

Aus der Kinderchirurgischen Klinik und Poliklinik  
im Dr. von Haunerschen Kinderspital  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Professor Dr. med. Dietrich von Schweinitz

## **Epigenetische Veränderungen des Wnt- und IGF-Signalweges im Hepatoblastom**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

**Ivonne Gruner**

aus

**Magdeburg**

**2010**

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Priv. - Doz. Dr. rer. nat. Roland Kappler

Mitberichterstatter: Priv. - Doz. Dr. Ursula Zimmer-Strobl  
Priv. - Doz. Dr. Julia Seiderer-Nack

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: .....

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 20.05.2010

---

## Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1.	Epigenetik	2
1.1.1.	Histonmodifizierung	2
1.1.2.	Genomische Prägung	3
1.1.3.	DNA-Methylierung	5
1.2.	Das Hepatoblastom	7
1.3.	Wnt-Signalweg	8
1.4.	IGF-Signalweg	10
<b>2.</b>	<b>Zielstellung der Arbeit</b>	<b>12</b>
<b>3.</b>	<b>Material</b>	<b>13</b>
3.1.	Chemikalien, Reagenzien, Puffer	13
3.2.	Größen- und Massenstandard	14
3.3.	Antibiotika	14
3.4.	Zelllinien	14
3.4.1.	Prokaryotische Zelllinien	14
3.4.2.	Eukaryotische Zelllinien	14
3.5.	Kulturmedien	15
3.5.1.	Prokaryotische Kulturmedien	15
3.5.2.	Eukaryotische Kulturmedien	15
3.6.	Primer	15
3.6.1.	Primer für methylspezifische PCR (MSP)	15
3.6.2.	Primer für die Bestimmung des LOI/LOH Status	15
3.6.3.	Expressionsprimer	16
3.6.4.	Primer zur Analyse des $\beta$ -Catenin Mutationsstatus	16
3.7.	Enzyme	16
3.7.1.	Restriktionsenzyme	16
3.8.	Plasmide	17
3.9.	Kits	17
3.10.	Verbrauchsmaterialien	17
3.11.	Geräte	17

---

<b>4.</b>	<b>Methoden</b>	19
4.1.	DNA-Isolierung	19
4.1.1.	Phenol-Chloroform Extraktion	19
4.1.2.	Flexi-Gene DNA Kit	19
4.2.	Aufreinigung von DNA	20
4.2.1.	Ethanol-fällung	20
4.2.2.	Gelextraktion	20
4.3.	Quantifizierung von Nukleinsäuren	20
4.3.1.	Photometrische Bestimmung	20
4.3.2.	Gelelektrophoretische Bestimmung	20
4.4.	DNA-Gelelektrophorese	21
4.5.	Bisulfitbehandlung	21
4.6.	RNA-Isolierung	21
4.7.	Dnase-Verdau und RNA Aufreinigung	22
4.8.	cDNA-Synthese	22
4.9.	Polymerasekettenreaktion (PCR)	22
4.9.1.	Methylspezifische PCR (MSP)	23
4.9.2.	Quantitative realtime PCR (Q-PCR)	24
4.10.	LOI/LOH Status	25
4.11.	$\beta$ -Catenin Mutationsanalyse	25
4.12.	Klonierung von Plasmid-DNA	26
4.12.1.	Chemische Transformation	26
4.12.2.	Minipräparation von Plasmid-DNA	26
4.12.3.	Midipräparation von Plasmid-DNA	27
4.13.	Restriktion	27
4.14.	Zellkultur	27
4.14.1.	Kultivierung von Zelllinien	27
4.14.2.	5-Aza/TSA Behandlung von Zelllinien	28
4.14.3.	Einfrieren und Auftauen von Zelllinien	28
4.14.4.	Transfektion	28
4.14.4.1.	Lipofektion	28
4.14.4.2.	Selektion stabil transfizierter Zellklone	29
4.14.5.	MTT-Assay	29
4.14.6.	Colony Formation Assay	29
4.14.7.	TOP/FOP-Flash-Promoter Assay	30

---

<b>5.</b>	<b>Ergebnisse</b>	31
5.1.	Wnt-Signalweg	31
5.1.1.	Methylspezifische PCR	31
5.1.2.	Expression der MSP-Kandidatengene	33
5.1.2.1.	Expression in den Zelllinien	36
5.1.3.	Behandlung der Zelllinien mit Demethylierungsagenzien	37
5.1.3.1.	Expression der Kandidatengene nach Aza/TSA-Behandlung	39
5.1.3.2.	Vitalitätstest nach Aza/TSA-Behandlung	41
5.1.4.	Überexpression des Inhibitors SFRP1	41
5.1.4.1.	Vitalitätsmessung nach transienter Transfektion	42
5.1.4.2.	Expression von <i>SFRP1</i> in stabil transfizierten Zellen	43
5.1.4.3.	Untersuchung der Zellproliferation	43
5.1.5.	Untersuchung der Aktivität des Signalweges	44
5.1.5.1.	Expression der Zielgene	45
5.1.5.2.	Aktivitätsbestimmung mit dem TOP/FOP-Flash-Promoter Assay	45
5.1.6.	$\beta$ -Catenin Mutationsstatus	46
5.2.	IGF-Signalweg	48
5.2.1.	Methylspezifische PCR	48
5.2.2.	IGF2/H19 Lokus	49
5.2.3.	Expression verschiedener Gene aus dem IGF-Signalweg	50
5.2.3.1.	Expression in den Zelllinien	52
5.2.4.	Behandlung der Zelllinien mit Demethylierungsagenzien	53
5.2.4.1.	Expression der Kandidatengene nach Aza/TSA-Behandlung	54
5.2.5.	Überexpression von <i>IGFBP3</i>	56
5.2.5.1.	Vitalitätsmessung nach transienter Transfektion	56
5.2.5.2.	Expression von <i>IGFBP3</i> in stabil transfizierten Zellen	57
5.2.5.3.	Untersuchung der Zellproliferation	58
<b>6.</b>	<b>Diskussion</b>	59
6.1.	Wnt-Signalweg	59
6.2.	IGF-Signalweg	66
6.3.	Ausblick - epigenetische Therapeutika und Biomarker	70
<b>7.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	73
<b>8.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	75

<b>9.</b>	<b>Anhang</b>	84
<b>10.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	85
<b>11.</b>	<b>Publikationen &amp; Tagungsbeiträge</b>	87
11.1.	Publikationen	87
11.2.	Tagungsbeiträge	88
<b>12.</b>	<b>Lebenslauf</b>	89
<b>13.</b>	<b>Danksagung</b>	90

## 1. Einleitung

Krebs ist eine der häufigsten Erkrankungen des Menschen. Die Entstehung eines Tumors ist genetisch bedingt und auf eine Anreicherung von verschiedenen DNA-Mutationen im Laufe des Lebens zurückzuführen. Durch Modifikationen im Erbgut des Organismus wird die gespeicherte Information verändert und bei der Zellteilung auf die nächste Zellgeneration weitergegeben. Mutationen können dabei eine Aktivierung von Proto-Onkogenen und Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen bewirken. Beide Ereignisse fördern die Zellteilung und das Zellwachstum. Ebenfalls tragen chromosomale Instabilitäten dazu bei, dass sich normale Körperzellen wieder teilen und ein Tumor entsteht (Hahn and Weinberg, 2002). Bekannte Beispiele für Proto-Onkogene sind *MYC* (Land et al., 1983) und *PLAG1* (Van Dyck et al., 2007) und für Tumorsuppressorgene *TP53* (Wang and Harris, 1996) und *APC* (Levy et al., 1994). Der menschliche Körper besitzt jedoch Schutzsysteme, wie z.B. die DNA-Reparatur oder den programmierten Zelltod (Apoptose), um die Entstehung von Tumorzellen zu verhindern. Doch häufig sind diese Systeme ebenfalls durch genetische Veränderungen in ihrer Funktion eingeschränkt (Vogelstein and Kinzler, 2004).

Während der embryonalen Entwicklung sind Zellteilung, Apoptose und Differenzierung reguläre Prozesse, die für das Wachstum und die Ausbildung der Organe im menschlichen Körper verantwortlich sind. Die Entstehung von Tumoren im Kindesalter (0-15 Jahre) ist im Gegensatz zu den adulten Tumoren auf Fehler in der Differenzierung der embryonalen Zellen zurückzuführen. Beteiligte Signalwege sind zum Beispiel der Wnt- und IGF-Signalweg. Kommt es zu Defekten in der Regulation dieser Signalwege, kann sich aus den embryonalen Zellen durch fehlende Differenzierung und fortwährende Zellteilung ein Tumor entwickeln (Scotting et al., 2005).

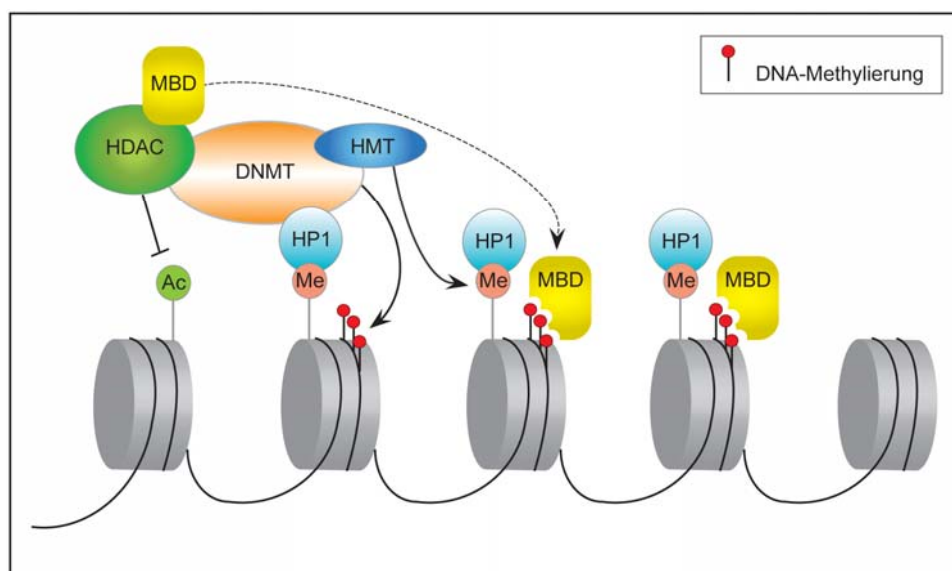
Neuste Erkenntnisse zeigen, dass in der Tumorgenese nicht nur genetische sondern auch epigenetische Modifikationen eine wichtige Rolle spielen (Jones and Baylin, 2007). Dazu gehören spezifische DNA-Methylierungsmuster und Histonmodifikationen, die bei der Regulation der Genexpression einen entscheidenden Faktor darstellen. Die Weitergabe der epigenetischen Eigenschaften an die Tochterzelle erfolgt im Gegensatz zur genetischen Vererbung unabhängig von der DNA-Sequenz. Bei der Entstehung von Krebs konnten bereits epigenetische Modifikationen bei Proto-Onkogenen, Tumorsuppressorgenen und Komponenten von Signalwegen nachgewiesen werden (Esteller et al., 2001).

## 1.1. Epigenetik

Derzeit versteht man unter Epigenetik die Regulation der Genexpression bei Entwicklungs- und Differenzierungsprozessen ohne eine Veränderung in der DNA Sequenz (Reik, 2007). Zur Epigenetik gehört daher die Histonmodifizierung, die genomische Prägung (*genomic imprinting*) und die DNA-Methylierung. In normalen Zellen spielen diese Mechanismen eine bedeutende Rolle bei der Stilllegung chromosomaler Bereiche, welche keine transkriptionelle Aktivität besitzen. Man findet dies bei der Inaktivierung des zweiten X-Chromosoms im weiblichen Organismus (Scarano et al., 2005), bei repetitiven Sequenzen des Heterochromatins (Herman and Baylin, 2003) und bei genetisch geprägten Genen (*imprinting genes*) (Edwards and Ferguson-Smith, 2007). Bei Tumorzellen gibt es hingegen oftmals Veränderungen in der Histonmodifizierung und bei den DNA-Methylierungsmustern, so dass z.B. Tumorsuppressorgene epigenetisch stillgelegt werden und veränderte Expressionsmuster in den Tumorzellen vorliegen.

### 1.1.1. Histonmodifizierung

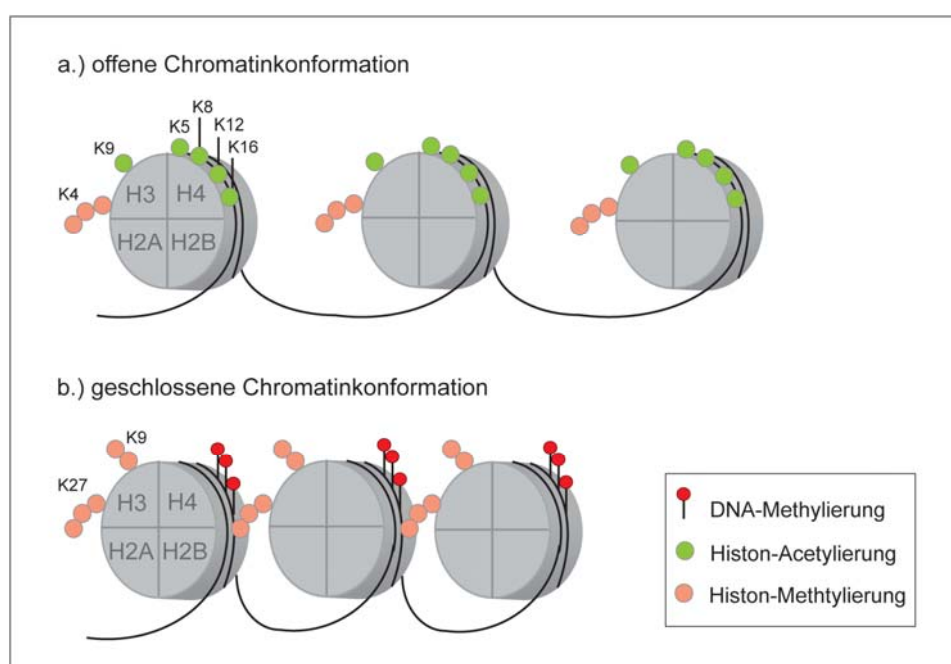
Das Chromatin weist posttranslationale Histonmodifizierungen auf, welche die Anordnung der Nukleosomen und die Ausbildung höherer DNA-Komplexe, wie DNA-Schleifen bedingen. Histonmodifikationen sind neben der Methylierung von Cytosinen ein wichtiger Bestandteil des Epigenoms (Feinberg, 2004).



**Bild 1:** Abbildung modifiziert nach (Feinberg and Tycko, 2004). Der Multiproteinkomplex reprimiert die Transkription über DNA-Methylierung (Me) durch DNA-Methyltransferasen (DNMT) und über Methylierung spezifischer Lysinreste der Histone durch Histonmethyltransferasen (HMT). Heterochromatin Protein 1 (HP1) vermittelt die Bindung von DNMT und HMT. Weiterhin erfolgt die Rekrutierung der Histondeacetylase (HDAC) und Methyl-C Bindeproteinen (MBD).



Die Stilllegung von Genen oder Chromosomenbereichen wird über einen Multiproteinkomplex reguliert, bestehend aus Histondeacetylasen, Histonmethyltransferasen, DNA Methyltransferasen und verschiedenen Bindeproteinen (Bild 1). Für eine transkriptionelle Aktivierung oder Repression chromosomaler Abschnitte ist ein spezifisches Methylierungs- und Acetylierungsmuster der Histone H3 und H4 (Bild 2) entscheidend. Es wurde beschrieben, dass bei der Methylierung von Lysin 4 (K4) des Histons H3 eine offene Chromatinkonformation vorliegt, wodurch die DNA zugänglich für Transkriptionsfaktoren ist (Bild 2a). Bei der Methylierung von Lysin 9 (K9) des Histons H3 zeigt die DNA eine geschlossene Chromatinkonformation, was eine Repression der Transkription zur Folge hat (Bild 2b) (Jones and Baylin, 2002).



