

Aus der Klinik für Pädiatrische Hämatologie und Onkologie
der Medizinischen Hochschule Hannover

Krebsinzidenz und -spektrum bei Kindern mit genetisch nachgewiesenem Beckwith- Wiedemann-Spektrum in Deutschland: eine retrospektive Kohortenstudie

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
in der Medizinischen Hochschule Hannover

vorgelegt von

Sümeyye Erdinc (geb. Cöktü)

geboren in Bremen

Hannover 2021

Angenommen vom Senat am: 25.10.2021

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Hochschule Hannover

Präsident: Prof. Dr. med. Michael P. Manns

Betreuer/in der Arbeit: Prof. Dr. med. Christian Kratz

1. Referent/in: PD Dr. med. Anke Katharina Bergmann

2. Referent/in: Prof.'in Dr. med. Bettina Bohnhorst

Tag der mündlichen Prüfung: 25.10.2021

Prüfungsausschuss

Vorsitz: Prof. Dr. med. Arnold Ganser

1. Prüfer/in: Prof. Dr. med. Anibh Das

2. Prüfer/in: PD Dr. med. Henrike Lenzen

Diese Dissertationsschrift basiert gemäß § 3 Absatz 3 der Promotionsordnung der Medizinischen Hochschule Hannover auf folgender Publikation:

Cöktü S, Spix C, Kaiser M, Beygo J, Kleinle S, Bachmann N, Kohlschmidt N, Prawitt D, Beckmann A, Klaes R, Nevinny-Stickel-Hinzpeter C, Döhnert S, Kraus C, Kadgien G, Vater I, Biskup S, Kutsche M, Kohlhase J, Eggermann T, Zenker M, Kratz CP. Cancer incidence and spectrum among children with genetically confirmed Beckwith-Wiedemann spectrum in Germany: a retrospective cohort study. Br J Cancer. 2020 Aug;123(4):619-623. doi: 10.1038/s41416-020-0911-x.

1. Inhalt

2. Publikation	5
a) Originalverfassung der Publikation	5
b) Eigenanteil an der Publikation	10
3. Zusammenfassung	11
a) Einleitung	11
b) Material und Methoden	13
i. Labordaten / Studienpopulation	13
ii. Deutsches Kinderkrebsregister	13
iii. Analyseverfahren	14
c) Ergebnisse	14
d) Diskussion	18
4. Schlussfolgerungen	20
5. Literaturverzeichnis	21
6. Abkürzungsverzeichnis	23
7. Lebenslauf	24
8. Danksagung	25
9. Erklärung nach § 2 Abs. 2 Nr. 7 +8	26



ARTICLE

Genetics and Genomics

Cancer incidence and spectrum among children with genetically confirmed Beckwith-Wiedemann spectrum in Germany: a retrospective cohort study

Sümeyye Cöktü¹, Claudia Spix², Melanie Kaiser², Jasmin Beygo³, Stephanie Kleinle⁴, Nadine Bachmann^{5,6}, Nicolai Kohlschmidt⁷, Dirk Prawitt⁸, Alf Beckmann⁹, Ruediger Klaes¹⁰, Claudia Nevinny-Stickel-Hinzpeter¹¹, Steffi Döhnert¹², Cornelia Kraus¹³, Gundula Kadgien¹⁴, Inga Vater¹⁵, Saskia Biskup¹⁶, Michael Kutsche¹⁷, Jürgen Kohlhase¹⁸, Thomas Eggermann¹⁹, Martin Zenker²⁰ and Christian P. Kratz¹

BACKGROUND: Beckwith-Wiedemann syndrome (BWS) is a cancer predisposition syndrome caused by defects on chromosome 11p15.5. The quantitative cancer risks in BWS patients depend on the underlying (epi)genotype but have not yet been assessed in a population-based manner.

METHODS: We identified a group of 321 individuals with a molecularly confirmed diagnosis of BWS and analysed the cancer incidence up to age 15 years and cancer spectrum by matching their data with the German Childhood Cancer Registry.

RESULTS: We observed 13 cases of cancer in the entire BWS cohort vs 0.4 expected. This corresponds to a 33-fold increased risk (standardised incidence ratio (SIR) = 32.6; 95% confidence interval = 17.3-55.7). The specific cancers included hepatoblastoma ($n = 6$); nephroblastoma ($n = 4$); astrocytoma ($n = 1$); neuroblastoma ($n = 1$) and adrenocortical carcinoma ($n = 1$). The cancer SIR was highest in patients with a paternal uniparental disomy of 11p15.5 (UPDpat). A high cancer risk remained when cases of cancer diagnosed prior to the BWS diagnosis were excluded.

CONCLUSIONS: This study confirms an increased cancer risk in children with BWS. Our findings suggest that the highest cancer risk is associated with UPDpat. We were unable to confirm an excessive cancer risk in patients with IC1 gain of methylation (IC1-GOM) and this finding requires further investigation.

British Journal of Cancer <https://doi.org/10.1038/s41416-020-0911-x>

BACKGROUND

Beckwith-Wiedemann Syndrome (BWS; MIM 130650) is a multi-system human imprinting disorder. Characteristic features are macrosomia, macroglossia, visceromegaly, abdominal wall defects, neonatal hypoglycaemia and an increased occurrence of embryonal tumours.¹ The prevalence is estimated to be 1:10,000 live births.² BWS is caused by genetic or epigenetic defects of the Imprinting Centers (IC) in the chromosome 11p15.5 region. The IC1 (*H19/IGF2:IG* DMR) regulates the expression of the *H19* and

IGF2 genes, while the expression of *CDKN1C*, *KCNQ10T1* and *KCNQ1* is under the control of IC2 (*KCNQ10T1:TSS* DMR).¹ The term Beckwith-Wiedemann spectrum (BWSp) describes “classical BWS without a molecular diagnosis and BWS-related phenotypes with an 11p15.5 molecular anomaly”.¹

The molecular BWSp subgroups are: (a) *KCNQ10T1:TSS* DMR (IC2) loss of methylation (IC2-LOM); (b) chromosome 11p15.5 paternal uniparental disomy (UPDpat); (c) *H19/IGF2:IG* DMR (IC1) gain of methylation (IC1-GOM); (d) pathoge-

¹Department of Pediatric Hematology and Oncology, Hannover Medical School, Carl-Neuberg-Str. 1, Hannover 30625, Germany; ²German Childhood Cancer Registry, Institute for Medical Biostatistics, Epidemiology and Informatics, University Medical Center Mainz, Obere Zahlbacher Str. 69, Mainz 55131, Germany; ³Institut für Humangenetik, Universitätsklinikum Essen, Universität Duisburg-Essen, Hufelandstr. 55, Essen 45147, Germany; ⁴MGZ, Medizinisch Genetisches Zentrum München, Bayerstr. 3-5, München 80335, Germany; ⁵Bioscientia Ingelheim, Konrad-Adenauer-Str.17, Ingelheim 55218, Germany; ⁶Limbach Genetics, Medizinische Genetik Mainz Prof. Bergmann & Kollegen, Mainz, Germany; ⁷Institut für Klinische Genetik und Tumorgenetik Bonn, Maximilianstraße 28d, Bonn 53111, Germany; ⁸Center for Paediatrics and Adolescent Medicine, University Medical Center, Langenbeckstr. 1, Mainz 55101, Germany; ⁹MVZ Dr. Eberhard & Partner Dortmund, Humangenetik, Brauhausstr.4, Dortmund 44137, Germany; ¹⁰SYNLAB MVZ Humangenetik Mannheim GmbH, Harrlachweg 1, Mannheim 68163, Germany; ¹¹SYNLAB MVZ Humane Genetik München, Lindwurmstr. 23, München 80337, Germany; ¹²Mitteldeutscher Praxisverbund Humangenetik - Überörtliche Gemeinschaftspraxis, Friedrichstr. 38/40, Dresden 01067, Germany; ¹³Humangenetisches Institut, Universitätsklinikum Erlangen, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg (FAU), Schwabachanlage 10, Erlangen 91054, Germany; ¹⁴MVZ für Humangenetik und Molekularpathologie, Robert-Koch-Str. 10, Rostock 18059, Germany; ¹⁵Institut für Humangenetik, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel, Arnold-Heller-Str. 3, Haus 10, Kiel 24105, Germany; ¹⁶Praxis für Humangenetik / CeGaT, Paul-Ehrlich-Str. 23, Tübingen 72076, Germany; ¹⁷Gemeinschaftspraxis für Humangenetik & Genetische Labore (Peters, Kleier, Preusse), Altonaer Str. 61-63, Hamburg 20357, Germany; ¹⁸Praxis für Humangenetik Freiburg, Heinrich-von-Stephan-Str. 5, Freiburg 79100, Germany; ¹⁹Institute of Human Genetics, University Hospital RWTH Aachen, Pauwelsstr. 30, Aachen 52074, Germany and ²⁰Institute of Human Genetics, University Hospital Magdeburg, Leipziger Str. 44, Magdeburg 39120, Germany

Correspondence: Christian P. Kratz (kratz.christian@mh-hannover.de)

These author contributed equally: Thomas Eggermann, Martin Zenker, Christian P Kratz.

