburg, Assistenzarzt

10 DANKSAGUNG

Ich bedanke mich in erster Linie bei Katja Simon-Keller für die unfassbar gute, langjährige Unterstützung während der Laborarbeiten und der Zusammenstellung dieser Arbeit. Sie hatte immer ein offenes Ohr bei Fragen und Anregungen und war allzeit verfügbar, auch wenn noch so viel Arbeit auf dem Schreibtisch oder im Labor wartete. Ich kann mir keine bessere Betreuung vorstellen und bedanke mich dafür recht herzlich bei Dir!

Ein weiterer Dank geht an Herrn Prof. Alexander Marx, Leiter des Pathologischen Instituts der Universitätsmedizin Mannheim, für die Möglichkeit, die Promotion an seinem Institut durchzuführen und diese erfolgreich zu gestalten. Mit seinem Wissen und neuen Impulsen wurde die Arbeit maßgeblich vorangetrieben. Vielen Dank dafür!

Des Weiteren bedanke ich mich beim Forschungsteam des Pathologischen Instituts der UMM Mannheim, stellvertretend bei Anna Seils, für die tolle Zusammenarbeit und die vielen gemeinsamen Stunden im Labor, die durch Eure Anwesenheit an manchen frustrierenden Tagen eindeutig angenehmer gestaltet wurden.

Ein ganz großer Dank geht auch an meine Freundin Vanessa, die allseits an meiner Seite steht und mich in jeder noch so schweren Situation unterstützt hat und stets vollstes Verständnis für meine Abwesenheiten hatte. Du hast mich immer wieder angetrieben, die Arbeit zu vollenden und mir die nötige Kraft dafür gegeben. Dafür liebe ich dich!

Auch meine Familie hat mich in jeder Lebenslage unterstützt und mir den nötigen Halt gegeben. Ich bedanke mich ganz Herzlich bei Mutti, Papi, Vicky und Pati.

Und ich bedanke mich zum Schluss bei all den Menschen, die mich in diese Zeit begleitet haben und mich auch mal auf andere Gedanken gebracht haben. Es war eine großartige Zeit!