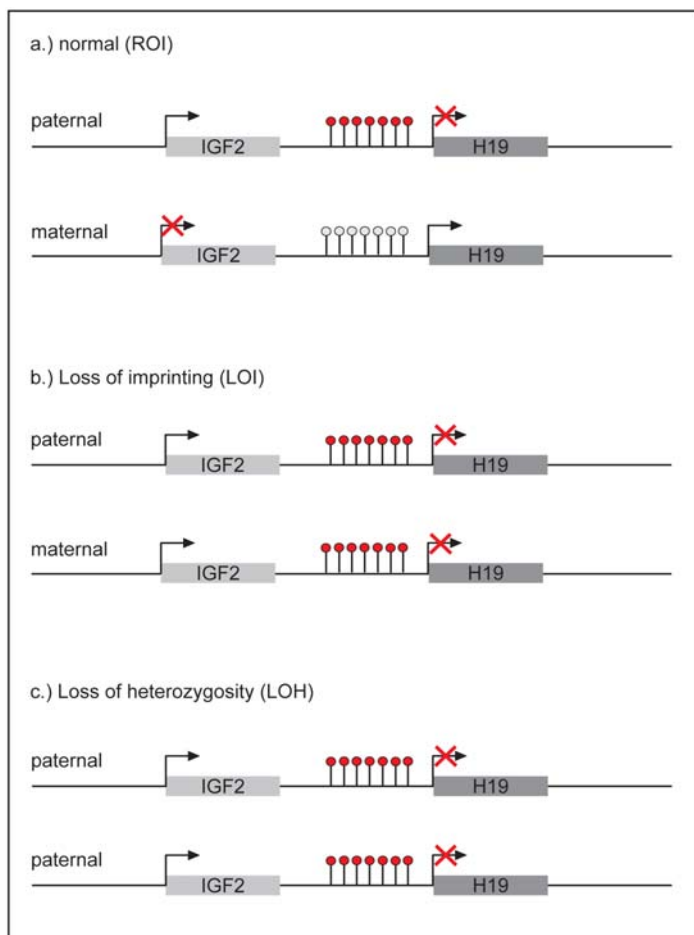
**Bild 2:** Abbildung modifiziert nach (Esteller, 2007). Das spezifische Methylierungs- und Acetylierungsmuster der Histone H3 und H4 bedingt eine offene (a) oder eine geschlossene Chromatinkonformation (b). DNA-Bereiche können durch die Methylierung der Lysinreste K9 und K27 in Histon H3 und durch die Methylierung von CpG Dinukleotiden transkriptionell reprimiert werden.

### 1.1.2. Genomische Prägung

Bei der genomischen Prägung kommt es durch die Methylierung eines Allels zur Stilllegung desselben und somit zu einer monoallelischen Expression des Gens. Dieser Mechanismus konnte z.B. für den *IGF2/H19* Locus in der chromosomalen Region 11p15 nachgewiesen werden (Rainier et al., 1993). Hierbei wird das Gen *H19* im normalen Gewebe nur auf dem maternalen Allel und *IGF2* (insulin-like growth factor 2) nur auf dem paternalen Allel exprimiert (Bild 3a). In verschiedenen Tumoren, wie dem Nephroblastom (Wilms Tumor)

oder dem Hepatoblastom liegen häufig epigenetische Veränderungen im *IGF2/H19* Lokus vor (Rainier et al., 1993), (Rainier et al., 1995), (Albrecht et al., 1994). Beim LOI (*loss of imprinting*) kommt es zu einer fehlerhaften Methylierung des *H19* Promoters (Bild 3b) und beim LOH (*loss of heterozygosity*) zu einem Verlust des maternalen Allels (Bild 3c). LOI und LOH haben eine erhöhte *IGF2* Expression zur Folge (Ravenel et al., 2001), (Morison and Reeve, 1998).

Beim Beckwith-Wiedemann Syndrom (BWS) liegt ebenfalls eine erhöhte *IGF2* Expression in Folge eines LOH oder LOI der Region 11p15 vor. Dabei zeigen BWS Patienten eine erhöhte Inzidenz für Nephroblastome und Hepatoblastome (Morison and Reeve, 1998). Der Status des *IGF2/H19* Lokus scheint somit eine entscheidende Rolle bei der Entstehung embryonaler Tumoren zu spielen.

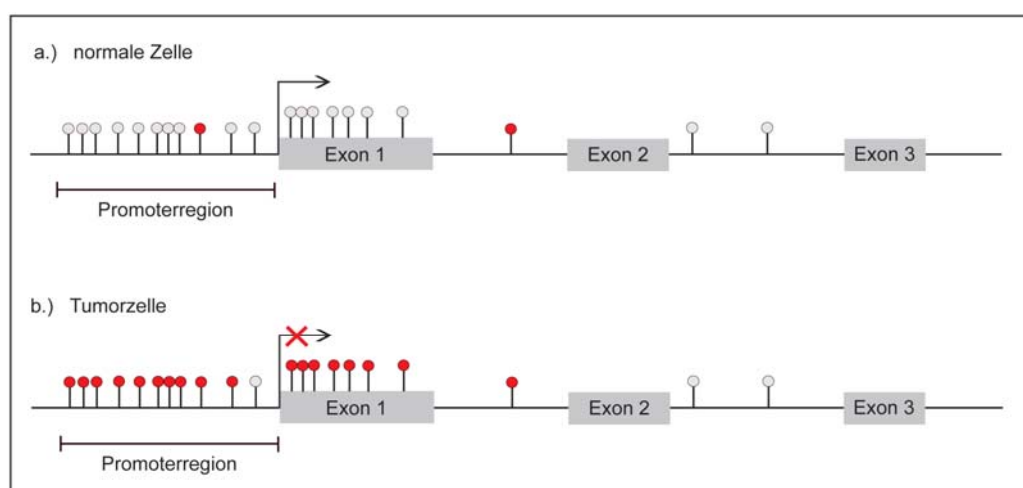


**Bild 3:** (a) ROI (*retention of imprinting*) bezeichnet den Status des *IGF2/H19* Lokus im normalen Gewebe. Es erfolgt eine reziproke Expression des *IGF2* und *H19* Gens. Erkennbar ist eine Methylierung des *H19* Promoters und die Expression von *IGF2* auf dem paternalen Allel. Auf dem maternalen Allel reprimiert die Expression von *H19* die Transkription von *IGF2*. (b) LOI (*loss of imprinting*) beschreibt den Verlust der genetischen Prägung durch eine fehlerhafte Methylierung des *H19* Promoters. Es erfolgt eine zusätzliche *IGF2* Expression vom maternalen Allel. (c) LOH (*loss of heterozygosity*) bezeichnet den Verlust des maternalen Allels. Bei diesem Status liegt ebenfalls eine erhöhte *IGF2* Expression vor. Methylierte CpG Dinuklotide sind gekennzeichnet durch rote Kreise, unmethylierte CpG Dinukleotide durch graue Kreise.

### 1.1.3. DNA-Methylierung

Im humanen Genom findet die DNA-Methylierung an Cytosinen statt, die in einem CpG Dinukleotid liegen. Ungefähr 80 % aller CpGs im Genom sind methyliert. Im Gegensatz dazu sind CpG Dinukleotide, die innerhalb von sogenannten CpG Inseln liegen, in normalen Zellen unmethyliert (Bild 4) (Herman and Baylin, 2003). CpG Inseln definieren sich durch einen hohen Anteil von CpG Dinukleotiden und befinden sich im Promoterbereich von ungefähr der Hälfte aller Gene im Genom. Sie zeigen einen GC Gehalt von über 65 %, während das Dinukleotid in einem Großteil der DNA um 20 % gegenüber seiner erwarteten Verteilung unterrepräsentiert ist (Antequera, 2003), (Bird, 1986).

Tumorzellen besitzen gegenüber normalen Zellen häufig eine fehlerhafte Methylierung der CpG Inseln im Promoterbereich von Tumorsuppressorgenen, was zu einer Stilllegung der Transkription führen kann (Bild 4). Die Methylierung der CpG Inseln ist neben genetischen Mutationen ein weiterer Mechanismus für die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen.



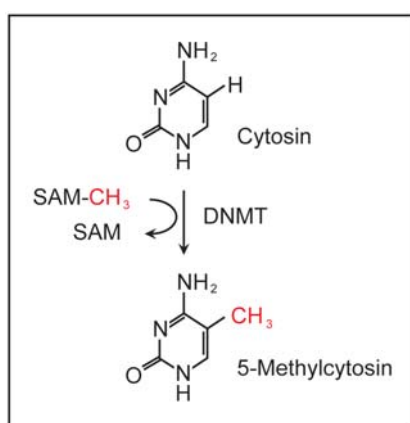
**Bild 4:** (a) Die CpG Inseln im Promoterbereich einer normalen Zelle liegen unmethyliert vor (graue Kreise). Das Gen wird transkribiert. (b) In einer entarteten Zelle kommt es zu einer fehlerhaften Methylierung der CpGs (rote Kreise). Die Transkription des Gens ist reprimiert.

Nach Knudson ist der vollständige Funktionsverlust des Tumorsuppressorgenes erreicht, wenn beide Allele des Gens nicht mehr transkribiert werden. Mit seiner „Two-Hit“ Hypothese beschreibt er die Theorie, dass bei sporadisch auftretenden Tumoren zunächst eine somatische Mutation oder eine Hypermethylierung des einen Allels stattfindet. Als zweiter Defekt treten häufig Chromosomenverluste auf (Knudson, 2001), (Herman and Baylin, 2003). Bei familiären Krankheitssyndromen wie z.B. der Familiären Adenomatösen Polyposis (FAP) findet man bei 90 % der FAP Patienten eine Keimbahnmutation im APC (adenomatosis polyposis coli) Gen (Esteller et al., 2000). Durch die Hypermethylierung des APC Promoters

kann es zu einer weiteren Inaktivierung des *APC* Gens kommen (Esteller et al., 2000), (Nomoto et al., 2007). Patienten mit familiären Krankheitssyndromen tragen daher ein erhöhtes Risiko Tumore zu entwickeln.

Für weitere Gene, wie z.B. *RB1* (retinoblastoma 1), *CDKN2A* (cyclin-dependent kinase 2A) und *MGMT* (O-6-methylguanine-DNA-methyltransferase) konnte ebenfalls eine Methylierung in verschiedenen Tumoren nachgewiesen werden (Greger et al., 1989) (Esteller et al., 2001). Die Identifizierung solcher Kandidatengene ist sehr wichtig für das Verständnis der Tumorentstehung. Interessanterweise werden häufig Gene inaktiviert, die in der Zellzyklusregulation, der Apoptose und der DNA-Reparatur eine wichtige Rolle spielen (Alaminos et al., 2004), (Suzuki et al., 2006), (Wiley et al., 2006), (Yu et al., 2002).

Verantwortlich für die Methylierung der Cytosine in Position 5 des Cytosinrings sind drei verschiedene DNA-Methyltransferasen: DNMT1, DNMT3A und DNMT3B. Als Methylgruppendorator dient S-Adenosyl-L-Methionin (SAM) (Bild 5). Die Regulation der Enzyme erfolgt über große Multiproteinkomplexe (Bild 1), wobei jedoch der genaue Mechanismus für die Initiation der Methylierungsreaktion noch unbekannt ist. Die Methyltransferase DNMT1 besitzt eine 5 – 30 fach höhere Affinität zu hemimethylierter DNA als zu unmethylierter. Sie ist daher verantwortlich für die Aufrechterhaltung des Methylierungsstatus der DNA nach der Replikation (Bestor, 2000). Die beiden anderen Methyltransferasen DNMT3A und DNMT3B übernehmen die *de novo* Methylierung, zum Beispiel der Satelliten-DNA, sowie auch die Inaktivierung des zweiten X-Chromosomes (Bestor, 2000).



**Bild 5:** DNA-Methyltransferasen (DNMT1, DNMT3A und DNMT3B) katalysieren die Bildung von 5-Methylcytosin mit Hilfe des Cofaktors S-Adenosyl-L-Methionin (SAM).

Ein Aufheben der DNA-Methylierung kann durch den Einsatz des Demethylierungsagens 5-Aza-2'-deoxy-cytidin (5-Aza) erreicht werden. 5-Aza interkaliert in Nukleinsäuren und lagert sich mit seiner Cytosin-analogen Ringstruktur in das aktive Zentrum der DNMTs ein. Es

bindet die DNMTs und inhibiert deren Funktion als Methyltransferase (Christman, 2002). Durch eine 5-Aza Behandlung von replizierenden Zellen wird die DNA demethyliert und die Expression methylierter Gene kann wieder reaktiviert werden.

## **1.2. Das Hepatoblastom**

Das Hepatoblastom ist ein embryonaler Lebertumor, der bei Kindern unter 3 Jahren auftritt (Weinberg and Finegold, 1983). In der Zeit von 1980-2007 wurden dem Kinderkrebsregister Deutschland 439 Lebertumore gemeldet (<http://www.kinderkrebsregister.de/>). Damit liegt deren relative Häufigkeit bei 1 % bezogen auf alle Tumorerkrankungen, die bei Kindern unter 15 Jahren auftreten. Mit 78,5 % konnte das Hepatoblastom innerhalb der Lebertumore am häufigsten diagnostiziert werden. Das Durchschnittsalter der erkrankten Kinder lag bei 1 Jahr / 4 Monate und mit einer Verteilung von 1,7:1 waren Jungen häufiger betroffen als Mädchen (Tab. A1-1, Jahresbericht des Kinderkrebsregisters Deutschland 2007).

Die histopathologische Einteilung des Hepatoblastoms erfolgt in fünf verschiedene Subtypen: fetal, embryonal, gemischt (epithelial und mesenchymal), trabekulär und anaplastisch (undifferenziert). Dabei besitzen Patienten mit einem fetalen Subtyp die beste Prognose und Patienten mit einem anaplastischen Subtyp die schlechteste (Meyers, 2007). Die Gruppierung der Tumore in verschiedene Stadien erfolgt nach der Operation des Tumors. Stadium I beinhaltet die vollständige Entfernung des Tumors. Stadium II bezeichnet den Status, bei dem noch mikroskopische Reste des Tumors nach der Entfernung nachweisbar sind, während bei Stadium III noch größere Tumorelemente in der Leber vorhanden sind. Diese drei Stadien werden Standard-Risiko-Patienten (SR) zugeordnet. Hoch-Risiko-Patienten (HR) tragen einen Tumor des Stadiums IV, in dem bereits die Ausbildung von Metastasen erfolgte (Meyers, 2007), (von Schweinitz et al., 1997).

Die Bildung von Hepatoblastomen ist meist sporadisch, doch gibt es auch familiäre Krankheitssyndrome wie FAP und BWS, die eine erhöhte Inzidenz für Hepatoblastome besitzen (Buendia, 2002). Wie bereits erwähnt liegt bei BWS Patienten eine Veränderung in der chromosomalen Region 11p15 vor (1.1.) und FAP Patienten tragen eine somatische Mutation im *APC* Gen (1.1.1.). Es konnte jedoch auch in den sporadischen Fällen ein LOI oder LOH Status des *IGF2/H19* Locus festgestellt werden (Rainier et al., 1995), (Albrecht et al., 1994) und ebenfalls eine biallelische Inaktivierung des *APC* Gens (Oda et al., 1996). Neben dem LOH in der 11p15 Region gibt es im Hepatoblastom weitere Abweichungen bei der Kopienzahl der Chromosomenabschnitte 1q, 8q, 17q und 20. Daneben wurden auch öfter Verluste von 1p nachgewiesen, sowie Trisomien des Chromosoms 2 (Weber et al.,

2000), (Kraus et al., 1996), (Swarts et al., 1996). Eine weitere genetische Modifikation betrifft das *CTNNB1* ( $\beta$ -Catenin) Gen. In einer Studie wurde gezeigt, dass 75 % aller untersuchten Hepatoblastome eine *CTNNB1* Mutation tragen. Dabei waren die Hälfte Punktmutationen im Exon 3 des Gens und für die andere Hälfte konnten Deletionsmutationen im Exon 3 bzw. ein Verlust des gesamten Exon 3 nachgewiesen werden (Koch et al., 1999).

An der Entstehung des Hepatoblastoms sind somit zwei Signalwege maßgeblich beteiligt. APC und  $\beta$ -Catenin sind entscheidende Faktoren des Wnt-Signalweges und eine erhöhte *IGF2* Expression kann zur Aktivierung des IGF-Signalwegs führen.

### **1.3. Wnt-Signalweg**

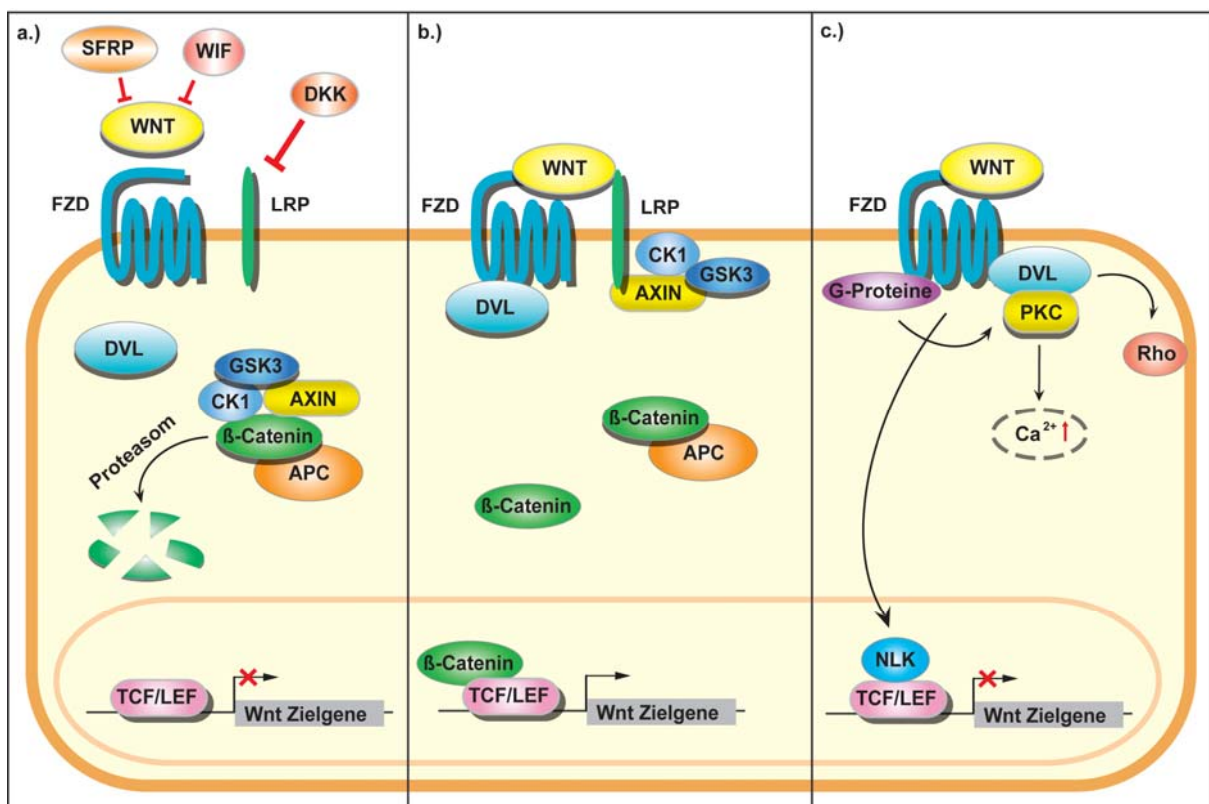
Prozesse wie die Zellproliferation, Differenzierung, Apoptose und Zellmotilität werden vom Wnt-Signalweg gesteuert (Turashvili et al., 2006).