Received: 17 December 2019 Revised: 22 April 2020 Accepted: 6 May 2020

Published online: 26 May 2020

netic variants in *CDKN1C* and (e) deletions/duplications of 11p15.5.³

The previously reported cancer incidences in BWSp children range from 2.5 to 28.6%.⁴⁻⁶ Different authors described an (epi) genotype–phenotype correlation and reported that BWSp patients with IC1-GOM and UPDpat have the highest cancer risk.⁷ The most common cancers associated with BWSp are neuroblastoma and hepatoblastoma.⁴ More rare cancers described in children with BWSp include acute lymphoblastic leukaemia,^{8,9} adrenocortical carcinoma,¹⁰ hemangiotheloma,¹¹ melanoma,^{9,12} neuroblastoma and ganglioneuroblastoma,⁹ pancreatoblastoma,¹³ pheochromocytoma,¹⁴ rhabdomyosarcoma¹⁵ and thyroid cancer.¹⁶ The published overall childhood cancer risk in the various subgroups are the following: IC2-LOM 2.6%, IC1-GOM 28.1% (mainly Wilms tumour), UPDpat 16% (mainly Wilms tumour and hepatoblastoma), *CDKN1C* pathogenic variant 6.9% (mainly neuroblastoma) (reviewed in¹). Substantially higher overall cancer risks were found in a recent cohort study (IC2-LOM: 4.4%; IC1-GOM: 51.6%; UPDpat: 29.7%).¹⁷

However, the cancer risk in BWSp with various subtypes has not yet been quantified in a population-based manner. Therefore, we investigated the occurrence of childhood cancer among individuals from Germany with a genetically confirmed diagnosis of BWSp diagnosed between 2006 and 2018 by matching their data with the German Childhood Cancer Registry (GCCR).¹⁸

METHODS

We performed a systematic survey among molecular genetic laboratories in Germany that offer BWSp testing. Nineteen different institutions were identified, of which 17 provided their data. One communicated that they had no molecularly confirmed cases. Another one did not respond. Generally, genetic testing was performed by methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification (MS MLPA; Kit ME030, MRC Holland, Amsterdam, The Netherlands), and this assay includes both copy number and methylation analysis. Thus, duplications and UPD can be discriminated. A total of 321 individuals with molecularly confirmed BWSp were identified. We investigated the occurrence of childhood cancer in this cohort by matching their data with the GCCR.¹⁸ We also included an analysis of both benign and malignant tumours of the central nervous system (the GCCR only collects benign tumours from the CNS, but not from other regions). The study was approved by the ethical review committee at the Hannover Medical School (#3281-2016). The matching procedure has been described elsewhere.¹⁹ Briefly, molecularly defined cases of BWSp confirmed between 1 January 2006 and 31 December 2018 were identified at 17 main German laboratories that offer molecular genetic testing for BWSp. Using names and dates of birth, we matched laboratory-diagnosed cases of BWSp with the database of the GCCR (59,205 childhood cancer patients at cut-off date). As described previously, the GCCR registers ~97% of all German childhood malignancies diagnosed at an age of up to 15 years in Germany since 1980.¹⁸ All diagnoses defined in the International Classification of Childhood Cancer, Third edition are registered systematically.²⁰

The personal identifiers from individuals confirmed as having BWSp by the laboratories were encrypted using the same asymmetric key that is employed by GCCR. A matching procedure identified individuals with BWSp and childhood cancer, as described previously.^{19,21} We accumulated person-years of observation from birth to date of last follow-up, as described previously.^{19,21} Person-years of observation were left censored before 1 January 1980 and were observed through 31 December 2018, or right censored at cancer diagnosis, or their 15th birthday, or their death, if recorded, whichever occurred first. Vital status information in the laboratory data was incomplete; individuals without a specified status were assumed to be alive at the cut-off

by default. All cancer cases younger than 15 years from the registry with an encrypted name between 1980 and 2018 were included in the matching procedure. Comparisons are presented as standardised incidence ratios (SIRs) with an exact 95% confidence interval (CI), as described previously.^{19,21} Expected values were derived from the same subset of the GCCR data, which was used for the matching procedure.¹⁸ SIRs were compared as described elsewhere.²²

RESULTS

We identified 321 individuals with a molecularly confirmed diagnosis of BWSp whose childhood period overlapped with the GCCR activity. Laboratory tests were conducted between 2006 and 2018. The following epigenetic and genetic defects were identified in peripheral blood: IC2-LOM ($n = 208$), UPDpat ($n = 64$), IC1-GOM ($n = 31$), duplication/deletion ($n = 12$), pathogenic variant in *CDKN1C* ($n = 6$). This distribution is similar to the distribution known from other BWSp cohorts.⁵⁻⁷

The 321 BWSp patients included in the final analytic data file contributed 2306.6 person-years of observation. Birth years ranged from 1978 to 2018. Age at genetic testing ranged from 0 to 38 years. The male-to-female ratio was 0.84. Thirteen patients with cancer, presenting between 1989 and 2018 and diagnosed with a BWSp-causing molecular defect between the years 2006 and 2018 were identified in the BWSp cohort (Table 1).

On the basis of all person-years and the age distribution of the studied population, 0.4 cases of childhood cancer, all sites combined, would be expected vs 13 observed, a 33-fold increase (SIR = 32.6; 95% CI = 17.3–55.7) (Table 2). Age at diagnosis ranged from 0 to 3.8 years. The childhood cancer risk in BWSp patients due to UPDpat was 153-fold increased (SIR = 152.5, 95% CI = 73.1–280.5), whereas patients with IC2-LOM had an 11-fold (SIR = 11.4, 95% CI = 2.3–33.2) increased risk. There were no cancers

Table 1. Description of the 13 individuals with BWSp who developed cancer.

Patient	Sex	Age (months) at genetic testing	Epigenetic mutation	Neoplasm (age in months)
1	M	6	IC2-LOM	Astrocytoma (45)
2 ^a	F	0 ^b	UPDpat	Neuroblastoma & Ganglioneuroblastoma (0 ^b)
3 ^a	F	40	UPDpat	Hepatoblastoma (5)
4 ^a	M	14	UPDpat	Nephroblastoma (12)
5 ^a	F	143	UPDpat	Adrenocortical carcinoma (10)
6 ^a	M	63	UPDpat	Hepatoblastoma (3)
7	F	3	IC2-LOM	Hepatoblastoma (12)
8 ^a	F	6	IC2-LOM	Nephroblastoma (3)
9 ^a	M	349 (29 y)	UPDpat	Nephroblastoma (41)
10 ^a	M	277 (23 y)	UPDpat	Hepatoblastoma (10)
11	M	3	UPDpat	Hepatoblastoma (7)
12	F	7	UPDpat	Nephroblastoma (7)
13 ^a	M	1	UPDpat	Hepatoblastoma (0)

F female, M male, IC2-LOM IC2 loss of methylation, UPDpat paternal uniparental disomy of 11p15.5, y years.

^aExcluded cases for sensitivity analysis (see results): In these patients the positive cancer history may have prompted molecular testing for BWSp.

^bThe newborn had the tumour diagnosis a few days before the BWSp diagnosis.

Table 2. Molecular subgroup-dependent categorisation of BWSp patients identified in the 17 participating laboratories.

Molecular diagnosis	N	Cases of cancer ^a		PY	SIR, 95% CI	Cancer risk up to 15th birthday (%)
		Observed	Expected			
Sum	321	13	0.3991	2306.6	32.6 (17.3–55.7)	4.4
IC2-LOM	208	3	0.2639	1515.9	11.4 (2.3–33.2)	1.6
UPDpat	64	10	0.0656	361.4	152.5 (73.1–280.5)	17.6
IC1-GOM	31	0	0.0449	268.9	0.0 (0.0–82.2)	0.0
Dup/Del	12	0	0.0168	106.7	0.0 (0.0–219.9)	0.0
CDKN1C	6	0	0.0079	53.6	0.0 (0.0–465.7)	0.0

CI confidence interval, Dup duplication, Del deletion, IC imprinting center, IC1-GOM IC1 gain of methylation, IC2-LOM IC2 loss of methylation, PY person-years, SIR standardised incidence ratio, UPDpat paternal uniparental disomy of 11p15.5.

^aData from the German Childhood Cancer Registry (see Materials and Methods for details).

observed either among the 31 IC1-GOM patients (268.9 PY; 0.0449 cases expected), the 12 duplication/deletion patients or the six patients with a pathogenetic variant in *CDKN1C*. The cancer risk up to the 15th birthday was 4.4% in the entire cohort, 17.6% for patients with UPDpat and 1.6% for patients with IC2-LOM.

SIRs of selected cancers in individuals with BWSp by cancer type are given in Table 3. High SIRs were observed for hepatoblastoma (UPDpat: SIR = 3128.7, 95% CI = 1015.9–7301.2; IC2-LOM: SIR = 174.1, 95% CI = 4.4–970.1), nephroblastoma (UPDpat: SIR = 575.1, 95% CI = 118.6–1680.5; IC2-LOM: SIR = 51.5, 95% CI = 1.30–287.0) and adrenocortical carcinoma (UPDpat: SIR = 10639.9, 95% CI = 269.4–59281.7).

To reduce selection bias, we conducted a sensitivity analysis by excluding the nine cases in whom the cancer diagnosis was made prior to the molecular BWSp (excluded cases are marked in Table 1). After exclusion of these cases, we calculated an unbiased 12-fold increased cancer risk (SIR = 12.3, 95% CI = 3.4–31.5) for all BWSp patients combined.

DISCUSSION

This is, to our knowledge, the first population-based study to quantify the cancer risk in children with BWSp with IC1-LOM, IC2-GOM, UPDpat, deletions/duplications and pathogenetic variants in *CDKN1C*. We observed a significant excess risk for all childhood cancers combined compared with the general population. The elevated overall cancer risk was primarily due to significant excesses of hepatoblastoma and nephroblastoma. Notably, we also observed rare cancers, such as astrocytoma and ganglioneuroblastoma. We found one previous case of ganglioneuroblastoma⁹ and another case of brain glioma²³ in the literature.

The chromosome 11p15.5 region that is altered in individuals with BWSp harbours several imprinted genes, among them *CDKN1C*, *IGF2* and *H19*, which are regulators of growth.²⁴ Therefore, the observed high cancer risk in individuals with BWSp who carry a constitutional or mosaic lesion in the 11p15.5 region is biologically plausible. Although a number of studies have shown a significant association between cancer risk and BWSp molecular subtype,⁶ a population-based epidemiologic study has not yet been conducted to address this topic quantitatively. This approach has the advantage of being less prone to ascertainment bias and allows for the calculation of SIRs. Thus, methodological differences in study design, including different ascertainment and follow-up criteria, prevent a direct comparison of these studies with ours. Brioude et al. studied 407 patients with BWSp including 257 patients with IC2-LOM, 81 with UPDpat, 35 with IC1-GOM and 34 individuals with a pathogenic variant in *CDKN1C*.⁶ Patients were either followed at the authors' centre or referred by other centres for suspected BWSp. A form was used to collect data at the time of

diagnosis and at follow-up. 8.6% of all patients developed tumours. The highest cancer incidence was observed among BWSp children with IC1-GOM (28.6%) and UPDpat (17.3%).

Maas et al. performed a literature review evaluating reported data from 1971 BWSp patients.⁵ 155/1923 (8%) of BWSp children developed tumours (IC2-LOM 2.6% with cancer, IC1-GOM 28%, UPDpat 16% and pathogenetic variants in *CDKN1C* 6.9%).

Cooper et al. studied additional 200 individuals with a confirmed molecular genetic diagnosis of BWSp.⁷ Cancer was more frequent in individuals with IC1-GOM or UPDpat (13%) than in those with a pathogenetic variant in *CDKN1C* or IC2-LOM (1%).

Duffy et al. described a cohort of 344 individuals with BWSp registered in the growth and genetic/epigenetic disorder registry at Children's Hospital of Philadelphia. Two hundred and nineteen individuals were included in the subgroup tumour analysis. A tumour was diagnosed in 43/219 (19.6%) of individuals: IC2-LOM: 5/114 (4.4%), IC1-GOM: 16/31 (51.6%) and UPDpat: 22/74 (29.7%).¹⁷

In contrast to these published studies, we have collected molecularly confirmed cases of BWSp in a population-based manner and have calculated the relative cancer risks compared to population-based incidence rates in an effort to analyse the cancer risks employing a less biased method.

The overall cumulative childhood cancer incidence observed in this cohort are in agreement with the cancer incidences described in previous studies.^{5–7} We were able to demonstrate the elevated childhood cancer risk in individuals with BWSp compared to the population average risk, even when all patients with a cancer diagnosis prior to the BWSp diagnosis were excluded. In agreement with previous studies, we found a high cancer risk to be associated with UPDpat.¹ The risk in patients with UPDpat was significantly higher than the risk in IC2-LOM (Table 2). To our surprise, we observed no cases of cancer in BWSp children with IC1-GOM; however, this finding was not statistically significant. This molecular subgroup is believed to be associated with the highest cancer risk.¹ Larger cohorts of patients with IC1-GOM may be required to calculate the cancer risk more precisely. In agreement with previous reports, we observed a cumulative childhood cancer risk of <3% in BWSp children with IC2-LOM.^{1,5–7} Notably, even with small percentage risk this was still an 11-fold increased cancer risk with a wide CI. Although some molecular subgroups have a lower risk of cancer, parents who decline surveillance¹ should be aware that the absolute of cancer is still increased in these groups compared with the general population.

Our study has several limitations. (1) The study is not powered to detect any increase (or decrease) in incidence of the more common childhood cancers. Combining data with other cohorts may be a strategy to reach this goal. (2) We were unable to ascertain cancers in patients after their 15th birthday, as the

Table 3. Standardised incidence ratios for specific cancers in patients with BWSp with UPDpat and IC2-LOM.

Molecular diagnosis	Cancer type	N	Cases of cancer ^a		PY	SIR, 95% CI
			Observed	Expected		
UPDpat	Hepatoblastoma	64	5	0.0016	361.4	3128.7 (1015.9–7301.2)
	Nephroblastoma		3	0.0052		575.1 (118.6–1680.5)
	Neuroblastoma ^b		1	0.0077		129.0 (3.3–719.0)
	ACC		1	0.0001		10639.9 (269.4–59281.7)
IC2-LOM	Astrocytoma	208	1	0.0254	1515.9	39.3 (1.0–219.7)
	Hepatoblastoma		1	0.0057		174.1 (4.4–970.1)
	Nephroblastoma		1	0.0194		51.5 (1.30–287.0)

ACC adrenocortical carcinoma, CI confidence interval, IC2-LOM IC2 loss of methylation, PY person-years, SIR standardised incidence ratio, UPDpat paternal uniparental disomy of 11p15.5.1.

^aData from the German Childhood Cancer Registry (see Materials and Methods for details).

^bThe patient had neuroblastoma and ganglioneuroblastoma.

case-identifying resource was a childhood cancer registry. Germany does not yet have an equivalent national cancer registry for adults. Thus, the risk of adolescent or adult-onset cancers in BWSp cannot be investigated here. Notably, new evidence does support an increase in cancer risk for BWSp beyond childhood.²⁵ (3) We did not have access to patient medical records, and thus could not determine each subject's age or date at clinical syndrome diagnosis in case this age differed from the molecular diagnosis. It is likely that, in some instances, the BWSp diagnosis was prompted by the development of a childhood cancer. Of note, in nine patients, the cancer was diagnosed before the molecular confirmation of BWSp (Table 1). If we exclude these nine cases from our analysis, the remaining cancer risk for all cancers among all BWSp individuals combined remains significantly elevated (SIR = 12.3, 95% CI = 3.4–31.5). Conversely, patients with BWSp are more likely to undergo cancer surveillance potentially leading to an overestimation of certain cancer diagnoses. (4) Vital status information in the laboratory data was incomplete; individuals without a specified status were assumed to be alive at the cut-off by default potentially leading to an underestimation of the cancer risk. (5) As a consequence of identifying susceptible individuals through genetic diagnostic labs, our analytic cohort excludes BWSp patients who have never undergone genetic testing (i.e. who were diagnosed clinically without molecular confirmation) as well as BWSp patients who had a clinical diagnosis but negative molecular testing. There is no way to evaluate the impact of this subgroup's absence on our analysis. Given the fact that the percentage of tested and untested individuals with BWSp is unknown, we are unable to calculate the BWSp incidence based on our data. (6) The lack of replicating previous results on an increased cancer risk for IC1-GOM might reflect the smaller number of Person-Years analysed in this group (5-fold less than for IC2-LOM). (7) One German laboratory with molecularly confirmed cases of BWSp did not participate in this research and it cannot be ruled out that some additional patients received their molecular tests in laboratories that we did not identify, because their diagnostic portfolio is not publicly available, or in laboratories from other countries. However, outsourcing of genetic testing is unusual in Germany, as health insurance companies routinely cover genetic testing only if done in a national lab.

In conclusion, this population-based study demonstrated an increased childhood cancer risk, especially hepatoblastoma and nephroblastoma, in children with BWSp. Our findings suggest that in children with BWSp the highest cancer risk is associated with UPDpat, whereas the risk in IC1-GOM requires further investigation. Our data are consistent with current surveillance guidelines.¹

ACKNOWLEDGEMENTS

Not applicable

AUTHOR CONTRIBUTIONS

C.P.K., T.E. and M.Z. contributed to the conception of the study design. S.C., C.P.K., T.E. and M.Z. contributed to the analysis and interpretation of data, and to the drafting and revision of the manuscript. C.S. and M.K. contributed to the matching procedure and statistical calculations. S.C. collected the data that was generated by J.B., S.K., N.B., N.K., D.P., A.B., R.K., C.N.S.H., S.D., C.K., G.K., I.V., S.B., M.K., J.K., T.E. and M.Z.