Bisher konnten 19 verschiedene *WNT* (wingless-type) Gene im Menschen identifiziert werden (Wnt-Homepage, <http://www.stanford.edu/~rnusse/wntwindow.html>), welche cysteinreiche Glykoproteine kodieren. Aktiviert wird der Signalweg durch die Bindung von WNT an den 7-Transmembran-Rezeptor FZD (frizzled) und den 1-Transmembran-Rezeptor LRP (low density lipoprotein receptor-related protein) (Bild 6b) (Gregorieff and Clevers, 2005). Man unterscheidet zwischen dem kanonischen Signalweg, dieser ist  $\beta$ -Catenin abhängig und dem nicht-kanonischen, einem  $\beta$ -Catenin unabhängigen Signalweg (Bild 6) (Turashvili et al., 2006).

Bei einem inaktivem Wnt-Signalweg liegt  $\beta$ -Catenin im AXIN (axis inhibition protein) / APC Komplex gebunden vor. Das *APC* Tumorsuppressorgen übernimmt bei der Ausbildung des Komplexes eine wichtige Rolle und interagiert direkt mit  $\beta$ -Catenin. Die beiden Kinasen CK1 (casein kinase 1) und GSK3 (glycogen synthase kinase 3) vervollständigen den Komplex. Sie sind verantwortlich für die Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin und markieren es dadurch für den proteosomalen Abbau (Bild 6a) (Clevers, 2006). Bindet WNT an beide Rezeptoren FZD und LRP, erfolgt die Aktivierung des kanonischen Signalweges. Dabei wird LRP durch die Kinasen GSK3 und CK1 phosphoryliert und aktiviert. AXIN wird aus dem AXIN/APC Komplex an den Rezeptor rekrutiert. Es erfolgt die Aktivierung von DVL (dishevelled protein), welches ebenfalls die Auflösung des AXIN/APC Komplexes vermittelt.  $\beta$ -Catenin reichert sich in der Zelle an, wandert unter Bildung eines nukleären TCF (T cell factor) / LEF (lymphoid enhancer factor) /  $\beta$ -Catenin Komplexes in den Zellkern und aktiviert die Transkription spezifischer Zielgene des Wnt-Signalweges (Bild 6b) (Clevers, 2006), (Willert and Jones, 2006). Der

nicht-kanonische Signalweg wird nur über die Bindung von WNT an FZD gesteuert. Dabei kommt es zu einem Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration, einer Repression der TCF/LEF vermittelten Expression und zu Veränderungen im Zytoskelett der Zelle (Bild 6c) (Veeman et al., 2003).

Inhibitoren des Wnt-Signalweg sind SFRP (secreted frizzled-related protein), WIF (WNT inhibitory factor) und DKK (dickkopf protein). Dabei binden SFRP und WIF direkt an WNT oder bilden eine nicht-funktionelle Bindung mit dem Rezeptor FZD aus. DKK dagegen vermittelt die Inaktivierung des Wnt-Signalweges über die Bindung an LRP (Bild 6a) (Kawano and Kypta, 2003).



**Bild 6:** Abbildung modifiziert nach (Clevers, 2006). (a) Die Inaktivierung des kanonischen Signalweges erfolgt durch die Inhibitoren SFRP (secreted frizzled-related protein), WIF (WNT inhibitory factor) und DKK (dickkopf protein). WNT bindet nicht an seine Rezeptoren FZD (frizzled) und LRP (low density lipoprotein receptor-related protein). Die Bildung eines AXIN/APC-Komplexes und die Phosphorylierung von β-Catenin durch CK1 (caseine kinase 1) und GSK3 (glycogen synthase kinase 3) ist für die Markierung von β-Catenin für den proteosomalen Abbau verantwortlich. (b) Die Bindung von WNT an FZD und LRP, die Rekrutierung von DVL (dishevelled protein) und die Phosphorylierung von LRP durch CK1 und GSK3 aktiviert den kanonischen Signalweg und vermittelt die Auflösung des AXIN/APC-Komplexes. Es erfolgt eine Akkumulation von β-Catenin, welches in den Zellkern wandert und die Expression von WNT Zielgenen über die Transkriptionsfaktoren TCF/LEF (T cell factor/lymphoid enhancer factor) anschaltet. (c) Die Aktivierung des nicht-kanonischen Signalweges erfolgt durch die Bindung von WNT an FZD. Heterotrimere G-Proteine vermitteln über DVL und PKC (Proteinkinase C) eine Calciumfreisetzung. Die Inhibierung des kanonischen Signalweges erfolgt über die Repression der Zielgene durch NLK (nemo-like kinase).

In vielen Tumoren liegt ein aktiver Wnt-Signalweg bzw. eine Anreicherung von  $\beta$ -Catenin vor, bedingt durch Mutationen im *APC* oder *CTNNB1* Gen. Ebenfalls konnte bereits gezeigt werden, dass durch epigenetische Veränderungen die Inhibitoren *SFRP1* und *WIF1* in Tumorzellen vermindert exprimiert werden (Ai et al., 2006), (Sogabe et al., 2008). Ebenso wurden für *DKK1* hypermethylierte Promotorbereiche nachgewiesen (Aguilera et al., 2006). Epigenetische Faktoren, insbesondere die DNA-Methylierung, haben somit einen erheblichen Einfluss auf die Regulation des Wnt-Signalweges bei der Tumorentstehung.

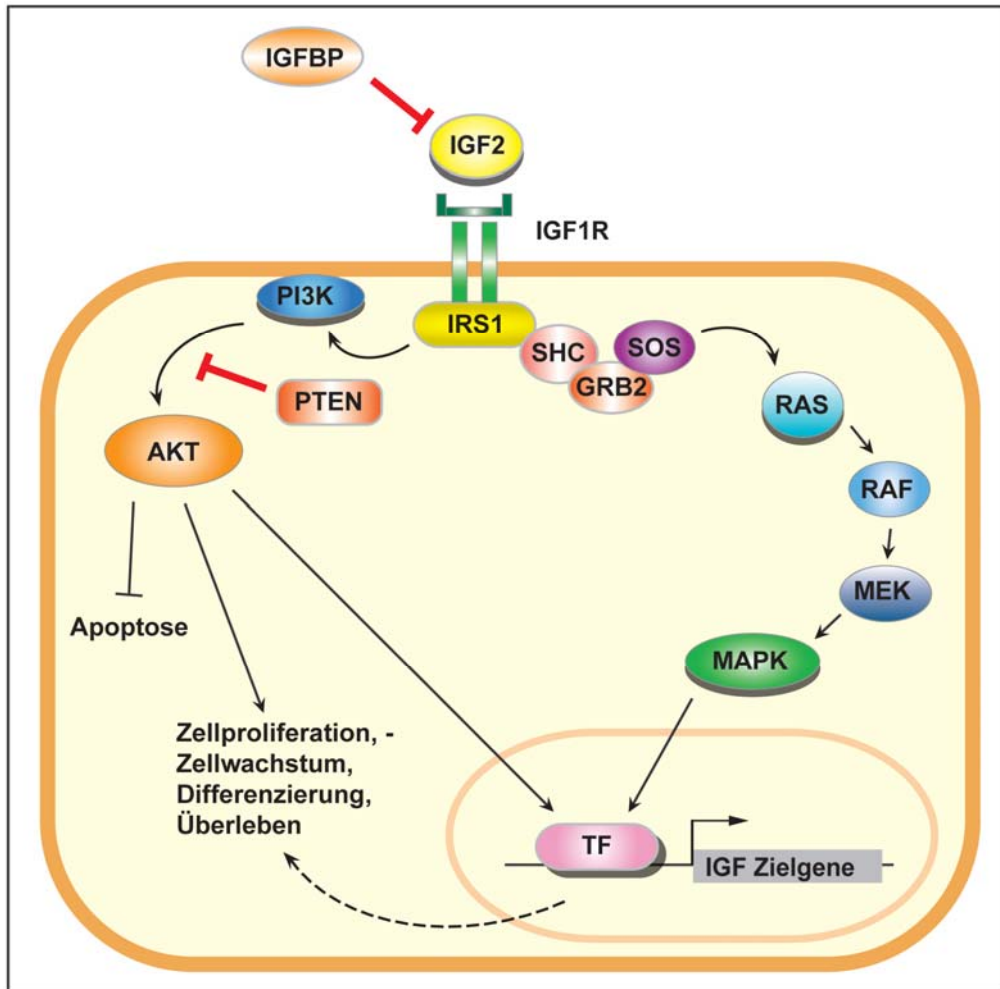
#### **1.4. IGF-Signalweg**

Der IGF-Signalweg spielt eine wichtige Rolle in der normalen Entwicklung und dem Wachstum. Jedoch kommt es auch bei der Tumorentstehung häufig zu einer erhöhten Expression des Wachstumsfaktors *IGF2* (insulin-like growth factor 2) und damit zu einer Aktivierung des IGF-Signalweges (Foulstone et al., 2005).

Dabei wird das IGF Signal über zwei Hauptwege in der Zelle verarbeitet. Über die Bindung von IGF2 an den Rezeptor IGF1R wird das Signal in die Zelle geleitet, wobei sich der Rezeptor selbst phosphoryliert und damit Bindestellen für IRS1 (insulin receptor substrate 1) ausbildet (LeRoith and Roberts, 2003). Für die erhöhte Expression von IGF Zielgenen ist die Aktivierung der MAP (mitogen activated protein) Kinase verantwortlich (Kaneda and Feinberg, 2005). Es erfolgt die Rekrutierung von SHC (Src homology 2 domain containing protein), GRB2 (growth factor receptor-bound protein 2) und SOS (son of sevenless homolog) und die Aktivierung der RAS/RAF/MEK-Signalkaskade (Bild 7) (Foulstone et al., 2005). Die Regulation der metabolischen und anti-apoptotischen Signale erfolgt über den PI3K/AKT-Signalweg, wobei die PI3K (phosphoinositide-3-kinase) die Aktivierung von AKT hervorruft. Diese Serin/Threonin-Kinase reguliert viele zelluläre Prozesse, die zum Beispiel einen Einfluss auf die Apoptose und den Zellzyklus haben (Bild 7) (Manning and Cantley, 2007).

Ein Inhibitor des Signalweges ist IGFBP3 (insulin-like growth factor binding protein 3). Dieser bindet an IGF2 und vermindert dessen Bioverfügbarkeit. Ebenfalls kann IGFBP3 auf einem IGF-unabhängigen Weg Apoptose induzieren und somit das Zellwachstum verhindern (Grimberg and Cohen, 2000). Intrazellulär wirkt PTEN (phosphatase and tensin homolog) als negativer Regulator des IGF-Signalweges, in dem es die Aktivierung von AKT verhindert (Gennigens et al., 2006).





**Bild 7:** Abbildung modifiziert nach (Gennigens et al., 2006). Die Aktivierung des IGF-Signalweges erfolgt durch die Bindung von IGF2 (insulin-like growth factor 2) an den Rezeptor IGF1R. Dadurch kommt es zur Rekrutierung von IRS1 (insulin receptor substrate 1) und zur Aktivierung der Serin/Threonin Kinase AKT über PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase). Inhibierungsmöglichkeit des PI3K/AKT-Weges durch PTEN (phosphatase and tensin homolog). Weiterhin Aktivierung des MAP (mitogen activated protein) Kinase-Weges durch die Proteininteraktionen von SHC (Src homology 2 domain containing protein), GRB2 (growth factor receptor-bound protein 2) und SOS (son of sevenless homolog) und der Weiterleitung über die Signalkaskade RAS/RAF/MEK. IGF-BPs (insulin-like growth factor binding proteins) hingegen vermögen über direkte Bindung an IGF2 die Signalauslösung zu verhindern.

In Tumoren ist ein aktiver IGF-Signalweg häufig auf eine Überexpression von *IGF2* zurückzuführen, bedingt durch einen LOH oder LOI des 11p15 Locus (siehe 1.1.2.). Zu Mutationen von extrazellulären Komponenten des Signalweges kommt es dagegen sehr selten (Foulstone et al., 2005). Daher wurde bereits diskutiert, ob ein primärer Defekt, wozu auch die DNA-Methylierung gehört, für eine verminderte IGFBP3 Serumkonzentration in Tumoren verantwortlich sein könnte (Grimberg and Cohen, 2000).

## 2. Zielstellung der Arbeit

Vom Hepatoblastom ist bekannt, dass genetische Veränderungen des Wnt-Signalweges und Modifikationen des IGF-Signalweges zur Tumorentstehung beitragen. Im Rahmen dieser Arbeit sollte nun untersucht werden, inwieweit epigenetische Mechanismen für die Ausbildung eines Hepatoblastoms verantwortlich sind. Insbesondere sollte bestimmt werden, ob Methylierungen von CpG-Inseln im Promoterbereich inhibitorischer Gene des Wnt- und IGF-Signalweges das Tumorstadium beeinflussen.

Dafür sollten primäre Tumore und Zelllinien auf ihr Methylierungsmuster untersucht werden. Die CpG Inseln im Promoterbereich der inhibitorischen Gene *APC*, *CDH1*, *DKK1*, *SFRP1* und *WIF1* des Wnt-Signalweges sowie *IGFBP3* und *PTEN* des IGF-Signalweges werden daher mittels methylen-spezifischer PCR auf methylierte CpG Dinukleotide geprüft. Anschließend wird deren Genexpression untersucht und mit dem Methylierungsstatus verglichen.

In den Zelllinien sollte die Expression der epigenetisch stillgelegten Gene durch die Behandlung mit demethylierenden Agenzien und Histondeacetylaseinhibitoren auf deren Reaktivierbarkeit untersucht werden. Ebenfalls sollte eine Reexpression der Gene durch transiente und stabile Transfektion der Kandidatengene bewirkt werden, um in anschließenden funktionellen Analysen Aufschluss über den Einfluss der Kandidatengene auf die Zellproliferation und auf die Aktivität des entsprechenden Signalweges zu erhalten.

Um die Ergebnisse der epigenetischen Veränderungen mit bereits für Hepatoblastome beschriebenen genetischen Veränderungen vergleichen zu können, werden in den Primärtumoren und in den Zelllinien  $\beta$ -Catenin Mutationen, sowie der LOH/LOI Status und die Genexpression von *IGF2* bestimmt.

### 3. Material

Sämtliche Puffer und Lösungen wurden mit ddH<sub>2</sub>O angesetzt und falls notwendig autoklaviert.