ADDITIONAL INFORMATION

Ethics approval and consent to participate The study was approved by the ethical review committee at the Hannover Medical School (#3281-2016). A consent was not required due to the retrospective nature of the study and the fact that there was no way to identify any of the subjects. The study was performed in accordance with the Declaration of Helsinki.

Consent to publish All authors consent the material to publish.

Data availability Data are held within the Department of Pediatric Hematology and Oncology at Hannover Medical School and are available on application.

Competing interests The authors declare no competing interests.

Funding information This work was supported by the Deutsche Kinderkrebstiftung (DKS2017.02) and the Schlag-Stiftung.

Note This work is published under the standard license to publish agreement. After 12 months the work will become freely available and the license terms will switch to a Creative Commons Attribution 4.0 International (CC BY 4.0).

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

REFERENCES

- Brioude, F., Kalish, J. M., Mussa, A., Foster, A. C., Blik, J., Ferrero, G. B. et al. Expert consensus document: Clinical and molecular diagnosis, screening and management of Beckwith-Wiedemann syndrome: an international consensus statement. *Nat. Rev. Endocrinol.* **14**, 229–249 (2018).
- Mussa, A., Russo, S., De Crescenzo, A., Chiesa, N., Molinatto, C., Selicorni, A. et al. Prevalence of Beckwith-Wiedemann syndrome in North West of Italy. *Am. J. Med. Genet. A* **161A**, 2481–2486 (2013).
- Eggermann, T., Perez de Nanclares, G., Maher, E. R., Temple, I. K., Tumer, Z., Monk, D. et al. Imprinting disorders: a group of congenital disorders with overlapping patterns of molecular changes affecting imprinted loci. *Clin. Epigenetics* **7**, 123 (2015).

4. Mussa, A., Molinatto, C., Baldassarre, G., Riberi, E., Russo, S., Larizza, L. et al. Cancer risk in Beckwith-Wiedemann syndrome: a systematic review and meta-analysis outlining a novel (epi)genotype specific histotype targeted screening protocol. *J. Pediatr.* **176**, 142–149. e141 (2016).
5. Maas, S. M., Vansenne, F., Kadouch, D. J., Ibrahim, A., Bliet, J., Hopman, S. et al. Phenotype, cancer risk, and surveillance in Beckwith-Wiedemann syndrome depending on molecular genetic subgroups. *Am. J. Med. Genet. A* **170**, 2248–2260 (2016).
6. Brioude, F., Lacoste, A., Netchine, I., Vazquez, M. P., Auber, F., Audry, G. et al. Beckwith-Wiedemann syndrome: growth pattern and tumor risk according to molecular mechanism, and guidelines for tumor surveillance. *Horm. Res. Paediatr.* **80**, 457–465 (2013).
7. Cooper, W. N., Luharia, A., Evans, G. A., Raza, H., Haire, A. C., Grundy, R. et al. Molecular subtypes and phenotypic expression of Beckwith-Wiedemann syndrome. *Eur. J. Hum. Genet.* **13**, 1025–1032 (2005).
8. Abadie, C., Bernard, F., Netchine, I., Sanlaville, D., Roque, A., Rossignol, S. et al. Acute lymphocytic leukaemia in a child with Beckwith-Wiedemann syndrome harbouring a CDKN1C mutation. *Eur. J. Med. Genet.* **53**, 400–403 (2010).
9. Brioude, F., Netchine, I., Praz, F., Le Jule, M., Calmel, C., Lacombe, D. et al. Mutations of the imprinted CDKN1C gene as a cause of the overgrowth Beckwith-Wiedemann syndrome: clinical spectrum and functional characterization. *Hum. Mutat.* **36**, 894–902 (2015).
10. Eltan, M., Arslan Ates, E., Cerit, K., Menevse, T. S., Kaygusuz, S. B., Eker, N. et al. Adrenocortical carcinoma in atypical Beckwith-Wiedemann syndrome due to loss of methylation at imprinting control region 2. *Pediatr. Blood Cancer* **67**, e28042 (2020).
11. Drut, R., Drut, R. M. & Toulouse, J. C. Hepatic hemangioendotheliomas, placental chorioangiomas, and dysmorphic kidneys in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Pediatr. Pathol.* **12**, 197–203 (1992).
12. Livingstone, E., Caliebe, A., Egberts, F., Proksch, E., Buiting, K., Schubert, C. et al. Malignant melanoma and Wiedemann-Beckwith syndrome in childhood. *Klin. Padiatr.* **222**, 388–390 (2010).
13. Lee, C. T., Tung, Y. C., Hwu, W. L., Shih, J. C., Lin, W. H., Wu, M. Z. et al. Mosaic paternal haploidy in a patient with pancreatoblastoma and Beckwith-Wiedemann spectrum. *Am. J. Med. Genet. A* **179**, 1878–1883 (2019).
14. Kalish, J. M., Conlin, L. K., Mostoufi-Moab, S., Wilkens, A. B., Mulchandani, S., Zolley, K. et al. Bilateral pheochromocytomas, hemihyperplasia, and subtle somatic mosaicism: the importance of detecting low-level uniparental disomy. *Am. J. Med. Genet. A* **161A**, 993–1001 (2013).
15. Piersigilli, F., Auriti, C., Mondì, V., Francalanci, P., Salvatori, G. & Danhaive, O. Decreased CDKN1C expression in congenital alveolar rhabdomyosarcoma associated with Beckwith-Wiedemann syndrome. *Indian J. Pediatr.* **83**, 1476–1478 (2016).
16. Weksberg, R., Nishikawa, J., Caluseriu, O., Fei, Y. L., Shuman, C., Wei, C. et al. Tumor development in the Beckwith-Wiedemann syndrome is associated with a variety of constitutional molecular 11p15 alterations including imprinting defects of KCNQ1OT1. *Hum. Mol. Genet.* **10**, 2989–3000 (2001).
17. Duffy, K. A., Cielo, C. M., Cohen, J. L., Gonzalez-Gandolfi, C. X., Griff, J. R., Hathaway, E. R. et al. Characterization of the Beckwith-Wiedemann spectrum: diagnosis and management. *Am. J. Med. Genet. C. Semin. Med. Genet.* **181**, 693–708 (2019).
18. Kaatsch, P. German Childhood Cancer Registry and its favorable setting. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* **47**, 437–443 (2004).
19. Hammer, G. P., Seidenbusch, M. C., Schneider, K., Regulla, D. F., Zeeb, H., Spix, C. et al. A cohort study of childhood cancer incidence after postnatal diagnostic X-ray exposure. *Radiat. Res.* **171**, 504–512 (2009).
20. Steliarova-Foucher, E., Stiller, C., Lacour, B. & Kaatsch, P. International Classification of Childhood Cancer, third edition. *Cancer* **103**, 1457–1467 (2005).
21. Kratz, C. P., Franke, L., Peters, H., Kohlschmidt, N., Kazmierczak, B., Finckh, U. et al. Cancer spectrum and frequency among children with Noonan, Costello, and cardio-facio-cutaneous syndromes. *Br. J. Cancer* **112**, 1392–1397 (2015).
22. Breslow, N. E. & Day, N. E. Statistical methods in cancer research. Volume II—The design and analysis of cohort studies. *IARC Sci. Publ.* **82**, 1–406. (1987).
23. Weinstein, J. M., Backonja, M., Houston, L. W., Gilbert, E. E., Finlay, J. L., Duff, T. A. et al. Optic glioma associated with Beckwith-Wiedemann syndrome. *Pediatr. Neurol.* **2**, 308–310 (1986).
24. Shuman, C., Beckwith, J. B. & Weksberg, R. in *GeneReviews(®)* (eds. M. P. Adam et al.) University of Washington, Seattle (1993).
25. Gazzin, A., Carli, D., Sirchia, F., Molinatto, C., Cardaropoli, S., Palumbo, G. et al. Phenotype evolution and health issues of adults with Beckwith-Wiedemann syndrome. *Am. J. Med. Genet. A* **179**, 1691–1702 (2019).

b) Eigenanteil an der Publikation

Im Rahmen meiner Doktorarbeit in der Klinik für Pädiatrische Hämatologie und Onkologie habe ich als Erstautorin dieser Publikation das Manuskript verfasst und alle Tabellen und Abbildungen erstellt. Herr Prof. Dr. med. Christian Kratz, Herr Prof. Dr. med. Thomas Eggermann und Herr Prof. Dr. med. Martin Zenker sowie Frau PD Dr. med. Claudia Spix standen mir dabei unterstützend zur Seite. Die Erfassung und Rekrutierung aller patientenspezifischen Beckwith-Wiedemann Spektrum (BWSp) Daten sowie die Interpretation der genetischen Befunde habe ich eigenständig durch einen Besuch aller teilnehmenden deutschen Labore durchgeführt. Der Datenabgleich zwischen dem Deutschen Kinderkrebsregister und der BWSp-Labordaten sowie die statistischen Berechnungen erfolgten durch Frau PD Dr. Claudia Spix und Frau Melanie Kaiser.