#### 3.1. Chemikalien, Reagenzien und Puffer

Agarose	PeqLab, Erlangen
5-Aza-2'-deoxycytidine	Sigma-Aldrich, Steinheim
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau Natriumsalz	Merck, Darmstadt
BSA	Roth, Karlsruhe
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Crystal Violet	Sigma-Aldrich, Steinheim
DMSO	Sigma-Aldrich, Steinheim
DTT	Roche Diagnostics, Penzberg
dNTPs	Roche Diagnostics, Penzberg
EDTA	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid, 10 mg/ ml	Sigma-Aldrich, Steinheim
FBS	Invitrogen, Karlsruhe
Fugene 6	Roche Diagnostics, Penzberg
HCl	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
6x Loading Dye Solution	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Lumigen PS-3 Detection Reagent	Lumigen, Southfield, USA
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Methanol	Merck, Darmstadt
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
PBS (1x)	Invitrogen, Karlsruhe
Phenol	Roth, Karlsruhe
Random-Hexamere	Roche Diagnostics, Penzberg
SAM (S-adenosylmethionine)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
SDS	Roth, Karlsruhe
Trichostatin A	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tri-Reagent	Molecular Research Center, Cincinnati, USA

Tris	Roth, Karlsruhe
Tween 20	Sigma-Aldrich, Steinheim

### 3.2. Größen- und Massenstandard

Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Gene Ruler™ 1 kb DNA Ladder	MBI Fermentas, St. Leon-Rot

### 3.3. Antibiotika

Ampicillin	Stammlösung: 50 mg/ml	Roth, Karlsruhe
Kanamycin	Stammlösung: 50 mg/ml	Fluka, Buchs, CH
G418	Stammlösung: 50 mg/ml	Sigma-Aldrich, Steinheim
Puromycin	Stammlösung: 5 mg/ml	Sigma-Aldrich, Steinheim

### 3.4. Zelllinien

#### 3.4.1. Prokaryotische Zellen

*Escherichia coli* DH5 $\alpha$

Genotyp: F-  $\phi$ 80/*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ (*lacZYA-argF*)U169

*recA1 endA1 hsdR17*(rk-,mk+) *phoA**supE44 thi-1*

*gyrA96 relA1*  $\lambda$ -

Invitrogen, Karlsruhe

#### 3.4.2. Eukaryotische Zellen

HUH6	<i>Homo sapiens</i> (human), Leber, Hepatoblastom (Japanese Collection of Research Bioresources, Osaka, Japan)
HepT1	<i>Homo sapiens</i> (human), Leber, Hepatoblastom (Pietsch et al., 1996)
HepT3	<i>Homo sapiens</i> (human), Leber, Hepatoblastom (Hartmann et al., 2000)
HepG2	<i>Homo sapiens</i> (human), Leber, Hepatozelluläres Karzinom (ATCC, Manassas, VA, USA)

### 3.5. Kulturmedien

#### 3.5.1. Prokaryotische Kulturmedien

LB-Medium (Luria / Miller)

Roth, Karlsruhe

LB-Agar (Luria / Miller)

Roth, Karlsruhe

#### 3.5.2. Eukaryotische Kulturmedien

RPMI 1640 Medium (1x), liquid - with GlutaMAX™ I

Invitrogen, Karlsruhe

### 3.6. Primer

#### 3.6.1. Primer für methylspezifische PCR (MSP)

Gen		Primer fw 5'-3'	Primer rev 5'-3'	Prod.	AT	Lkl.
<i>APC</i>	M	TATTG <b>CGG</b> AGTG <b>CGGG</b> TC	TCGAC <b>GAACTCCCG</b> ACGA	98	58 °C	+163
	U	GTGTTTTATTGTGGAGTG <b>TGGG</b> TT	CCAATCA <b>ACAACTCCCA</b> ACAA	108		
<i>CDH1</i>	M	GGTGAATTTTTAGTTAATTAG <b>CGGTAC</b>	CATAACTAACC <b>GAAAA</b> CGCCG	205	58 °C	+78
	U	GGTAGGTGAATTTTTAGTTAATTAG <b>TGGTA</b>	ACCCATAACTAACC <b>AAAAAC</b> ACCA	212		
<i>DKK1</i>	M	TTAAGGGGT <b>CGGAATG</b> TTTC	CACGAAACC <b>GTACC</b> GATTC	150	58 °C	+77
	U	TTTTAAGGGGT <b>TGGAATG</b> TTTT	CCACA <b>AAACCA</b> TACCA <b>AATT</b> CAAC	153		
<i>SFRP1</i>	M	TTTGTAGTTTT <b>CGGAGTTAGT</b> GC	CGACCCTC <b>GACCTAC</b> GATCG	138	58 °C	-12
	U	TTTTGTAGTTTT <b>TGGAGTTAGT</b> GTGTG	CAATAAC <b>AACCCTCA</b> ACCTAC <b>AATCA</b> A	145		
<i>WIF1</i>	M	TGGGAG <b>CGCG</b> TAAAGTGTAGTTTATC	CTCC <b>GACGCTCACT</b> AAAAACGC	119	58 °C	+672
	U	GTTTGGGAG <b>TGT</b> GTAAGTGTAGTTTATT	CTCCTCC <b>AACACTCACT</b> AAAAACAC	119		
<i>IGFBP3</i>	M	GCGAGTTT <b>CGAGTTGTAC</b> GTTTTTC	GCCGACC <b>GCTATATA</b> AAAAACCG	167	61 °C	+316
	U	TTGGG <b>TGAGTTT</b> TGAGTTGTATGTTTTT	AAAC <b>ACACCA</b> ACC <b>ACTATATA</b> AAAAACCAA	167		
<i>PTEN</i>	M	CGTTTTTTTT <b>CGGTTTT</b> CGAGGC	CAATC <b>GCGTCCCAAC</b> GCCG	134	61 °C	+987
	U	TTTTGAGGTGTTTGGGTTTT <b>TGGT</b>	ACACA <b>ATCACAT</b> CCCAAC <b>ACCA</b>	124		

**Tab. 1:** Sequenzen der MSP-Primer: *APC* (Esteller et al., 2000), *CDH1* (Nakata et al., 2006), *DKK1* (Aguilera et al., 2006), *PTEN* (Zysman et al., 2002). Primer und Annealing Temperatur (AT) wurden für *SFRP1*, *WIF1* und *IGFBP3* selbst generiert. M: methyliert, U: unmethyliert. Angegeben sind die Produktlänge (Prod.) in Basenpaaren und die Lokalisation (Lkl. (+) Anzahl der bp upstream, (-) Anzahl der bp downstream vom Transkriptionsstart) und die Primer forward (fw) / reverse (rev).

#### 3.6.2. Primer für die Bestimmung des LOI/LOH Status

Gen	Primer fw 5'-3'	Primer rev 5'-3'	Prod.	AT	Lkl.
<i>H19</i>	GGCCCTAGTGTGAAACCCTTCTCG	CAGGCGGTGAGACCGAAGGA	110	55 °C	+2289
<i>KvDMR</i>	CCCCTGGGCCAATCT	GAGTCTGGTTTTGATGCCACC	110	55 °C	+136

**Tab. 2:** Primer für die Gene *H19* und *KvDMR* zur Bestimmung des LOI/LOH Status. Die Primer forward (fw) und reverse (rev) wurden nach Fukuzawa et al. verwendet (Fukuzawa et al., 2004). Angegeben sind die Annealing Temperatur (AT), die Produktlänge (Prod.) in Basenpaaren und die Lokalisation (Lkl. (+) Anzahl der bp upstream, (-) Anzahl der bp downstream vom Transkriptionsstart).

### 3.6.3. Expressionsprimer

Gen	Primer fw 5'-3'	Primer rev 5'-3'	Prod.	AT	Lkl.
<i>APC</i>	ACGCTCAACTTCAGAATCTCACTAAA	TTCATATTCCAATTGCCTTCTGG	91	55 °C	Ex 5/6
<i>CDH1</i>	CGAGAGCTACACGTTACGG	TTGTCGACCGGTGCAATCT	91	55 °C	Ex 2/3
<i>DKK1</i>	GCTGCCCGGGGAATTACT	TGGTTTCCTCAATTTCTCCTCG	81	55 °C	Ex 2/3
<i>SFRP1</i>	CATGACGCCGCCCAAT	GATGGCCTCAGATTTCAACTCG	91	55 °C	Ex 1/2
<i>WIF1</i>	TGGGAACAGTGCCTCACAAG	CAAATGCTGCCACCCCAT	81	55 °C	Ex 3/4
<i>IGFBP3</i>	GTCCAAGCGGGAGACAGAATAT	CCTGGGACTCAGCACATTGA	91	55 °C	Ex 2/3
<i>PTEN</i>	ACCAGTGGCACTGTTGTTTCAC	TCACCTTTAGCTGGCAGACCA	101	55 °C	Ex 6/7
<i>PLAG1</i>	ACAAGTGCATACAACAAGACTGCA	CAGGAGAATGAGTAGCCATGTGC	81	55 °C	Ex 4/5
<i>IGF2</i>	CCTCCGACCGTGCTTCC	GGTGGACTGCTTCCAGGTGT	81	55 °C	Ex 3/4
<i>TBP</i>	GCCCGAAACGCCGAATAT	CCGTGGTTCGTGGCTCTCT	72	55 °C	Ex 4/5

**Tab. 3:** Primer für die Expressionsanalysen verschiedener Gene. Die Produktlänge (Prod.) in Basenpaare, die Annealing Temperatur (AT) und die Lokalisation (Lkl.) der Primer forward (fw) / reverse (rev) sind angegeben.

### 3.6.4. Primer zur Analyse des $\beta$ -Catenin Mutationsstatus

Primername	Primer fw 5'-3'	Primer rev 5'-3'	Prod.	AT	Lkl.
CTNNB1_mut	GATTTGATGGAGTTGGACATGG	TGTTCTTGAGTGAAGGACTGAG	228	50 °C	Int 2/3
CTNNB1_del	AAAATCCAGCGTGGACAATGG	TGTGGCAAGTTCGTCATCATC	1115	55 °C	Ex 2/4

**Tab. 4:** Primer für die Bestimmung des  $\beta$ -Catenin Mutationsstatus. Die Primer forward (fw) und reverse (rev) wurden nach Koch et al. verwendet (Koch et al., 1999). Die Produktlänge (Prod.) in Basenpaare, die Annealing Temperatur (AT) und die Lokalisation (Lkl.) der Primer sind angegeben.

## 3.7. Enzyme

Proteinase K, 10 mg/ml in ddH <sub>2</sub> O	Sigma-Aldrich, Steinheim
RNase H	Roche Diagnostics, Penzberg
SuperScript™ II Reverse Transkriptase	Invitrogen, Karlsruhe
Hot Start Taq DNA - Polymerase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
iTaq SYBR Green Supermix with ROX	Biorad, München
Trypsin EDTA (0,05%)	PAA Laboratories, Pasching, A

### 3.7.1. Restriktionsenzyme

RsaI, 10 U/ $\mu$ l	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
HpaII, 10 U/ $\mu$ l	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
MspI, 10 U/ $\mu$ l	MBI Fermentas, St. Leon-Rot

### 3.8. Plasmide

pSFRP1	zur Verfügung gestellt von Dr. Takayuki Fukui, Universität Nagoya, Japan
pcDNA3.1/V5-His	zur Verfügung gestellt von Dr. Takayuki Fukui (Fukui et al., 2005)
pIGFBP3	zur Verfügung gestellt von Aviva Fridman, Universität Detroit, USA
pIRESpuro	zur Verfügung gestellt von Aviva Fridman (Fridman et al., 2007)
pTOP	zur Verfügung gestellt von Dr. Frank Kolligs, Universität München
pFOP	zur Verfügung gestellt von Dr. Frank Kolligs, Universität München
pEGFP	ClonTech, Mountain View, CA, USA
pRL-TK	Dual-Glo <sup>®</sup> Luciferase Assay System, Promega, Mannheim

### 3.9. Kits

PureLink <sup>™</sup> Genomic DNA Purification Kit	Invitrogen, Karlsruhe
FlexiGene DNA Kit	Qiagen, Hilden
EpiTec <sup>®</sup> Bisulfite Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
RNase-Free DNase Set	Qiagen, Hilden
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAGEN Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden
Cell Proliferation Kit I (MTT)	Roche-Diagnostics, Mannheim
Dual-Glo <sup>®</sup> Luciferase Assay System	Promega, Mannheim

### 3.10. Verbrauchsmaterialien

Pyrex <sup>®</sup> brand cloning cylinder	Sigma-Aldrich, Steinheim
---	--------------------------

### 3.11. Geräte

Biofuge fresco	Heraeus, Hanau
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Centrifuge 5702	Eppendorf, Hamburg
Centrifuge LMC-3000	G. Kisker, Steinfurt
Entwicklermaschine CP1000	AGFA, Köln
Feinwaage Te1245	Sartorius, Göttingen
GelJet Imager	Intas, Göttingen

---

GENios Microplatereader	Tecan, Crailsheim
Heizblock MR 3001	Heidolph, Kelheim
Homogenisator Micra	ART, Mühlheim
Mastercycler ep gradient S	Eppendorf, Hamburg
Mastercycler personal	Eppendorf, Hamburg
Mikroskop Axiovert 40 CFL	Zeiss, Jena
Mini <sup>®</sup> -Sub Cell GT	Biorad, München
pH-Meter inoLab pH720	WTW, Weilheim
PowerPac Basic <sup>™</sup>	Biorad, München
Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg
Waage Vic-1501	Acculab, Edgewood, USA
XCell II <sup>™</sup> Blot Module	Invitrogen, Karlsruhe
XCell SureLock <sup>™</sup> Electrophoresis Cell	Invitrogen, Karlsruhe



## 4. Methoden

### 4.1. DNA-Isolierung

#### 4.1.1. Phenol-Chloroform Extraktion

Für die Gewinnung von genomischer DNA aus Gewebe und Zelllinien wurden Gewebestücke (~0,5 cm<sup>2</sup>) und Zellpellets über Nacht in 0,5 - 1 ml STE-Puffer mit 50 µl Proteinase K (10 mg/ml), Sigma-Aldrich (Steinheim) bei 55 °C verdaut. Es folgte die Zugabe von 1 Vol. Phenol, 5 min per Hand mischen und anschließend 10 min bei 4300 x g und 4 °C zentrifugieren. Der Überstand wurde abgenommen, 1 Vol. Chloroform zugegeben, 5 min per Hand gemischt und 10 min bei 4300 x g und 4 °C zentrifugiert. Die DNA im Überstand wurde mit 2,5 Vol. 100 % Ethanol gefällt und mit 70 % Ethanol gewaschen. Nach 10 min Zentrifugation bei 22.000 x g wurde die DNA luftgetrocknet und anschließend in 50 - 100 µl TE-Puffer gelöst. Die DNA wurde bei -20 °C gelagert.

STE-Puffer: 10 mM Tris, pH 8,0  
0,1 M NaCl  
1 mM EDTA  
1 % SDS

TE-Puffer: 10 mM Tris  
1 mM EDTA  
pH 8,0

#### 4.1.2. Flexi-Gene DNA-Kit

Zur Isolierung von genomischer DNA aus Blut wurde das *Flexi Gene DNA Kit*, QIAGEN (Hilden) verwendet. Die Isolierung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Durch Zellyse, Protease-Verdau und anschließender Ethanol-Präzipitation wird die DNA gewonnen und in TE-Puffer aufgenommen.

## 4.2. Aufreinigung von DNA

### 4.2.1. Ethanolfällung

Zu der DNA-Lösung wurden 2,5 Vol. 100 % Ethanol zugegeben und für 30 min bei -20 °C gefällt. Nach 10 min Zentrifugation bei 22.000 x g wurde der Überstand verworfen, das DNA-Pellet luftgetrocknet und in entsprechender Menge TE-Puffer oder ddH<sub>2</sub>O aufgenommen. Bei Fällungen mit geringer DNA-Konzentration wurden 0,25 Vol. 3 M Na-Acetat als Fällungshelfer verwendet.

### 4.2.2. Gelextraktion

Die Aufreinigung der DNA aus einem Agarosegel wurde nach Angaben des Herstellers mit dem *QIAquick Gel Extraction Kit*, Qiagen (Hilden) durchgeführt. Die DNA wird bei hohen Salzkonzentrationen an eine QIAquick Silicium-Gel Membran gebunden und anschließend mit ddH<sub>2</sub>O oder Puffer von Säule eluiert.

## 4.3. Quantifizierung von Nukleinsäuren

### 4.3.1. Photometrische Bestimmung

Die Konzentration von DNA und RNA wurde mit dem *BioPhotometer* von Eppendorf (Hamburg) bestimmt. Beide Nukleinsäuren besitzen bei 260 nm ein Absorptionsmaximum und die Nukleinsäurekonzentration kann mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetz errechnet werden. Mit einer zusätzlichen Messung bei 280 nm kann man eine Aussage über Protein- oder Phenolverunreinigungen treffen. Der Quotient  $A^{260}/A^{280}$  sollte in ddH<sub>2</sub>O für RNA bei 1,8 und für DNA bei 1,6 liegen.

Lambert-Beersches Gesetz:  $E_{\lambda} = \epsilon_{\lambda} \cdot c \cdot d$

$E_{\lambda}$ : Extinktion  
 $\epsilon_{\lambda}$ : Extinktionskoeffizient  
c: Konzentration  
d: Schichtdicke

### 4.3.2. Gelelektrophoretische Bestimmung

Die gelelektrophoretische Methode wurde zur Konzentrationsbestimmung von DNA-Fragmenten (~ 100 - 10.000 bp) angewandt. Nach der Auftrennung über ein Agarosegel (4.4.) wurden die DNA-Fragmente mit einem DNA-Standard in ihrer Bandenintensität

verglichen. Als Standard wurden der *Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder* oder *Gene Ruler™ 1 kb DNA Ladder* von MBI Fermentas (St. Leon-Rot) verwendet.

#### 4.4. DNA-Gelelektrophorese

Durch die Anlegung eines elektrischen Feldes werden DNA-Fragmente nach der Größe aufgetrennt. Für die Elektrophorese wurden 1 – 2 %ige Agarosegele mit 0,25 µg/ml Ethidiumbromid, Sigma-Aldrich (Steinheim) verwendet. Die Agarosekonzentration richtete sich nach der Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente. Der Lauf wurde horizontal in TBE-Puffer mit der Apparatur *mini®-Sub Cell GT* und der dazugehörigen Spannungsquelle *PowerPac Basic™*, Biorad (München) bei ~90 V durchgeführt. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen mit *6x Loading Dye Solution* von MBI Fermentas (St. Leon-Rot) versehen. Nach der Elektrophorese wurden die Banden mittels UV-Licht detektiert und mit einer Dokumentationsapparatur *GelJet Imager*, Intas (Göttingen) aufgenommen.

TBE-Puffer: 89 mM Tris  
89 mM Borsäure  
2 mM EDTA  
pH 8,0

#### 4.5. Bisulfitbehandlung

Die Bisulfitbehandlung von DNA erfolgte mit dem *EpiTect® Bisulfite Kit*, Qiagen (Hilden). Dabei wurden 3 µg genomischer DNA nach Angaben des Herstellers mit Bisulfitsalzen behandelt. Bei der Thermoreaktion im *Mastercycler personal*, Eppendorf (Hamburg) werden während der Inkubation mit den Bisulfitsalzen unmethylierte Cytosine in Uracil umgewandelt, methylierte Cytosine erfahren hingegen keine Veränderung. Die konvertierte DNA wurde nach der Thermoreaktion über Säulchen aufgereinigt, von Salzen befreit und zwei Mal mit 20 µl EB-Puffer (im Kit enthalten) eluiert.

#### 4.6. RNA-Isolierung

Zur Gewinnung von RNA aus Gewebe wurde ein Gewebestück (0,5 cm<sup>3</sup>) in *Tri Reagent*, Molecular Research Center (Cincinnati, USA) überführt und mit einem Homogenisator *Micra*, ART (Mühlheim) homogenisiert. Bei der Isolierung von RNA aus Zelllinien wurde das *Tri-Reagent* direkt auf die Zellen gegeben. Dem Lysat wurden 0,4 Vol. Chloroform hinzugefügt, 15 sec gevortext, 3 min bei RT inkubiert und eine Phasentrennung für 15 min

bei 22.000 x g und 4 °C durchgeführt. Die obere Phase wurde in ein neues Tube überführt und mit 1 Vol. Isopropanol gemischt, 10 min bei RT inkubiert und 15 min bei 22.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Das RNA Pellet wurde mit 1 ml 70 % Ethanol gewaschen und nach dem Lufttrocknen in 50 µl ddH<sub>2</sub>O gelöst. Die RNA wurde bei -80 °C gelagert.

#### 4.7. DNase-Verdau und RNA Aufreinigung

Der DNase-Verdau und die Aufreinigung der RNA wurde mit dem *RNeasy mini Kit*, Qiagen (Hilden) und dem *RNase-Free DNase Set*, Qiagen (Hilden) durchgeführt. Die Bindung der RNA an eine Silicium-Gel Membran wurde nach Angaben des Herstellers mit dem *RNeasy mini Kit* durchgeführt. Durch die Zugabe des Enzyms DNase I aus dem *RNase-Free DNase Set* wurde der DNase-Verdau direkt auf der Säule durchgeführt. Dafür wurden 10 µl der DNase I Stocklösung mit 70 µl RDD Puffer vorsichtig gemischt, auf die Säule gegeben und 15 min bei RT inkubiert. Nach mehreren Waschschritten wurde die RNA mit RNase-freiem ddH<sub>2</sub>O eluiert und bei -80 °C gelagert.

#### 4.8. cDNA-Synthese

Für die Synthese von cDNA wurde die *SuperScript™ II Reverse Transkriptase*, Invitrogen (Karlsruhe) mit ihren zugehörigen Komponenten *5x First Strand Buffer* und DTT verwendet. Es wurden 2 µg DNase-verdaute, aufgereinigte total-RNA eingesetzt und mit ddH<sub>2</sub>O auf 7 µl aufgefüllt. Nach der Zugabe von 5 µl Random-Hexamere (20 ng/µl), Roche Diagnostics (Penzberg) wurde der Ansatz für 10 min bei 70 °C inkubiert. Anschließend wurden 4 µl *5x First Strand Buffer*, 2 µl DTT (0,1 M) und 1 µl dNTPs (10 mM), Roche Diagnostics (Penzberg) hinzu gegeben. Die Inkubationszeit betrug zunächst 10 min bei 25 °C, danach wurde die Reaktion für 2 min auf 42 °C gestellt. Die Synthese der cDNA wurde durch die Zugabe von 1 µl (200 U) Enzym *SuperScript™ II Reverse Transkriptase* gestartet. Nach 60 min bei 42 °C wurde die Reaktion für 10 min bei 70 °C inaktiviert. Für den folgenden RNase-Verdau wurden 1 µl (1U) *RNase H*, Roche Diagnostics (Penzberg) hinzu gegeben und für 20 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde mit ddH<sub>2</sub>O auf eine Endkonzentration von 20 ng/µl eingestellt.

#### 4.9. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR dient der Vervielfältigung spezifischer DNA-Fragmente. Als Ausgangsmaterial wurden 40 - 50 ng genomische DNA oder cDNA verwendet. Der 20 µl Reaktionsansatz bestand aus 1 µM Primer (Tab. 4), 0,2 mM dNTPs, Roche Diagnostics (Penzberg), 1,5 mM

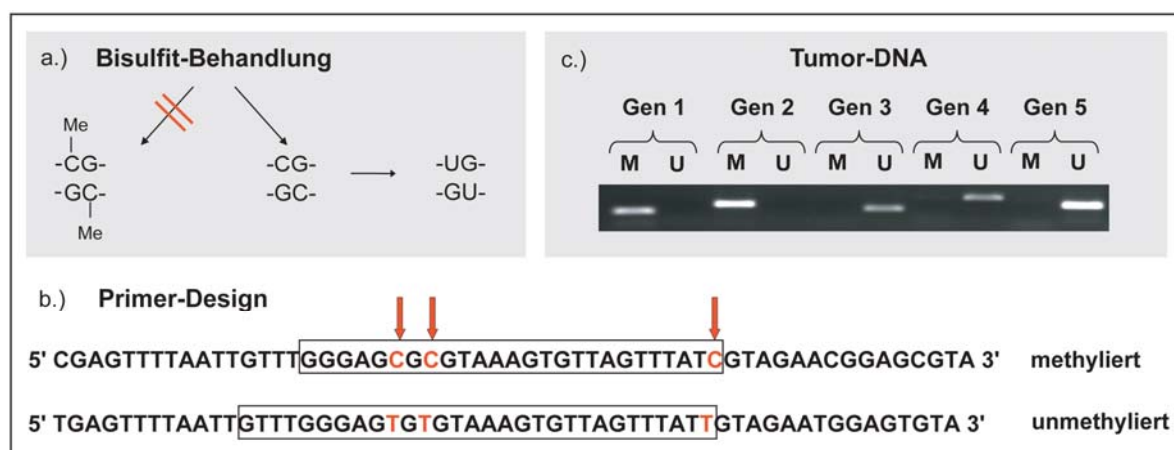
MgCl<sub>2</sub>, 1x *Hot Start PCR Puffer* und 1 Unit *Hot Start Taq DNA - Polymerase*, MBI Fermentas (St. Leon-Rot). Für die PCR wurde der *Mastercycler personal*, Eppendorf (Hamburg) verwendet. Das PCR-Programm bestand aus 38 Zyklen Denaturierung, Annealing und Extention. Dabei war die Zeit der einzelnen Phasen abhängig von der Größe der zu amplifizierenden Fragmente und die Annealing Temperatur wurde von den verwendeten Primern (Tab. 4) bestimmt. Die Reaktion wurde mit *6x Loading Dye Solution*, MBI Fermentas (St. Leon-Rot) versehen und auf ein 1 – 2 % Agarosegel aufgetragen.

#### 4.9.1. Methylspezifische PCR (MSP)

Zum Nachweis von methylierter DNA wurde die Methylspezifische PCR (MSP) angewandt. Bei dieser Methode macht man sich zunutze, dass bei der Bisulfit-Behandlung der DNA unmethylierte Cytosine in Uracil umgewandelt werden, methylierte Cytosine hingegen erhalten bleiben (Bild 8a). Die beiden DNA Stränge sind nach der Bisulfit-Behandlung nicht mehr komplementär. Für die anschließende PCR (4.9.) werden Primer verwendet, die nach der Bisulfitbehandlung zwischen dem methylierten und dem unmethylierten Zustand der DNA unterscheiden können (3.6.1.) (Herman et al., 1996).

Mit der MSP können CpGs im Promoterbereich verschiedener Gene auf ihren Methylierungsstatus untersucht werden. Die spezifischen Primer für den methylierten und unmethylierten Zustand sollten einen Bereich von mindestens drei CpGs abdecken (Bild 8b) und die letzte Base am 3'-Ende sollte idealer Weise eine Cytosinbase eines CpGs sein (Herman et al., 1996).

Für die MSP wurden 200 ng bisulfit-behandelte DNA eingesetzt. Der 20 µl Reaktionsansatz bestand aus 1 µM Primer (Tab. 1), 0,2 mM dNTPs, Roche Diagnostics (Penzberg), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1x *Hot Start PCR Puffer*, 1 Unit *Hot Start Taq DNA - Polymerase*, MBI Fermentas (St. Leon-Rot). Für die PCR wurde der *Mastercycler personal*, Eppendorf (Hamburg) verwendet. Das PCR-Programm wurde mit einer initialen Denaturierung bei 94 °C von 4 min eingeleitet, anschließend folgten 38 Zyklen mit Denaturierung bei 94 °C für 30 sec, 30 sec Annealing (Tab. 1) und 45 sec Extention bei 72 °C. Die finale Extention betrug 72 °C für 10 min. Die MSP Reaktion wurde anschließend mit *6x Loading Dye Solution*, MBI Fermentas (St. Leon-Rot) versehen und auf ein 1-2 % Agarosegel aufgetragen (Bild 8c).



**Bild 8:** Methylenpezifische PCR (MSP): (a) Durch Bisulfit-Behandlung bleiben methylierte Cytosine erhalten, unmethylierte Cytosine werden in Uracil umgewandelt. (b) Primer-Design für den methylierten und unmethylierten Zustand. Die Pfeile kennzeichnen den Unterschied zwischen methylierten und unmethylierten Cytosinresten nach der Bisulfitbehandlung (c) PCR-Analyse des Methylierungsstatus der Tumor-DNA für verschiedene Gene mittels Gelelektrophorese.

#### 4.9.2. Quantitative realtime PCR (Q-PCR)

Für die Untersuchung der Expression spezifischer Gene wurde die quantitative realtime PCR eingesetzt. Dabei wurden für die Reaktion 40 ng cDNA, 1  $\mu$ M Primer (Tab. 3) und 1x *iTaq SYBR Green Supermix with ROX*, Biorad (München) verwendet. Das PCR-Programm bestand aus initialer Denaturierung von 2 min bei 94 °C. Es folgten 40 Zyklen von je 15 sec Denaturierung bei 95 °C, 15 sec Annealing bei 55 °C und 20 sec Extension bei 68 °C. Um eine Aussage über die Spezifität der Primer treffen zu können, wurde am Ende des Reaktionsverlaufes eine Schmelzkurvenanalyse angefügt. Die Quantifizierung der Reaktionskurven erfolgte mit dem *Mastercycler ep gradient S*, Eppendorf (Hamburg) und der dazugehörigen Software *realplex*.

Während der Q-PCR lagert sich ein Fluoreszenzfarbstoff (SYBR Green) in das entstehende Produkt ein, wodurch die Fluoreszenz proportional zur Produktmenge zunimmt. Um die Produktmenge zu quantifizieren wurde in der exponentiellen Phase der Amplifikation immer der gleiche Schwellenwert gesetzt. Dadurch erhielt man für jede Reaktion vergleichbare Ct-Werte (*Threshold-Cycle*). Die PCR-Reaktionen wurden in Dubletten durchgeführt und aus den Ct-Werten der Mittelwert errechnet. Für jedes Gewebe wurde zusätzlich das Haushaltsgen *TBP* (*TATA-Box binding protein*) quantitativ bestimmt und die Kandidatengene wurden auf *TBP* ( $\Delta\text{Ct} = \text{Ct-Gen} - \text{Ct-TBP}$ ) normiert. Um die Expression der Tumorgewebe oder Zelllinien mit Normalleber (NL) zu vergleichen wurde die relative Expression mit der Formel  $\Delta\Delta\text{Ct} = 2^{- (\Delta\text{Ct-Gen Probe} - \Delta\text{Ct-Gen MW(NL)})}$  berechnet (Pfaffl, 2001). Ein Wert unter eins zeigt eine transkriptionelle Runterregulation des Gens an, ein Wert über eins eine Überexpression.

#### 4.10. LOI/LOH-Status

Für die Bestimmung des LOI/LOH Status im *IGF2/H19* Locus (Fukuzawa et al., 2004) wurde zunächst von Zelllinien, Tumoren und Normalgewebe genomische DNA isoliert (4.1.) und in verschiedenen Reaktionsansätzen mit Hilfe von drei Restriktionsenzymen, MBI Fermentas (St. Leon-Rot) verdaut (4.13.). Jeweils 500 ng DNA wurden in einem 20 µl Ansatz mit RsaI (10 U), RsaI (10 U) und methylsensitivem HpaII (10 U) oder RsaI (10 U) und MspI (10 U) für 2 h bei 37 °C inkubiert (4.13.). Die Pufferbedingungen richteten sich nach den Angaben des Herstellers. Das methylsensitive Enzym HpaII konnte nur unmethylierte DNA in dem spezifischen Bereich des *IGF2/H19* Locus schneiden. Lag die DNA methyliert vor, fand in dem betroffenen genomischen Abschnitt kein Restriktionsverdau statt. Über die Bereiche der HpaII Schnittstelle im *IGF2/H19* Locus wurde anschließend eine quantitative realtime-PCR (4.9.2.) mit spezifischen Primern (Tab. 2) gelegt. Für die Region KvDMR und H19 wurde für alle drei Restriktionsansätze eine quantitative realtime PCR durchgeführt und anschließend die DNA-Menge bestimmt. Da die DNA-Menge exponentiell bei jedem PCR-Zyklus ansteigt, musste die amplifizierte DNA über eine DNA-Standardkurve und der daraus resultierenden Logarithmusfunktion errechnet werden. Durch die Bildung des Quotienten aus DNA-Menge und Reaktionsansatz RsaI / HpaII und RsaI konnte man anschließend eine Aussage über den Methylierungsgrad des *IGF2/H19* Locus treffen. Hierbei war 0,8 - 1,7 = ROI (*retention of imprinting*), 1,8 - 2,8 = LOI (*loss of imprinting*) und > 2,9 = LOH (*loss of heterozygosity*). Die Restriktionsenzyme RsaI und MspI (Isochizomer von HpaII) dienten dabei als Kontrolle für den Restriktionsverdau.

#### 4.11. β-Catenin Mutationsanalyse

Für die Mutationsanalyse von β-Catenin wurde unterschieden zwischen der Deletion eines Genfragmentes und einer Punktmutation im Exon 3 (Koch et al., 1999). Hierzu wurden 50 ng cDNA der Hepatoblastome mit den spezifischen Primern CTNNB1-del (Tab. 4) amplifiziert. Das PCR-Programm bestand aus initialer Denaturierung von 4 min bei 94 °C. Es folgten 38 Zyklen von je 40 sec Denaturierung bei 94 °C, 40 sec Annealing bei 55 °C und 60 sec Extension bei 72 °C. Die finale Extension betrug 72 °C für 10 min. Anschließend wurde die PCR auf ein Agarosegel aufgetragen. Bei einer Deletionsmutation von β-Catenin war das PCR-Produkt kleiner als die erwartete Wildtypbande von 470 bp. Die Banden wurden ausgeschnitten und aufgereinigt (4.2.2.). Bei Tumoren, die keine Deletion zeigten, wurde mit einer zweiten PCR das Exon 3 amplifiziert. Dafür wurden 50 ng genomische DNA der Hepatoblastome mit den Primern CTNNB1-mut (Tab. 4) amplifiziert. Das PCR-Programm bestand aus initialer Denaturierung von 4 min bei 94 °C. Es folgten 38 Zyklen von je 40 sec Denaturierung bei 94 °C, 40 sec Annealing bei 50 °C und 40 sec Extension bei 72 °C. Die

finale Extention betrug 72 °C für 10 min. Die Banden wurden ebenfalls über Gelextraktion (4.2.2.) aufgereinigt.

Für die Sequenzierungsreaktion wurden die PCR-Produkte über ein Agarosegel aufgereinigt (4.2.2.) und die DNA-Konzentration bestimmt (4.3.2.). Die Anforderung der Firma MWG für die Sequenzierung betrug bei Fragmenten von 300 - 1000 bp eine DNA-Konzentration von 16 ng/µl, bei kleineren Fragmenten reichte eine Konzentration von 4 ng/µl. Hinzu kamen 1,5 pmol Primer *forward* oder *reverse* (Tab. 4) und das Gesamtvolumen sollte 15 µl nicht überschreiten. Alle PCR-Produkte wurden von der Firma MWG Biotech (Ebersberg) sequenziert und mit der Software Chromas VS1.49, Griffith University (Southport, Australia) ausgewertet.