Die Auswertung der statistischen Ergebnisse, die Literaturrecherche sowie die Zusammenschau der Ergebnisse im aktuellen Kontext habe ich eigenständig umgesetzt. Herr Prof. Dr. med. Christian Kratz, Herr Prof. Dr. med. Thomas Eggermann und Herr Prof. Dr. med. Martin Zenker standen mir hier ebenfalls unterstützend zur Seite.

Hinweis: Im folgenden Manuskript wird aus Gründen der besseren Lesbarkeit das generische Maskulinum verwendet. Weibliche und anderweitige Geschlechteridentitäten werden dabei ausdrücklich mitgemeint.

3. Zusammenfassung

a) Einleitung

Unter Krebsprädispositionssyndromen (KPS) werden multiple genetische Erkrankungen mit erhöhtem Krebsrisiko verstanden, welche eine bedeutsame Assoziation mit pädiatrischen Neoplasien aufweisen. Jüngste Studien deuten darauf hin, dass mindestens 10% aller Krebserkrankungen bei Kindern und Jugendlichen auf genetische Prädispositionsfaktoren zurückzuführen sind. [1, 2] Diese Tatsache führt zu der Konsequenz, dass eine umfassende Forschung auf diesem Gebiet notwendig ist. Zu den KPS gehört unter anderem das bei ca. 1:10.000 Lebendgeburten auftretende Beckwith-Wiedemann Syndrom (BWS), welches als ein kongenitales Großwuchssyndrom definiert wird und den humangenetischen Imprintingstörungen angehört. [3] Charakteristische Merkmale des BWS sind Makrosomie, Makroglossie, Viszeromegalie, Bauchwanddefekte (Omphalozele, umbilikale Hernien, Rektusdiastase), Hemihypertrophie, neonatale Hypoglykämie sowie das gehäufte Auftreten von embryonalen Tumoren. [4] Insbesondere das Hepatoblastom sowie das Nephroblastom gehören zu dem Tumorspektrum des BWS. [4]

Hauptsächlich führen unterschiedliche epigenetische und genetische Defekte in den Imprinting Centern (IC) der chromosomalen Region 11p15.5 zum Erscheinungsbild des BWS, wobei Hyper- und Hypomethylierungen eine besondere Rolle spielen. [5] Die IC sind jeweils durch eine differenziell methylierte Region (DMR) gekennzeichnet. [4] IC1, auch bekannt als *H19/IGF2:IG DMR (H19/IGF2 intergenic DMR)*, reguliert die Expressionen der *H19* und *Insulin-like Growth Factor 2 (IGF2)* Gene, während IC2, auch bezeichnet als *KCNQ1OT1:TSS DMR (KCNQ1OT1 transcriptional start site DMR)* die Expressionen der *CDKN1C*, *KCNQ10T1* und *KCNQ1* Gene reguliert. [5] Vor allem *IGF2* und *CDKN1C* haben eine bedeutende Funktion als Regulatoren des fetalen Wachstums. Eine Überexpression des *IGF-2* wird in mehreren Krebserkrankungen beobachtet. [4, 6, 7] Wichtig zu erwähnen ist, dass in 20% aller BWS-Fälle mit phänotypischen Merkmalen kein molekulargenetischer Nachweis möglich ist. [8]

Die molekularen Subtypen des BWS lassen sich folgendermaßen einteilen:

- IC1 Hypermethylierung (IC1 Gain of Methylation (IC1-GOM))
- IC2 Hypomethylierung (IC2 Loss of Methylation (IC2-LOM))
- Paternale Uniparentale Disomie des Chromosom 11p15.5 (UPDpat)
- Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1C Gen (*CDKN1C*) Mutation
- Duplikationen/Deletionen der chromosomalen Region 11p15.5

Zu den am häufigsten auftretenden genetischen Subgruppen gehören die IC2-LOM, welche 50-60% der BWS Fälle ausmacht, sowie die UPDpat, welche in bis zu 20-25% aller Fälle

vorkommt. Die IC1-GOM tritt in 5-10% aller Fälle auf. *CDKN1C* Mutationen treten in sporadischer Form bei bis zu 5% der BWS Fälle auf, wohingegen bei Fällen von familiärer Häufung ein vermehrtes Auftreten von bis zu 40% beobachtet wird. [9]

Im März 2017 wurden einheitliche Leitlinien bezüglich der BWS Diagnose und Therapie sowie eine neue, umfassende Definition durch eine internationale Konsensus Gruppe bekannt gegeben. Der Begriff „Beckwith-Wiedemann Spektrum“ (BWSp) beschreibt das klassische Beckwith-Wiedemann Syndrom (BWS) ohne molekulare Diagnose sowie mit BWS vereinbare Phänotypen mit einer molekularen Veränderung des chromosomalen Bereichs 11p15.5. [4]

Das mit dem BWSp verbundene Krebsrisiko wurde bisher nur von wenigen Studien untersucht. Zusammenfassend wurde in der bisherigen Literatur bei BWSp Patienten eine Gesamtumorprävalenz von ca. 2.5-28.6% beschrieben. Vor allem wurde ein erhöhtes Tumorrisiko für die IC1-GOM sowie UPDpat Subgruppen beobachtet. [10-13] Eine populationsbasierte Studie erfolgte unseres Wissens bisher nicht.

Ziel dieser Arbeit ist es, sowohl die Krebsinzidenz als auch das Krebspektrum bei BWSp Patienten populationsbasiert zu untersuchen und (epi)genetisch bedingte Unterschiede bezüglich des Krebsrisikos näher zu erforschen und zu quantifizieren.

Die Fragestellungen lauten im Einzelnen:

- Wie hoch ist die allgemeine Krebsinzidenz bei Kindern mit BWSp?
- Wie hoch ist die Krebsinzidenz für die jeweiligen molekularen Subtypen:
 - o IC1 Hypermethylierung
 - o IC2 Hypomethylierung
 - o UPDpat
 - o Duplikation/Deletion
 - o *CDKN1C* Mutation
- Welche Krebsarten kommen bei Kindern mit BWSp am häufigsten vor?

b) Material und Methoden

Diese Studie wurde durch die Ethikkommission der Medizinischen Hochschule Hannover unter der Geschäftsnummer 3281-2016 geprüft und positiv begutachtet. Die zu untersuchenden Parameter wurden retrospektiv durch eine Recherche sämtlicher Labordaten erhoben und mit Daten des Deutschen Kinderkrebsregisters (DKKR) abgeglichen.

i. Labordaten / Studienpopulation

In 17 verschiedenen deutschen Institutionen, in denen eine hochqualitative molekulargenetische Testung eines BWSp angeboten wird, wurden Patientendaten von BWSp Betroffenen systematisch erhoben. Die genetische Testung erfolgte hauptsächlich über die „methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification“-Methode (MS MLPA; Kit ME030, MRC Holland, Amsterdam, The Netherlands). [14] Zu den in den Laboren erhobenen Daten gehörten Patientennamen, Geschlecht, Geburtsdatum, Wohnsitz, molekulargenetische Details der BWSp Diagnose sowie die Fragestellung, ob ein Tumor Anlass für die genetische Testung war. Insgesamt wurden 321 BWSp Patientendaten erfasst. Die Studienpopulation besteht ausschließlich aus Personen mit einem molekulargenetisch nachgewiesenen BWSp, welche in dem Zeitraum vom 01. Januar 2006 bis zum 31. Dezember 2018 getestet wurden und ihren Wohnsitz in Deutschland haben.

ii. Deutsches Kinderkrebsregister

Das DKKR erfasst seit 1980 in Deutschland Krebsfälle bei Kindern unter 15 Jahren und stellt eine Vergleichsgruppe dar, die es ermöglicht, die Krebsrate in der Allgemeinbevölkerung in der oben genannten Altersgruppe mit der Krebsrate bei Kindern und Jugendlichen mit einem BWSp zu vergleichen. Auf Grund der engen Zusammenarbeit zwischen pädiatrischen Onkologen und pädiatrisch onkologischen Therapieoptimierungsstudien sowie der hohen Registrierungs- und Teilnahmebereitschaft seitens Ärzten und Patienten erfolgt eine qualitative und nahezu vollständige Datenerfassung aller kindlichen Krebsfälle in Deutschland. In der Datenbank des DKKR befinden sich Diagnosen, die nach der „International Classification of Childhood Cancer, Third edition“ definiert sind. Zu diesen gehören alle bösartigen Krebserkrankungen sowie gutartige als auch bösartige Tumore des zentralen Nervensystems. Diese epidemiologische Datenbank dient als Grundlage für Forschungsfragen, indem sie die altersentsprechende Krebsinzidenzrate (Neuerkrankungsrate) zur Verfügung stellt. [15] Berechnet wird die Krebsinzidenzrate, indem die Anzahl von neu aufgetretenen Krebsfällen „in einem bestimmten Gebiet und Zeitraum auf die zugehörige Wohnbevölkerung im entsprechenden Alter“ bezogen wird. [16]

iii. Analyseverfahren

Anhand einer Kryptographie-Software konnten die Daten der einzelnen Laboreinrichtungen extrahiert werden, ohne dass sie die Identifikation der einzelnen Personen zuließen. Die DKKR Daten wurden mit Hilfe desselben Algorithmus wie die Verschlüsselung der BWSp Labordaten pseudonymisiert. Diese BWSp-spezifischen Daten wurden mit der Datenbank des DKKR am Stichtag, dem 15.03.2019, abgeglichen. Zu diesem Zeitraum beinhaltete die Datenbank des DKKR 59.205 Kinderkrebspatienten. Aus diesem qualitativen Abgleichverfahren wurde die Schnittmenge aller BWSp Patienten ermittelt, die sowohl in den Labordaten als auch in den DKKR Daten vorkommen.