## **4.12. Klonierung von Plasmid-DNA**

### **4.12.1. Chemische Transformation**

Bei der chemischen Transformation wurden pro Ansatz 40 µl kompetente *E.coli* DH5- $\alpha$  Zellen, Invitrogen (Karlsruhe) auf Eis aufgetaut und 50 – 100 ng Plasmid-DNA hinzu gegeben. Der Ansatz wurde für mindestens 30 min auf Eis inkubiert. Der folgende Hitzeschock wurde bei 42 °C für 60 sec im Wasserbad durchgeführt und eine weitere Inkubationszeit von 5 min auf Eis wurde eingehalten. Danach wurden pro Ansatz 2 ml LB-Medium, Roth (Karlsruhe) zugegeben und für 1 – 2 h bei 37 °C im Inkubator bei 200 rpm geschüttelt. Anschließend wurden 100 µl der Bakterienkultur auf einer LB-Selektionsagarplatte, Roth (Karlsruhe) mit 50 µg/ml Ampicillin, Roth (Karlsruhe) oder 25 µg/ml Kanamycin, Fluka (Buchs, CH) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

### **4.12.2. Minipräparation von Plasmid-DNA**

Zur Präparation der rekombinanten DNA wurde das *QIAprep Spin miniprep Kit*, Qiagen (Hilden) verwendet. Nach der Transformation wurden die Klone von der LB-Selektionsagarplatte, Roth (Karlsruhe) gepickt, auf einer Masteragarplatte ausgestrichen und anschließend in 4 ml LB-Selektionsmedium überführt. Als Selektionsantibiotika wurde Ampicillin (50 µg/ml), Roth (Karlsruhe) oder Kanamycin (25 µg/ml), Fluka (Buchs, CH) eingesetzt. Die Kulturen wurden über Nacht bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Ebenfalls wurde die Masteragarplatte über Nacht im Brutschrank bei 37 °C kultiviert und anschließend bei 4 °C gelagert. Für die Aufreinigung der Plasmid-DNA wurde die gesamte Zellsuspension



verwendet und die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die Plasmid-DNA wurde mit 50 µl EB-Puffer eluiert.

### **4.12.3. Midipräparation von Plasmid-DNA**

Um größere Mengen an Plasmid-DNA zu gewinnen, wurde eine Midipräparation mit dem *QIAGEN Plasmid Midi Kit*, Qiagen (Hilden) durchgeführt. Dafür wurde zunächst eine 5 ml (LB-Medium) Vorkultur mit Selektionsantibiotika angelegt und mit einem Klon von der Masteragarplatte angeimpft. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37 °C und 200 rpm. Für die Hauptkultur wurden 100 µl der Vorkultur in 25 ml LB-Medium überführt, mit Antibiotika versehen und über Nacht bei 37 °C und 200 rpm kultiviert. Anschließend erfolgte die Isolierung der Plasmid-DNA nach Angaben des Herstellers. Die Plasmid-DNA wurde je nach Größe des DNA-Pellets in 100 – 200 µl TE-Puffer oder ddH<sub>2</sub>O aufgenommen.

### **4.13. Restriktion**

Mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen, MBI Fermentas (St. Leon-Rot) kann doppelsträngige DNA sequenzspezifisch gespalten werden. Für den Restriktionsverdau wurden 0,5 - 1 µg DNA eingesetzt und mit 10 U des entsprechenden Enzyms für 2 h inkubiert. Die Pufferbedingungen und Inkubationstemperatur richtete sich dabei nach den Angaben des Herstellers. Anschließend wurde die DNA zur Analyse elektrophoretisch aufgetrennt (4.4.).

### **4.14. Zellkultur**

#### **4.14.1. Kultivierung von Zelllinien**

Die Zelllinien HUH6, HepT1, HepT3 und HepG2 wurden mit *RPMI 1640 Medium (1X), liquid – with GlutaMAX™ I* und 10 % FBS von Invitrogen (Karlsruhe) bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert.

Beim Erreichen einer Konfluenz von 80 - 90 % wurden die Zellen passagiert. Dazu wurde das Medium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin-EDTA (1x), PAA Laboratories (Pasching, A) für etwa 2 min bei 37 °C inkubiert. Zur Inaktivierung des Trypsins wurde erneut RPMI Medium mit 10 % FBS hinzu gegeben und ein Teil der Zellsuspension in neues Medium überführt.

#### 4.14.2. 5-Aza/TSA-Behandlung von Zelllinien

Die Zelllinien HUH6 und HepT3 wurden mit 0,5  $\mu\text{M}$  5-Aza und 0,1  $\mu\text{M}$  Trichostatin A (TSA), Sigma-Aldrich (Steinheim) behandelt und die Zelllinien HepT1 und HepG2 konnten mit 1,25  $\mu\text{M}$  5-Aza und 0,5 mM TSA kultiviert werden. Das Medium mit den Demethylierungsagenzien wurde alle 24 h gewechselt. Dabei wurde folgendes Zeitschema eingehalten: Für die 3 d Behandlung wurden die Zellen zunächst für 24 h nur mit 5-Aza behandelt, anschließend für 48 h mit 5-Aza und TSA. Für die 5 d Behandlung wurden die Zellen 72 h nur mit 5-Aza kultiviert, darauf folgten wieder 48 h mit 5-Aza und TSA. Die behandelten Zellen wurden für DNA- und RNA-Isolierung verwendet.

#### 4.14.3. Einfrieren und Auftauen von Zelllinien

Für das Einfrieren der Zellen wurden diese, wie beim Passagieren (4.14.1.) mit Trypsin-EDTA abgelöst und die Reaktion mit Medium/FBS abgestoppt. Anschließend wurde die gesamte Zellsuspension bei 0,2 x g für 4 min zentrifugiert und  $1 \times 10^7$  Zellen/ml in Einfriermedium resuspendiert. Die Zellen wurden für 24 h bei  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  gelagert und anschließend in Flüssigstickstoff überführt.

Zum Auftauen der Zellen wurden die Kryokulturen in  $37\text{ }^\circ\text{C}$  warmes Medium mit 10 % FBS überführt. Nach 24 h wurde das Medium gewechselt.

Einfriermedium: 90 % (v/v) Medium/FBS  
10 % (v/v) DMSO

#### 4.14.4. Transfektion

##### 4.14.4.1. Lipofektion

Die Transfektion eukaryotischer Zellen wurde mit dem liposomalen Transfektionsreagenz *FuGENE 6* von Roche-Diagnostics (Penzberg) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Zelllinien wurden 24 h nach dem Aussäen bei einer Konfluenz von etwa 50 - 60 % transfiziert. Dabei wurde das Transfektionsreagenz im Verhältnis 3:1 gegenüber der Menge an Plasmid-DNA eingesetzt. Es wurden 1  $\mu\text{g}$  / Well Plasmid-DNA in serumfreies Medium für eine 6-Well Platte und 0,05  $\mu\text{g}$  / Well für eine 96-Well Platte eingesetzt. Nach 24 h erfolgte bei den transfizierten Zellen ein Mediumwechsel. Für die Transfektionskontrolle wurde 1  $\mu\text{g}$  bzw. 0,05  $\mu\text{g}$  pEGFP, ClonTech (Mountain View, CA, USA) transfiziert. Die

Transfektionseffizienz wurde nach 24 h mittels Fluoreszenzmikroskopie und Auszählen GFP-positiver Zellen bestimmt.

#### 4.14.4.2. Selektion stabil transfizierter Zellklone

Um stabil transfizierte Zellklone zu erhalten wurden transient transfizierte Zellen vereinzelt und 5000 Zellen pro 6-Well ausgesät. Nach 24 h wurden die Zellen für 14 d unter Selektionsdruck gesetzt. Als Selektionsantibiotika wurde G418 (200 µg/ml) oder Puromycin (1 µg/ml), Sigma-Aldrich (Steinheim) verwendet. Für die Isolierung einzelner Zellklone wurde das Medium entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Jeder Zellklon wurde mit einem *Pyrex® brand cloning cylinder*, Sigma-Aldrich (Steinheim) begrenzt und mit 10 µl Trypsin-EDTA behandelt. Durch die Zugabe von 100 µl Medium mit 10 % FBS wurde die Reaktion abgestoppt. Anschließend wurde die Zellsuspension in eine 24-Well Platte überführt und auf 300 µl mit Medium aufgefüllt. Die Zellen wurden weiterhin unter Selektion kultiviert und expandiert.

#### 4.14.5. MTT-Assay

Mit dem *Cell Proliferation Kit I (MTT)* von Roche-Diagnostics (Mannheim) wurden Proliferations- bzw. Vitalitätsraten der Zelllinien nach Angaben des Herstellers bestimmt. Die vitalen Zellen verstoffwechseln das gelbe Tetrazoliumsalz 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) zu einem blauen Formazanfarbstoff. Die metabolische Aktivität der Zellen korreliert mit der Intensität der Blaufärbung. Für den Assay wurden 2000 - 5000 Zellen pro Well (100 µl Medium) in eine 96-Well Platte ausgesät. Nach 24 h wurde mit der Behandlung der Zellen begonnen und ebenfalls der Zeitpunkt 0 h mittels MTT festgelegt. Dazu wurden 10 µl *MTT labeling reagent* zu den Zellen gegeben und die Reaktion 4 h später mit 100 µl *Solubilization solution* abgestoppt, indem die Zellen lysiert werden. Nach der Zugabe der Agenzien wurde die Absorption durch eine photometrische Messung bei 595 nm im *Tecan GENios Microplatereader* (Crailsheim) gemessen. Die Messungen erfolgten alle 24 h bei einer Versuchsgesamtdauer von 96 - 120 h.

#### 4.14.6. Colony Formation Assay

Mit dem Colony Formation Assay wurden stabil transfizierte Zellen auf ihr Langzeitüberleben untersucht. Es wurden 5000 Zellen pro 6-Well ausgesät und unter Selektionsmedium kultiviert. Als Selektionsantibiotika wurde G418 (200 µg/ml) oder Puromycin (1 µg/ml) verwendet. Nach 14 d wurden die Zellkolonien mit Crystal Violet gefärbt. Dafür wurde das

Medium entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden 2 x 5 min mit 2 ml Methanol fixiert und anschließend getrocknet. Mit 2 ml Crystal Violet wurden die Zellen für 5 min gefärbt, hinterher mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen und getrocknet. Für die Dokumentation wurden die Zellkolonien fotografiert und ausgezählt.

Crystal Violet:      20 % (v/v) Methanol  
                             0,5 % (v/v) Crystal Violet

#### 4.14.7. TOP/FOP-Flash-Promoter Assay

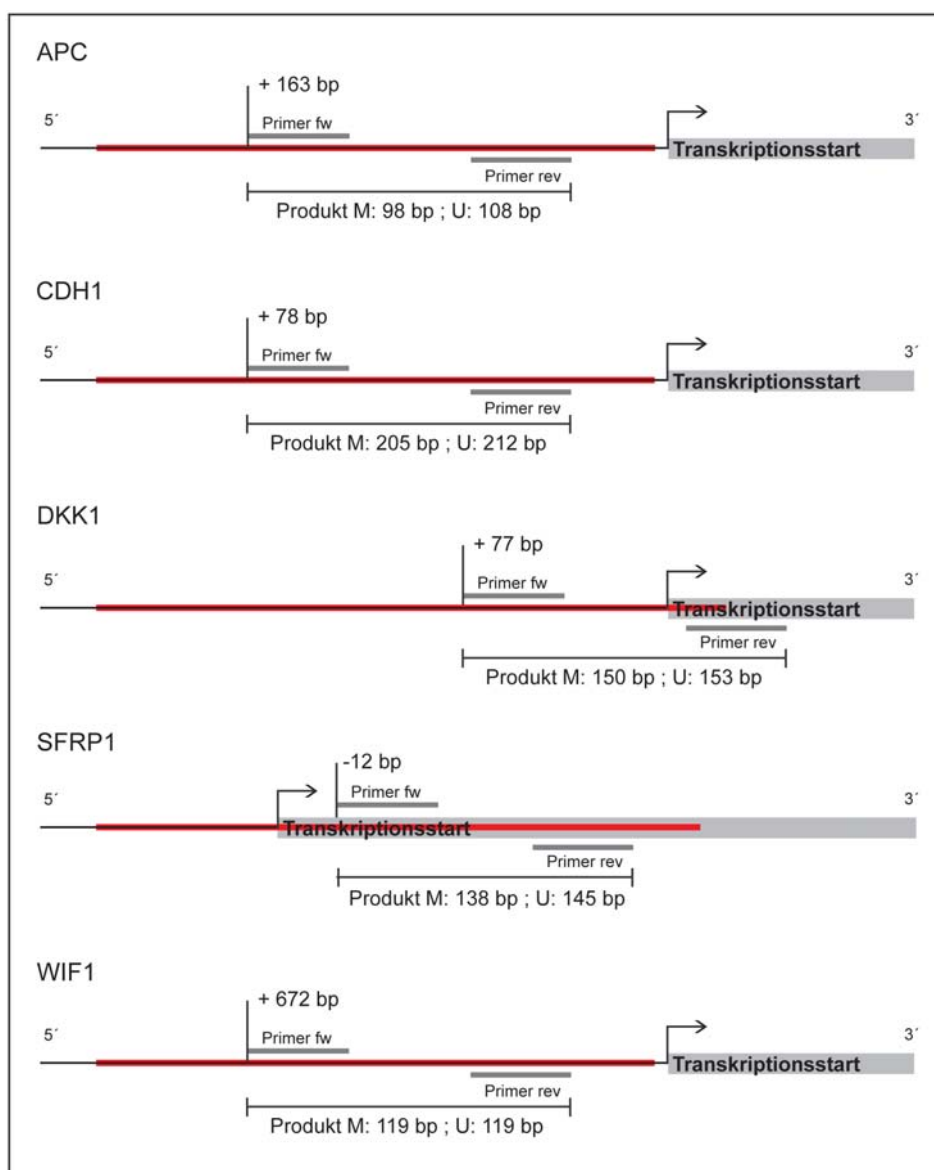
Mit Hilfe des TOP/FOP-Flash-Promoter Assay kann die Aktivität des kanonischen Wnt-Signalweges getestet werden. Dazu wird ein Reporterplasmid (pTOP) transfiziert, welches mehrere TCF-Bindestellen trägt. Als Kontrolle dient die Transfektion mit dem Reporterplasmid pFOP, welches mutierte TCF-Bindestellen enthält. Ist der Wnt-Signalweg aktiv, bindet  $\beta$ -Catenin an den Transkriptionsfaktor TCF und es erfolgt die Expression des *Firefly*-Luciferase Reportergens. Als Transfektionskontrolle dient das Plasmid pRL-TK, das ein *Renilla*-Luciferase Reportergen besitzt. Es wurden 10<sup>5</sup> Zellen pro 12-Well ausgesät. Nach 24 h wurden die Zellen mit pTOP und pRL-TK oder pFOP und pRL-TK mit dem Transfektionsreagenz *FuGENE 6* von Roche-Diagnostics (Penzberg) nach Angaben des Herstellers transfiziert (4.14.4.1.). Die Messung der Luciferaseaktivität erfolgte 48 h später mit dem *Dual-Glo<sup>TM</sup> Luciferase Assay System* von Promega (Mannheim) und wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Hierzu wurde von den Zellen das Medium entfernt und 100  $\mu$ l neues Medium zugegeben. Anschließend erfolgte die Zugabe von 100  $\mu$ l *Dual-Glo<sup>TM</sup> Luciferase Reagent*. Die Reaktion wurde gemischt und nach 10 min Inkubation wurden 180  $\mu$ l der Zellsuspension in eine weiße 96-Well Platte überführt. Mit dem *GENios Microplatereader*, Tecan (Crailsheim) wurde zunächst die Lumineszenz der *Firefly*-Luciferase bestimmt. Durch die anschließende Zugabe von 100  $\mu$ l *Dual-Glo<sup>TM</sup> Stop & Glo<sup>®</sup> Reagent* wurde die *Firefly*-Luciferase Aktivität inhibiert und nach 10 min Inkubation wurde die Lumineszenz der *Renilla*-Luciferase Reaktion ebenfalls mit dem *GENios Microplatereader* gemessen.

## 5. Ergebnisse

### 5.1. Wnt-Signalweg

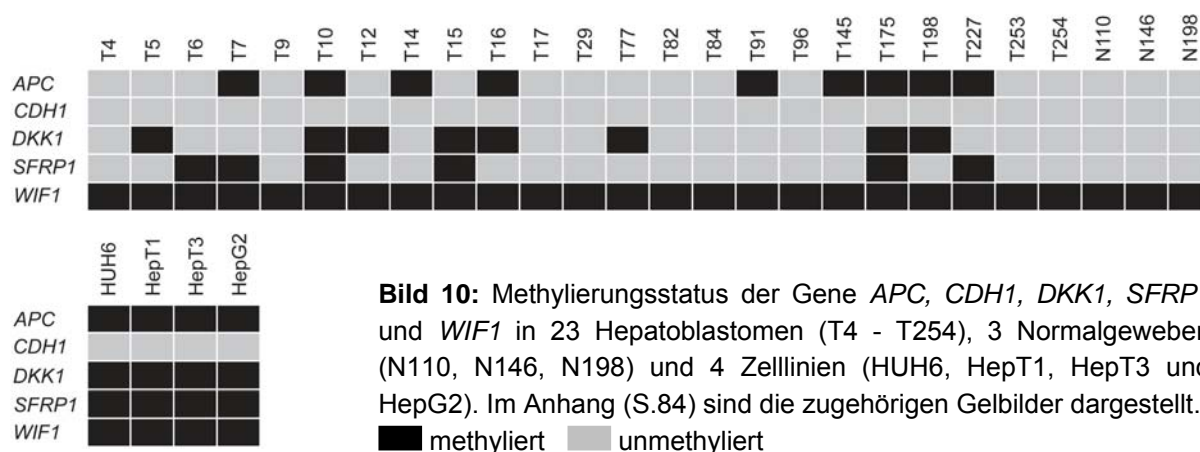
#### 5.1.1. Methylspezifische PCR

Aus dem Wnt-Signalweg wurden die Gene *APC*, *CDH1*, *DKK1*, *SFRP1* und *WIF1* auf ihren Methylierungszustand in 23 Hepatoblastomen, drei normalen Lebern, in den Hepatoblastomzelllinien HUH6, HepT1, HepT3 und in der hepatozellulären Karzinom-Zelllinie HepG2 mit Hilfe der MSP (4.9.1.) untersucht.



**Bild 9:** Übersicht der CpG Inseln und MSP Primerbindungsstellen in den Promoterregionen der Gene *APC*, *CDH1*, *DKK1*, *SFRP1* und *WIF1*. M: methyliert, U: unmethyliert (+) upstream oder (-) downstream vom Transkriptionsstart, █ CpG Insel

Bei der Überprüfung des Methylierungsstatus von *APC* deckten die *Forward*-Primer einen Bereich von drei CpGs und die *Reverse*-Primer einen Bereich von vier CpGs ab. Es konnte in der Region 163 bp upstream vom Transkriptionsstart (Bild 9) für 9/23 Tumore eine Methylierung festgestellt werden. Ebenfalls waren alle vier Zelllinien methyliert (Bild 10). Die Normalgewebe N110, N146 und N198 zeigten keine Methylierung.



Für *CDH1* konnte keine Methylierung in den Geweben und auch nicht in den Zelllinien gezeigt werden (Bild 10). Die Primer deckten zwei bzw. drei CpGs in der Region 78 bp upstream vom Transkriptionsstart ab (Bild 9).

Bei 8/23 Tumoren wurde für *DKK1* eine Methylierung in der Promoterregion gefunden. Die drei Normalgewebe waren unmethyliert. Bei allen vier Zelllinien konnte ebenfalls eine Methylierung gezeigt werden (Bild 10). Dabei wurde eine Region 77 bp upstream vom Transkriptionsstart untersucht (Bild 9). Jeweils drei CpGs pro Primer wurden in der MSP überprüft.

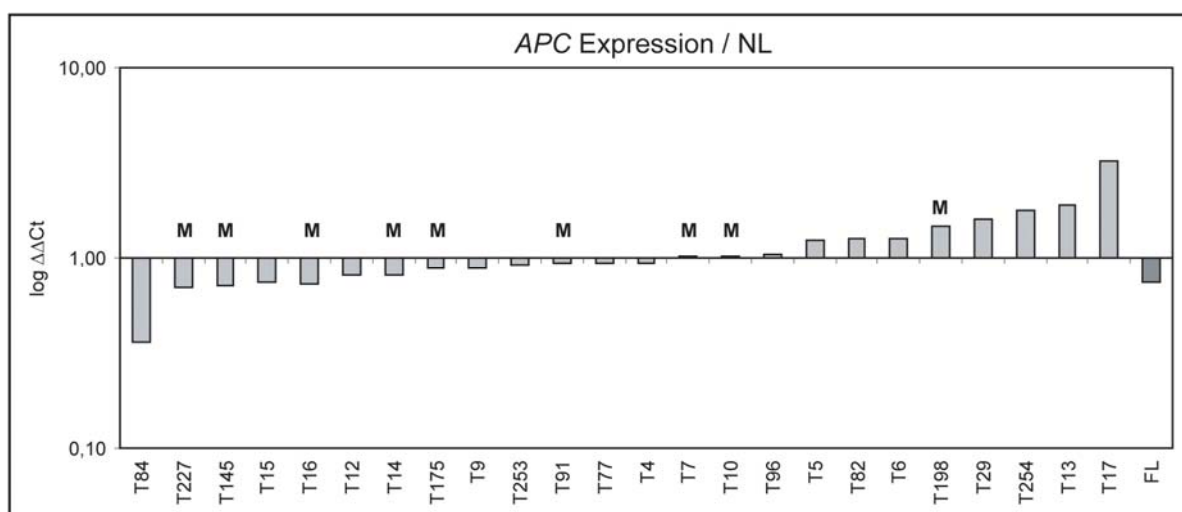
Für *SFRP1* wurde eine Region 12 bp downstream vom Transkriptionsstart untersucht (Bild 9). 6/23 Tumore waren positiv in ihrem Methylierungsstatus, ebenso alle vier Zelllinien. Die drei Normalgewebe waren unmethyliert (Bild 10). Der *Forward*-Primer deckte einen Bereich von drei CpGs ab, der *Reverse*-Primer einen Bereich von vier CpGs.

Bei *WIF1* konnte für alle Tumore, für die Zelllinien und auch für die Normalgewebe eine Methylierung nachgewiesen werden (Bild 10). Die Primer deckten jeweils drei CpGs in der Region 672 bp upstream vom Transkriptionsstart ab (Bild 9). Die Normalgewebe N110, N146 und N198 lagen ebenfalls methyliert vor.

### 5.1.2. Expression der MSP-Kandidatengene

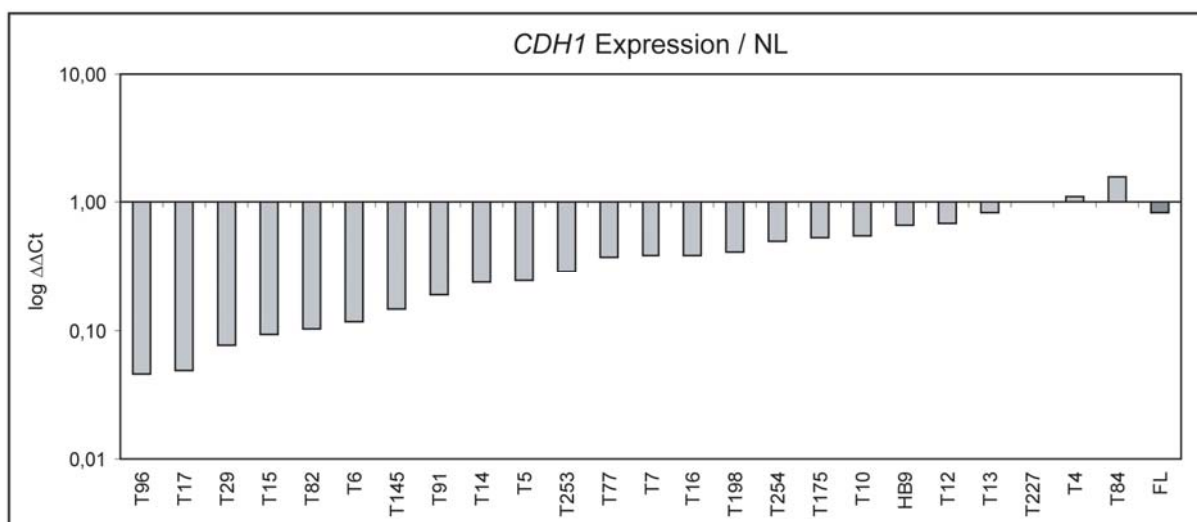
Um den Zusammenhang zwischen Methylierung und Expression zu untersuchen wurde für die Gene *APC*, *CDH1*, *DKK1*, *SFRP1* und *WIF1* in allen Geweben und Zelllinien eine Q-PCR (4.9.2) durchgeführt.

Hierzu wurde die Genexpression in 24 Hepatoblastomen, in 7 normalen Lebern und in einer fetalen Leber (Stratagene, La Jolla, CA, USA; 20. Gestationswoche) untersucht. Dabei wurden relative Expressionslevel bestimmt, in dem die Expression jedes Tumors oder jeder Zelllinie mit dem Mittelwert (MW) der Normallebern (N110, N146, N175, N198, N227, N253 und N254) verglichen wurde. Bei einem Wert  $< 1$  bedeutet dies eine transkriptionelle Runterregulation des Gens, bei einem Wert  $> 1$  findet eine Überexpression im Vergleich zu Normalgewebe statt.



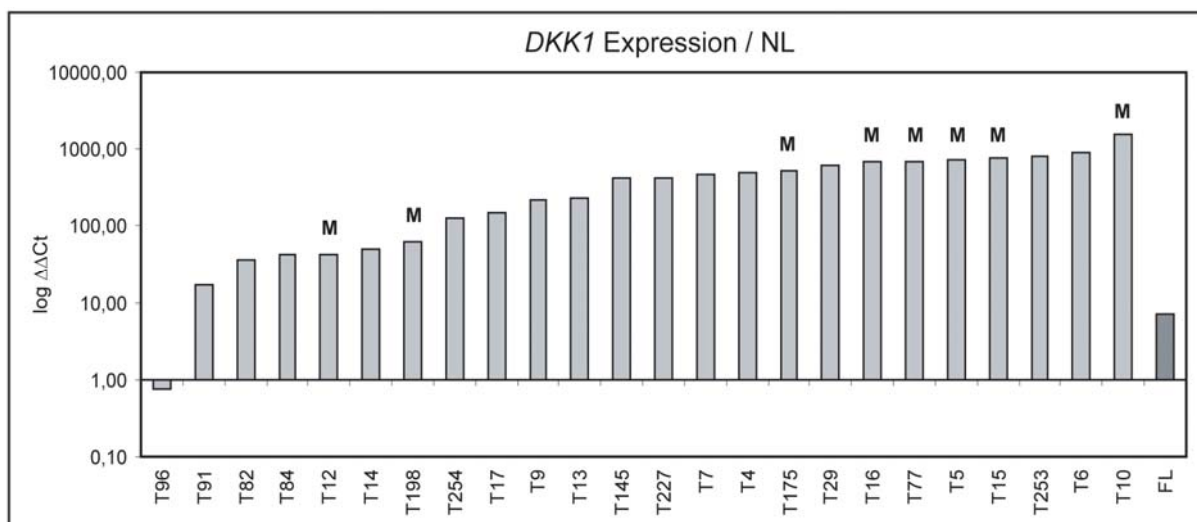
**Bild 11a:** Die Genexpression von *APC* in den Geweben T4-T254 und fetaler Leber (FL) wurden mit der Expression in Normalleber (NL) verglichen. M: Methyliert

Bei dem Gen *APC* sind 13/24 Tumore im Vergleich zu Normalgewebe runterreguliert. Die geringste Expression von 0,36 zeigte dabei T84. Eine Überexpression um das dreifache (3,2) liegt bei T17 vor. Die fetale Leber ist mit 0,75 geringfügig runterreguliert. Von den 13 Tumoren mit verringerter Expression liegen 6 Tumore (T14, T16, T91, T145, T175 und T227) methyliert vor. Somit zeigen 46 % der Tumoren mit verminderter *APC* Expression eine Methylierung in der untersuchten *APC* Promoterregion. Allerdings sind auch drei Tumore (T7, T10, T198) methyliert, in denen *APC* im Vergleich zu Normalleber hoch reguliert ist (Bild 11a). Daher konnte ein eindeutiger Zusammenhang zwischen Methylierung und verringerter Expression beim *APC* Gen nicht nachgewiesen werden.



**Bild 11b:** Die Genexpression von *CDH1* in den Geweben T4-T254 und fetaler Leber (FL) wurden mit der Expression in Normalleber (NL) verglichen.

In 21/24 Hepatoblastomen und auch in der fetalen Leber ist *CDH1* im Vergleich zum Normalgewebe runterreguliert (Bild 11b). Dabei zeigte T96 mit 0,04 die niedrigste Expression. T4 und T84 lagen mit 1,1 und 1,6 sehr gering über dem Expressionsniveau von *CDH1* in der normalen Leber. Jedoch war kein einziger Tumor in dem untersuchten Bereich methyliert.

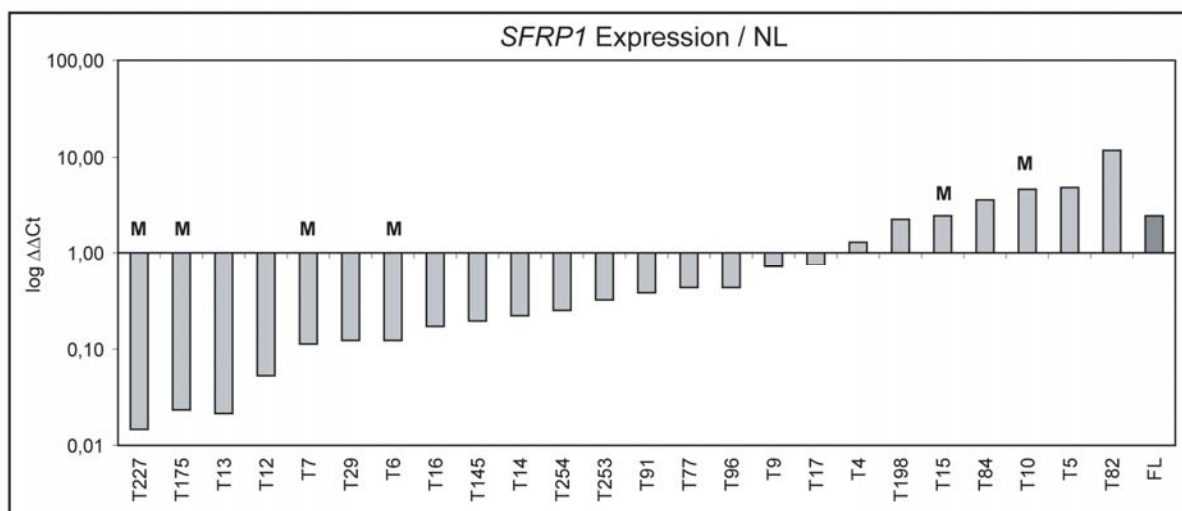


**Bild 11c:** Die Genexpression von *DKK1* in den Geweben T4-T254 und fetaler Leber (FL) wurden mit der Expression in Normalleber (NL) verglichen. M: Methyliert

Bei *DKK1* ist deutlich zu erkennen, dass das Gen in den Tumoren und auch in der fetalen Leber stark überexprimiert vorliegt (Bild 11c). Bis auf T96 (0,76) zeigten alle Tumore eine erhöhte Expression (bis zu 1580-fach bei T10) im Vergleich zum Normalgewebe. Davon sind 8/24 Tumore methyliert, jedoch ist kein Unterschied zu den unmethylierten Tumoren in der

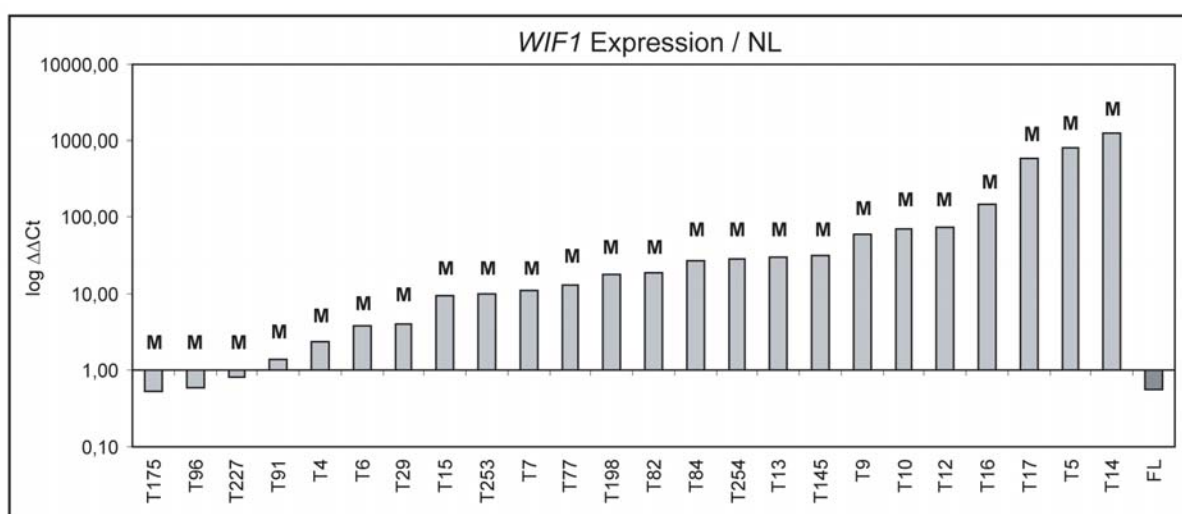


Genexpression zu erkennen. Eine verminderte Expression aufgrund von Methylierungen im Promoterbereich von *DKK1* konnte nicht nachgewiesen werden.



**Bild 11d:** Die Genexpression von *SFRP1* in den Geweben T4-T254 und fetaler Leber (FL) wurden mit der Expression in Normalleber (NL) verglichen. M: Methyliert

Die Ergebnisse der Expressionsanalyse von *SFRP1* zeigten, dass 17/24 Tumore eine verminderte *SFRP1* Genexpression besaßen (Bild 11d). Der Bereich der verringerten Expression lag zwischen 0,01 für T227 und 0,75 für T17. Von diesen 17 Hepatoblastomen waren T6, T7, T175 und T227 methyliert. Eine Überexpression im Vergleich zum Normalgewebe konnte bei 7/24 Tumoren und auch bei der fetalen Leber nachgewiesen werden. Von den 7 Tumoren mit erhöhter Expression sind zwei (T5 und T15) methyliert. Da 24 % der Tumore mit verminderter *SFRP1* Expression methyliert waren, könnte dies ein Hinweis auf eine epigenetische Repression des Gens sein.