Alle Probanden aus den Labordaten (BWSp Kohorte) steuern beobachtete Personenjahre (PJ) bei. Die Beobachtung beginnt ab dem Geburtstag, dem 01.01.1980 in West Deutschland oder dem 01.01.1991 in den neuen Bundesländern. Hierbei wird das Datum genommen, welches zuerst eintrat. Sie endet an dem Datum der Krebsdiagnose, dem 15. Geburtstag oder dem 31. Dezember 2018.

Das Krebsrisiko wird durch die Berechnung des standardisierten Inzidenz-Quotienten (standardized incidents ratio: SIR) quantifiziert. Setzt man die erwartete Anzahl an Krebspatienten den beobachteten Krebserkrankungen bei Probanden mit einem BWSp ins Verhältnis, so erhält man die SIR. Für die SIR Berechnungen dienen die Krebsinzidenzraten der altersentsprechenden Allgemeinbevölkerung vom DKKR als Referenz. Für jede errechnete SIR wird zudem ein zweiseitiges 95%-Konfidenzintervall (KI) bestimmt. Außerdem wird das Lebenszeitrisiko an Krebs zu erkranken in der BWSp Kohorte bis zum 15. Geburtstag berechnet.

c) Ergebnisse

Mithilfe der Labordaten wurde ein Datensatz von 333 molekulargenetisch nachgewiesenen BWSp Fällen erzielt. Diejenigen, deren Namen und Geburtsdaten fehlten und somit einen Abgleich mit dem DKKR unmöglich machten, wurden ausgeschlossen. Weiterhin fand ein Ausschluss von Patienten statt, die keinen Wohnsitz in Deutschland hatten. Außerdem wurden die Patienten ausgeschlossen, deren Alter im Zeitraum von 1980-2019 nicht zwischen 0 und 14 Jahren waren, da ihre Kindheitsperiode sich nicht mit dem Erfassungszeitraum des DKKR überlappte.

Aus den ursprünglich erfassten Labordaten konnten 321 Patientendaten für die weitere Analyse benutzt werden. Das Verhältnis von Jungen zu Mädchen betrug 0,84.

Diese steuerten der BWSp Kohorte 2306.6 PJ bei. Hierbei ergaben sich folgende zeitliche Zusammenhänge:

- Geburtsjahre der BWSp Patienten lagen in den Jahren zwischen 1978 und 2018
- Genetische Testungen auf BWSp wurden zwischen 2006 und 2018 durchgeführt
- Krebsdiagnosen wurden zwischen 1989 und 2018 gestellt

Innerhalb der BWSp Patientenkohorte wurden folgende (epi)genetische Subgruppen identifiziert: IC2-LOM (n=208), UPDpat (n=64), IC1-GOM (n=31), Duplikation/Deletion (n=12), *CDKN1C* Mutation (n=6). Diese Verteilung entspricht der in der Literatur beschriebenen Subgruppen Verteilung und ist in Abbildung 1 dargestellt. [9-11, 17]

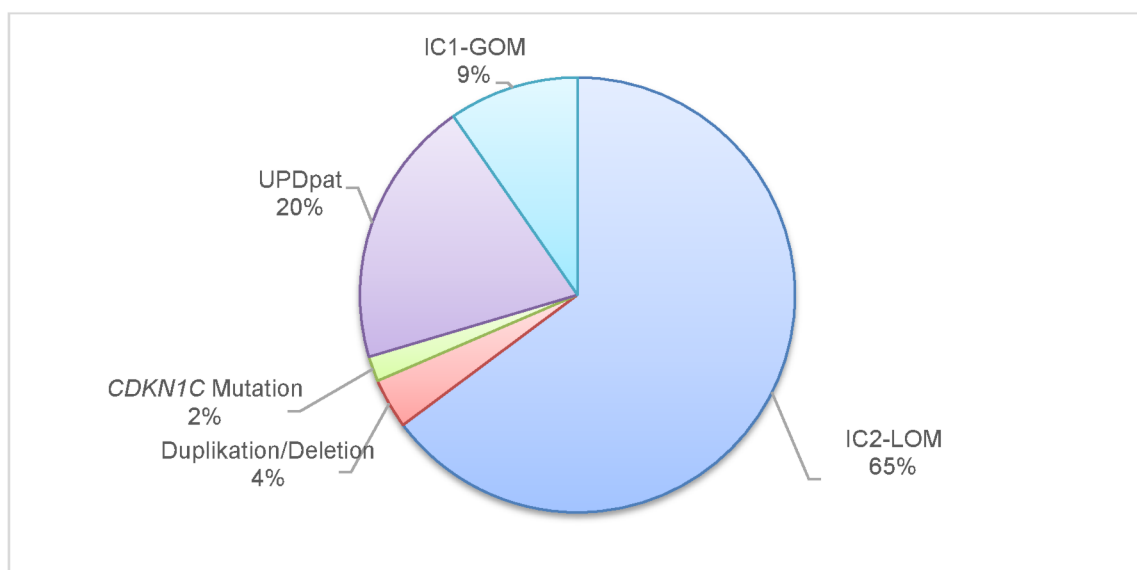


Abbildung 1: Verteilung der BWSp Subgruppen innerhalb der gesamten Studienpopulation

Insgesamt wurden 13 Krebsfälle in der BWSp Kohorte identifiziert, welche in Tabelle 1 aufgelistet sind. Bei 10 dieser 13 Krebsfälle handelte es sich um UPDpat-Träger. Drei weitere Krebsfälle wurden in der Untergruppe IC2-LOM beobachtet. Unter den IC1-GOM Trägern, *CDKN1C* Mutationen und Duplikationen/Deletionen wurden keine Krebsfälle beobachtet.

Tabelle 1: Beschreibung der 13 Personen mit BWSp, die Krebserkrankungen entwickelt haben. (*ausgeschlossene Fälle für die Sensitivitätsanalyse (siehe Ergebnisse): Bei diesen Patienten kann die positive Krebsanamnese eine molekulare Testung auf BWSp veranlasst haben.)

Molekulare Diagnose	Geschlecht	Genetisches Diagnosealter in Monaten (Alter in Jahren)	Neoplasie (Alter in Monaten)
UPDpat*	W	0	Neuro- & Ganglioneuroblastom (0)
UPDpat*	W	40	Hepatoblastom (5)
UPDpat*	M	14	Nephroblastom (12)
UPDpat*	W	143	Adrenokortikales Karzinom (10)
UPDpat*	M	63	Hepatoblastom (3)
UPDpat*	M	349 (29 J)	Nephroblastom (41)
UPDpat*	M	277 (23 J)	Hepatoblastom (10)
UPDpat	M	3	Hepatoblastom (7)
UPDpat	W	7	Nephroblastom (7)
UPDpat*	M	1	Hepatoblastom (0)
IC2-LOM	W	3	Hepatoblastom (12)
IC2-LOM	M	6	Astrozytom (45)
IC2-LOM*	W	6	Nephroblastom (3)

Auf der Grundlage der vom DKKR zur Verfügung gestellten Parameter und unter Berücksichtigung der oben angegebenen PJ sowie der Altersverteilung der Bevölkerung beträgt die Anzahl an erwarteten Krebsfällen 0,4. Wie in Tabelle 1 aufgelistet, wurden 13 Krebsfälle in der BWSp Kohorte identifiziert, was einer 32-fach erhöhten Krebsinzidenzrate der gesamten BWSp Patienten (SIR = 32,6; 95% KI = 17,3-55,7) gegenüber der altersentsprechenden Gesamtbevölkerung entspricht. Das Krebsrisiko bei UPDpat Patienten ist 152-fach und somit am stärksten erhöht (SIR = 152,5, 95% KI= 73,1-280,5), während Patienten mit IC2-LOM ein 11-fach erhöhtes Risiko besitzen (SIR= 11,4, 95% KI= 2,3-33,2). Es wurden keine Krebserkrankungen unter den 31 IC1-GOM Patienten (268,9 PJ; 0,045 Fälle erwartet), den 12 Duplikations-/Deletionspatienten sowie den sechs Patienten mit einer *CDKN1C* Mutation beobachtet. Das errechnete Lebenszeitrisiko in der gesamten BWSp Kohorte bis zum 15. Geburtstag beträgt 4,4%. Insbesondere für UPDpat Patienten wurde ein Lebenszeitrisiko von 17,6% errechnet. Dieser Wert beträgt für Patienten mit IC2-LOM 1,6% (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2: Molekulare subgruppenabhängige Kategorisierung von BWSp Patienten, die in den 17 teilnehmenden Laboren identifiziert wurden. (*Daten aus dem DKKR (siehe Materialien und Methoden für Details))

Molekulare Diagnose	N	Krebsfälle*		PJ	SIR (95% KI)	Krebsrisiko bis zum 15. Lebensjahr (%)
		Beobachtet	Erwartet			
Summe	321	13	0,3991	2306,6	32,6 (17,3-55,7)	4,4
IC2-LOM	208	3	0,2639	1515,9	11,4 (2,3-33,2)	1,6
UPDpat	64	10	0,0656	361,4	152,5 (73,1-280,5)	17,6
IC1-GOM	31	0	0,0449	268,9	0,0 (0,0-82,2)	0,0
Dup/Del	12	0	0,0168	106,7	0,0 (0,0-219,9)	0,0
<i>CDKN1C</i>	6	0	0,0079	53,6	0,0 (0,0-465,7)	0,0

Im Hinblick auf die unterschiedlichen Tumorentitäten handelt es sich bei sechs von 13 Krebsfällen um Hepatoblastome. Das Hepatoblastom ist somit der häufigste Tumor unter allen Krebsfällen, die in der BWSp Kohorte aufgetreten sind. Bei vier von 13 Krebsfällen handelt es sich um ein Nephroblastom. Weiterhin traten ein Astrozytom, ein Neuroblastom und Ganglioneuroblastom sowie ein adrenokortikales Karzinom (ACC) auf (siehe Tabelle 1).

Die SIRs ausgewählter Krebsarten bei Personen mit BWSp je nach Krebsart sind in Tabelle 3 aufgeführt. Hohe SIRs wurden für Hepatoblastome (SIR = 703,1, 95% KI = 258,0-1530,3), Nephroblastome (SIR = 134,8, 95% KI = 36,7-345,1) und ACC (SIR = 1772,4, 95% KI = 44,9-9875,0) berechnet.

Tabelle 3: Standardisierte Inzidenzraten für bestimmte Krebsarten bei Patienten mit BWSp mit UPDpat und IC2-LOM

^a Daten aus dem DKKR (siehe Material und Methoden für Details)

^b Der Patient hatte sowohl ein Neuroblastom als auch ein Ganglioneuroblastom

			Krebsfälle ^a			
Molekulare Diagnose	Krebsentität	N	Beobachtet	Erwartet	PJ	SIR (95% KI)
UPDpat	Hepatoblastom	64	5	0,0016	361,4	3128,7 (1015,9-7301,2)
	Nephroblastom		3	0,0052	361,4	575,05 (118,6-1680,5)
	Neuroblastom ^b		1	0,0077	361,4	129,0 (3,3-719,0)
	ACC		1	0,0001	361,4	10639,9 (269,4-59281,7)
IC2-LOM	Astrozytom	208	1	0,0254	1515,9	39,3 (1,0-219,7)
	Hepatoblastom		1	0,0057	1515,9	174,1 (4,4-970,1)
	Nephroblastom		1	0,0194	1515,9	51,5 (1,3-287,0)

Um die selektionsbedingten Verzerrungen zu reduzieren, wurde eine Sensitivitätsanalyse durchgeführt. Bei diesen Patienten kann die positive Krebsanamnese molekulargenetische Tests auf das BWSp veranlasst haben. Neun Fälle wurden ausgeschlossen, in denen die Tumordiagnose vor der molekularen BWSp Diagnose gestellt wurde (ausgeschlossene Fälle sind in Tabelle 1 markiert). Nach Ausschluss dieser Fälle wurde ein insgesamt 12-fach erhöhtes Krebsrisiko (SIR = 12,3, 95% KI = 3,4-31,5) für alle BWSp Patienten berechnet.

d) Diskussion

Das Hauptziel dieser Arbeit ist es, auf das mit dem BWSp assoziierte hohe Krebsrisiko aufmerksam zu machen. Diese Studie präsentiert einen neuen Einblick in die Krebsrisikoverteilung der BWSp-assoziierten molekularen Subtypen. Wichtig zu erwähnen ist, dass es sich bei dieser Arbeit unseres Wissens um die erste populationsbasierte Studie bezüglich der Krebsrisiken bei BWSp Patienten handelt. Dieser Ansatz hat den Vorteil, dass er weniger anfällig für Verzerrungen ist und die Berechnung von SIRs ermöglicht.

Wir beobachten im Vergleich zur altersentsprechenden Gesamtbevölkerung ein signifikant erhöhtes Risiko für Krebserkrankungen im Kindes- und Jugendalter in der BWSp Kohorte. Das 32-fach erhöhte Gesamtkrebsrisiko war in erster Linie auf die signifikante Anzahl von Hepatoblastomen und Nephroblastomen zurückzuführen. Bemerkenswert war, dass wir zudem seltene Krebsarten wie ein Astrozytom und ein Ganglioneuroblastom beobachteten. In der Literatur fanden wir einen früheren Fall eines Ganglioneuroblastoms und einen weiteren Fall eines Gehirnglioms. [18]

Im Gegensatz zu bisher publizierten Studien haben wir molekular bestätigte Fälle von BWSp bevölkerungsbasiert gesammelt und haben die relativen Krebsrisiken im Vergleich zu bevölkerungsbezogenen Inzidenzraten berechnet, um die Krebsrisiken mit einer weniger verzerrten Methode zu analysieren. [10, 11, 13, 17]

Die Region des Chromosoms 11p15.5, die bei Individuen mit BWSp verändert ist, beherbergt mehrere geprägte Gene, einschließlich *CDKN1C*, *IGF2* und *H19*, welche als Wachstumsregulatoren klassifiziert werden. Daher ist das beobachtete hohe Krebsrisiko bei Personen mit BWSp, die eine konstitutionelle oder mosaikartige Läsion in der Region 11p15.5 tragen, biologisch plausibel.

Wir stellten große Unterschiede hinsichtlich der Krebsinzidenz in Abhängigkeit von den verschiedenen molekularen Subtypen des BWSp fest. Dieses Erkenntnis steht im Einklang mit früheren Studien.[4, 10-12, 17] Besonderes Augenmerk wird auf das hohe Krebsrisiko der UPDpat Patienten gelegt. Überraschenderweise haben wir in der IC1-GOM Gruppe keine Krebsfälle beobachtet, allerdings ist dieses Ergebnis nicht signifikant. Obwohl einige molekulare Untergruppen ein geringeres Krebsrisiko haben, sollten sich Eltern, die eine Krebsfrüherkennung ablehnen, darüber bewusst sein, dass das absolute Krebsrisiko in diesen Gruppen im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung immer noch erhöht ist.

Da die Informationsquelle unserer Arbeit ein Kinderkrebsregister war, konnten Krebserkrankungen bei Patienten im Alter von über 14 Jahren nicht festgestellt werden. Dies ist neben dem Ausschluss von BWSp Patienten, die noch nie einer genetischen Untersuchung unterzogen wurden bzw. BWSp Patienten die klinisch ohne molekulare Bestätigung diagnostiziert wurden, die wichtigste Limitation dieser Arbeit. Weiterhin ist es wahrscheinlich, dass die BWSp Diagnose in einigen Fällen durch die Entstehung eines Malignoms im Kindesalter veranlasst wurde. Bemerkenswert ist, dass bei 9 Patienten der Krebs vor der molekularen BWSp Bestätigung diagnostiziert wurde (siehe Tabelle 1). Da dies möglicherweise zu einer Verzerrung der Ergebnisse führen könnte, wurden diese 9 Fälle aus der Analyse ausgeschlossen. Dennoch bleibt das verbleibende Krebsrisiko für alle Krebsarten unter allen BWSp Patienten weiterhin signifikant erhöht (SIR = 12,3, 95% KI =3,35-31,47).

4. Schlussfolgerungen/Zusammenfassung

Diese Studie dient der Aufklärung des Krebsrisikos bei Kindern mit einem BWSp und hebt die Wichtigkeit der Bedeutung qualitativer Gentests hervor.

Zusammenfassend lassen sich folgende Schlussfolgerungen anführen:

1. Die Krebsinzidenzrate bei Patienten mit BWSp ist gegenüber der altersentsprechenden Gesamtbevölkerung 32-fach erhöht.
2. Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass bei Kindern mit BWSp das höchste Krebsrisiko mit der genetischen Subgruppe UPDpat verbunden ist, während das Risiko bei IC1-GOM Patienten weitere Untersuchungen erfordert.
3. IC2-LOM Patienten haben, übereinstimmend zu vorherigen Studien, ein Tumorrisiko unter 2%.
4. Weiterhin stimmen unsere Ergebnisse mit den aktuellen Früherkennungsempfehlungen überein. [4]

Die Erkenntnisse dieser Arbeit können als Grundlage für weitere Forschungsarbeiten bezüglich des mit dem BWSp-assoziierten Krebsrisikos dienen.

5. Literaturverzeichnis

1. Brodeur, G.M., et al., *Pediatric Cancer Predisposition and Surveillance: An Overview, and a Tribute to Alfred G. Knudson Jr.* Clin Cancer Res, 2017. **23**(11): p. e1-e5.
2. Zhang, J., K.E. Nichols, and J.R. Downing, *Germline Mutations in Predisposition Genes in Pediatric Cancer.* N Engl J Med, 2016. **374**(14): p. 1391.
3. Mussa, A., et al., *Prevalence of Beckwith-Wiedemann syndrome in North West of Italy.* Am J Med Genet A, 2013. **161A**(10): p. 2481-6.
4. Brioude, F., et al., *Expert consensus document: Clinical and molecular diagnosis, screening and management of Beckwith-Wiedemann syndrome: an international consensus statement.* Nat Rev Endocrinol, 2018. **14**(4): p. 229-249.
5. Eggermann, T., et al., *Imprinting disorders: a group of congenital disorders with overlapping patterns of molecular changes affecting imprinted loci.* Clin Epigenetics, 2015. **7**: p. 123.
6. Livingstone, C., *IGF2 and cancer.* Endocr Relat Cancer, 2013. **20**(6): p. R321-39.
7. Suntharalingham, J.P., et al., *Analysis of CDKN1C in fetal growth restriction and pregnancy loss.* F1000Res, 2019. **8**: p. 90.
8. Shuman, C., J.B. Beckwith, and R. Weksberg, *Beckwith-Wiedemann Syndrome*, in *GeneReviews((R))*, M.P. Adam, et al., Editors. 1993: Seattle (WA).
9. Eggermann, T., et al., *Clinical utility gene card for: Beckwith-Wiedemann Syndrome.* Eur J Hum Genet, 2014. **22**(3).
10. Maas, S.M., et al., *Phenotype, cancer risk, and surveillance in Beckwith-Wiedemann syndrome depending on molecular genetic subgroups.* Am J Med Genet A, 2016. **170**(9): p. 2248-60.
11. Brioude, F., et al., *Beckwith-Wiedemann syndrome: growth pattern and tumor risk according to molecular mechanism, and guidelines for tumor surveillance.* Horm Res Paediatr, 2013. **80**(6): p. 457-65.
12. Mussa, A., et al., *Cancer Risk in Beckwith-Wiedemann Syndrome: A Systematic Review and Meta-Analysis Outlining a Novel (Epi)Genotype Specific Histotype Targeted Screening Protocol.* J Pediatr, 2016. **176**: p. 142-149 e1.
13. Duffy, K.A., et al., *Characterization of the Beckwith-Wiedemann spectrum: Diagnosis and management.* Am J Med Genet C Semin Med Genet, 2019. **181**(4): p. 693-708.
14. Moelans, C.B., et al., *Methylation-Specific Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MS-MLPA).* Methods Mol Biol, 2018. **1708**: p. 537-549.
15. Kaatsch, P., *[German Childhood Cancer Registry and its favorable setting].* Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz, 2004. **47**(5): p. 437-43.

16. Erdmann F, K.P., Grabow D, Spix C, *German Childhood Cancer Registry - Annual Report 2019 (1980-2018)*. Institute of Medical Biostatistics, Epidemiology and Informatics (IMBEI) at the University Medical Center of the Johannes Gutenberg University Mainz. 2020.
17. Cooper, W.N., et al., *Molecular subtypes and phenotypic expression of Beckwith-Wiedemann syndrome*. Eur J Hum Genet, 2005. **13**(9): p. 1025-32.
18. Brioude, F., et al., *Mutations of the Imprinted CDKN1C Gene as a Cause of the Overgrowth Beckwith-Wiedemann Syndrome: Clinical Spectrum and Functional Characterization*. Hum Mutat, 2015. **36**(9): p. 894-902.

6. Abkürzungsverzeichnis

ACC	Adrenokortikales Karzinom
BWS	Beckwith-Wiedemann Syndrom
BWSp	Beckwith-Wiedemann Spektrum
CDKN1C	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1C
Del	Deletion
DKKR	Deutsches Kinderkrebsregister
DMR	Differenziell methylierte Region
Dup	Duplikation
IC	Imprinting Center
IC1	Imprinting Center 1
IC2	Imprinting Center 2
IC1-GOM	Imprinting Center 1-Gain of Methylation
IC2-LOM	Imprinting Center 2- Loss of Methylation
IG	Intergenic
KI	Konfidenzintervall
KPS	Krebsprädispositionssyndrom
M	Männlich
PJ	Personenjahre
SIR	Standardisierte Inzidenzratio
TSS	Transcriptional start site
UPDpat	Paternale Uniparentale Disomie 11p15.5
W	Weiblich

8. Danksagung

Eine wissenschaftliche Arbeit ist nie das Werk einer einzelnen Person. Deshalb möchte ich mich an dieser Stelle bei allen Menschen bedanken, die mir die Erstellung meiner Dissertation ermöglicht haben. Mein Dank gilt zunächst Herrn Prof. Dr. med. Christian P. Kratz, meinem Doktorvater, für die Ideengebung sowie die großartige Unterstützung über den gesamten Zeitraum. Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. med. Thomas Eggermann sowie Herrn Prof. Dr. med. Martin Zenker für die tolle Mitbetreuung sowie spannenden Diskussionen. Ein spezieller Dank gilt Frau PD Dr. Claudia Spix und Frau Melanie Kaiser für die Durchführung des Abgleichs und die statistischen Berechnungen. Auch danke ich recht herzlich allen Laborleiterinnen und –leitern, die uns ihre besonderen Fälle zur Verfügung gestellt haben.

Danken möchte ich außerdem meinen Kollegen, Freunden und Familienangehörigen, die mich immer wieder motiviert und unterstützt haben. Vor allem gebührt mein Dank meiner Kollegin Christina Dutzmann für die großartige Hilfe bei der Fertigstellung der Arbeit. Besonders danke ich außerdem meinem Verlobten Süleyman Erdinc für die uneingeschränkte Unterstützung und die Liebe, die mir eine riesige Hilfe bei der Anfertigung dieser Arbeit war.

Mein ganz besonderer Dank gilt vor allem meinen Eltern Adnan Cöktü und Dilek Cöktü sowie meiner Schwester Senanur Cöktü, denen ich diese Doktorarbeit widme. Diese wunderbaren Menschen haben mir mit ihrer Liebe und Energie stets den Rücken gestärkt, mich auf allen möglichen Arten und Weisen unterstützt und mir diesen Lebensweg ermöglicht. Dafür kann ich gar nicht genug danken.

9. Erklärung nach § 2 Abs. 2 Nr. 7 +8

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Hochschule Hannover zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel „**Krebsinzidenz und -spektrum bei Kindern mit genetisch nachgewiesenem Beckwith-Wiedemann-Spektrum in Deutschland: eine retrospektive Kohortenstudie**“ in der Klinik für Pädiatrische Hämatologie und Onkologie der Medizinischen Hochschule Hannover unter der Betreuung von Prof. Dr. med. Christian P. Kratz mit der Unterstützung durch Prof. Dr. rer. nat. Thomas Eggermann und Prof. Dr. med. Martin Zenker ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Die Gelegenheit zum vorliegenden Promotionsverfahren ist mir nicht kommerziell vermittelt worden. Insbesondere habe ich keine Organisation eingeschaltet, die gegen Entgelt Betreuerinnen und Betreuer für die Anfertigung von Dissertationen sucht oder die mir obliegenden Pflichten hinsichtlich der Prüfungsleistungen für mich ganz oder teilweise erledigt.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Weiterhin versichere ich, dass ich den beantragten Titel bisher noch nicht erworben habe.

Ergebnisse der Dissertation wurden in folgendem Publikationsorgan veröffentlicht:

Cöktü S, Spix C, Kaiser M, et al. Cancer incidence and spectrum among children with genetically confirmed Beckwith-Wiedemann spectrum in Germany: a retrospective cohort study [published online ahead of print, 2020 May 26]. Br J Cancer. 2020;10.1038/s41416-020-0911-x. doi:10.1038/s41416-020-0911-x

Hannover, den

Sümeyye Erdinc