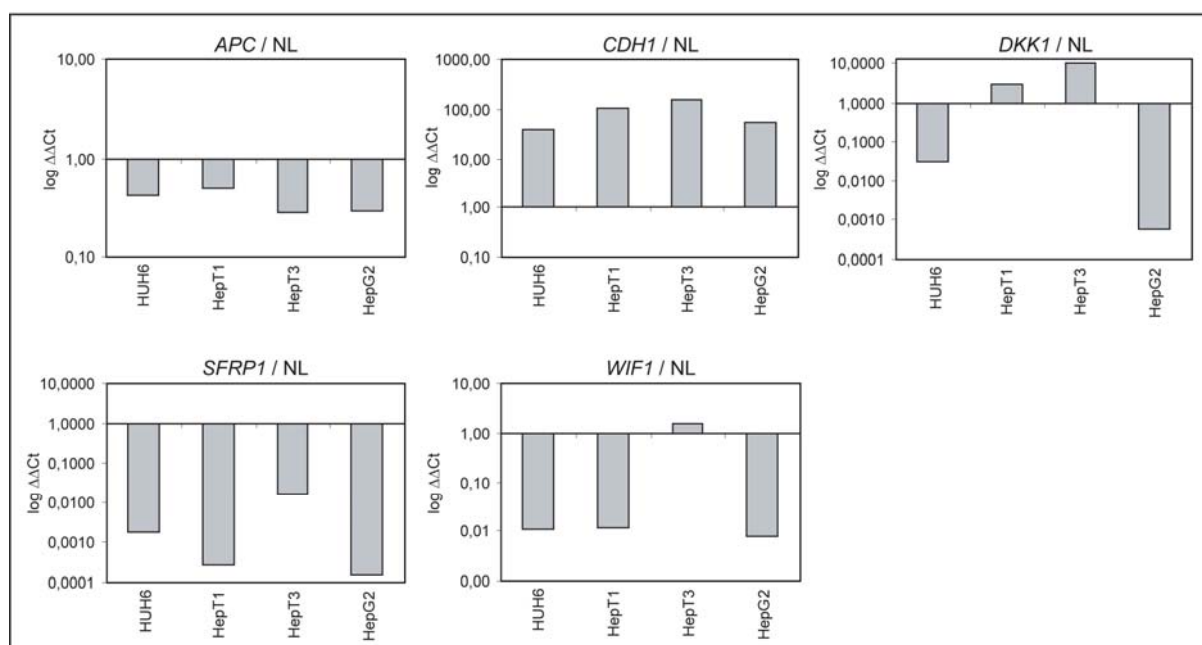


**Bild 11e:** Die Genexpression von *WIF1* in den Geweben T4-T254 und fetaler Leber (FL) wurde mit der Expression in Normalleber (NL) verglichen. M: Methyliert

Das Gen *WIF1* ist in 21/24 Hepatoblastomen überexprimiert (Bild 11e). Die höchste relative Expression im Vergleich zum Normalgewebe konnte bei T14 (1250-fach) festgestellt werden. Drei Tumore (T175, T96, T227) und die fetale Leber zeigten eine verringerte Expression von 0,52 - 0,78. Bei allen Tumoren wurde eine Methylierung nachgewiesen, jedoch lagen auch die drei untersuchten Normalgewebe methyliert vor. Es gab keinen Zusammenhang zwischen verminderter Expression und Methylierung.

### 5.1.2.1. Expression in den Zelllinien

Die Hepatoblastomzelllinien HUH6, HepT1, HepT3 und die hepatozelluläre Karzinom-Zelllinie HepG2 wurden ebenfalls in ihrer Expression der Kandidatengene untersucht und mit dem Mittelwert aus den Normalgeweben verglichen.



**Bild 12:** *APC*, *CDH1*, *DKK1*, *SFRP1* und *WIF1* Expression in den Zelllinien HUH6, HepT1, HepT3 und HepG2 im Vergleich zu normaler Leber (NL).

Die Gene *APC* und *SFRP1* waren in allen vier Zelllinien gegenüber Normalleber runterreguliert (Bild 12). Dabei zeigte *APC* die geringste Expression von 0,28 in HepT3 und 0,29 in HepG2. Die Runterregulation von *SFRP1* war in HepT1 und HepG2 mit 0,0002 und 0,0003 am deutlichsten. In allen vier Zelllinien konnte im Promoterbereich von *APC* und *SFRP1* eine Methylierung nachgewiesen werden (Bild10). Wenn man die Expressionslevel von *APC* und *SFRP1* der Hepatoblastome heranzieht, zeigte sich eine Übereinstimmung der verminderten Expression sowohl in den Zelllinien als auch in den Tumoren. Ob Methylierungen für die verminderte Expression von *APC* und *SFRP1* in den Zelllinien verantwortlich sind, wurde in weiteren Versuchen geklärt.

Bei *CDH1* waren alle vier Zelllinien im Vergleich zum Normalgewebe hochreguliert (Bild 12). Mit einer Überexpression um das 38- bis 154-fache standen die Zelllinien im deutlichen Gegensatz zu den Tumoren, da diese eine verminderte Expression in 21/24 Fällen zeigten. Eine Methylierung der *CDH1* Promoterregion konnte für alle vier Zelllinien, als auch für die Tumore nicht nachgewiesen werden.

In den Zelllinien HUH6 und HepG2 war *DKK1* um 0,03 und 0,0006 runterreguliert. In HepT1 und HepT3 zeigte *DKK1* gegenüber normaler Leber eine erhöhte Expression um 2,9 und 9,9 (Bild 12). Jedoch konnte bei allen vier Zelllinien eine Methylierung in der untersuchten Promoterregion nachgewiesen werden. Bei den Hepatoblastomen lagen hingegen fast alle Primärtumore deutlich überexprimiert vor.

Bei *WIF1* war in den drei Zelllinien HUH6, HepT1 und HepG2 eine deutlich verringerte Expression von 0,01 gegenüber normaler Leber zu erkennen. Nur HepT3 lag mit 1,6 leicht über dem normalen Expressionsniveau (Bild 12). Bei allen vier Zelllinien wurde eine Methylierung nachgewiesen. Im Gegensatz zu den Zelllinien war in 21/24 Tumoren eine erhöhte Expression von *WIF1* festzustellen, obwohl alle 24 Tumore methyliert vorlagen.

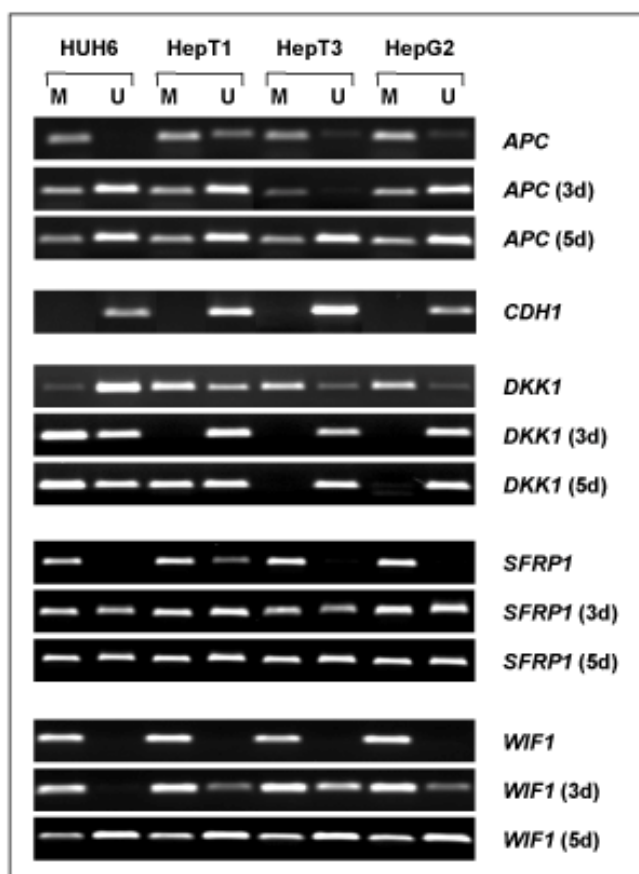
Ob bei den Zelllinien ein Zusammenhang zwischen Methylierung, Expression und Zellwachstum besteht, wurde in den folgenden Versuchen untersucht.

### 5.1.3. Behandlung der Zelllinien mit Demethylierungsagenzien

Die Hepatoblastomzelllinien HUH6, HepT1, HepT3 und die hepatozelluläre Karzinom-Zelllinie HepG2 wurden mit 5-Aza-2'-deoxycytidine (5-Aza) und Trichostatin A (TSA) behandelt (4.14.2.). Beide Agenzien bewirken durch Demethylierung der DNA und Inhibierung der Histondeacetylasen eine Konformationsänderung der DNA und damit die Reaktivierung der Genexpression.

Nach drei Tagen (3 d) und fünf Tagen (5 d) wurden die Zelllinien geerntet und die DNA und RNA isoliert (4.1. und 4.6.). Anschließend konnten die Gene *APC*, *CDH1*, *DKK1*, *SFRP1* und *WIF1* auf ihren Methylierungsstatus mittels MSP (4.9.1.) untersucht werden. Ebenfalls wurde mit Hilfe der Q-PCR (4.9.2.) die Expression der Gene bestimmt und behandelte Zellen mit unbehandelten Zellen verglichen.

Für *APC* konnte in allen vier Zelllinien eine Methylierung nachgewiesen werden. Bei den unbehandelten Zellen zeigte HUH6 eine vollständige Methylierung. HepT1, HepT3 und HepG2 waren dagegen partiell methyliert. Es war sowohl eine Bande beim methylierten als auch beim unmethylierten Zustand erkennbar (Bild 13).



**Bild 13:** MSP der Gene *APC*, *CDH1*, *DKK1*, *SFRP1* und *WIF1*. Untersucht wurden die Zelllinien HUH6, HepT1, HepT3 und HepG2 unbehandelt, 3 d und 5 d 5-Aza/TSA behandelt.

Nach 3 d und 5 d 5-Aza/TSA-Behandlung war für *APC* deutlich zu sehen (Bild 13), dass die DNA-Banden für den unmethylierten Zustand zugenommen haben.

Das Gen *CDH1* lag in allen vier Zelllinien unmethyliert vor (Bild 13). Eine Untersuchung des Methylierungszustandes nach 5-Aza/TSA-Behandlung wurde daher nicht durchgeführt.

In allen vier Zelllinien war *DKK1* methyliert. Die MSP zeigte bei den Zelllinien HepT3 und HepG2 eine vollständige Demethylierung nach 3 d und 5 d 5-Aza/TSA-Behandlung im untersuchten Promoterbereich von *DKK1*. Bei HUH6 und HepT1 blieben beide Methylierungszustände erhalten (Bild 13).

Bei *SFRP1* waren alle vier Zelllinien methyliert. HUH6, HepT3 und HepG2 waren vollständig methyliert und zeigten keine DNA-Bande für den unmethylierten Zustand. Nach 3 d und 5 d 5-Aza/TSA-Behandlung ist deutlich zu erkennen, dass der Promoterbereich von *SFRP1* in allen vier Zelllinien demethyliert vorlag (Bild 13).

Für *WIF1* wurde in allen vier Zelllinien ausschließlich der methylierte Zustand nachgewiesen. Durch die anschließende 5-Aza/TSA-Behandlung konnte für alle Zelllinien nach 3 d und 5 d eine Demethylierung des Promoterbereiches gezeigt werden (Bild 13).

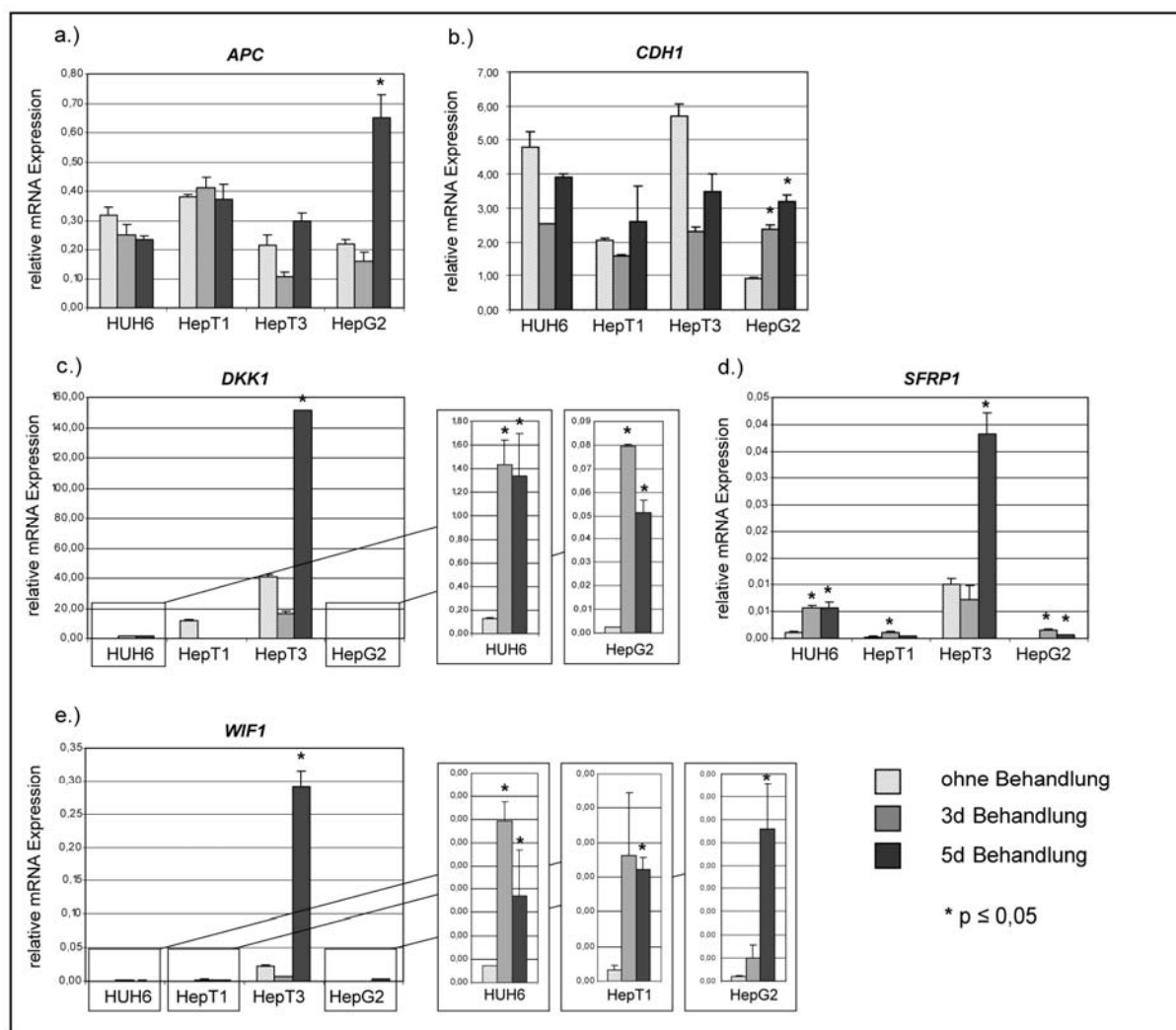
### 5.1.3.1. Expression der Kandidatengene nach 5-Aza/TSA-Behandlung

Entsprechend dem Nachweis der Demethylierung der untersuchten Promoterregionen durch die 5-Aza/TSA-Behandlung wurde mittels Q-PCR (4.9.2.) anschließend die Expression der Kandidatengene untersucht. Alle Reaktionen wurden in Dubletten durchgeführt und auf das Haushaltsgen *TBP* normiert. Verglichen wurden die *TBP*-normierten Werte der Zelllinien ohne Behandlung, 3 d und 5 d 5-Aza/TSA-Behandlung.

Zwar konnte bei *APC* für alle Zelllinien eine Demethylierung der untersuchten Promoterregion nach Kultivierung mit 5-Aza/TSA nachgewiesen werden, es zeigte sich jedoch bei der Q-PCR nur für HepG2 ein signifikanter Anstieg in der Expression nach 5 d 5-Aza/TSA-Behandlung. Eine erhöhte *APC* Expression in den Zelllinien HUH6, HepT1 und HepT3 wurde nicht festgestellt (Bild 14a).

Da alle vier Zelllinien nicht *CDH1* methyliert waren, war auch kein Anstieg in der Expression zu erwarten. Dies konnte bei HUH6, HepT1 und HepT3 bestätigt werden. Bei HepG2 wurde allerdings eine Reexpression von *CDH1* nach 3 d und 5 d 5-Aza/TSA-Behandlung beobachtet, obwohl keine Methylierung mittels MSP nachgewiesen werden konnte (Bild 14b).

Bei *DKK1* konnte in der MSP gezeigt werden, dass alle vier Zelllinien methyliert waren und nach der Behandlung mit 5-Aza/TSA eine Demethylierung stattfand. Dementsprechend erhöhte sich nach 3 d 5-Aza/TSA-Behandlung die Expression signifikant in den Zelllinien HUH6 und HepG2. Nach 5 d zeigte ebenfalls HepT3 einen signifikanten Anstieg der Genexpression. Nur bei HepT1 konnte auch nach 5 d 5-Aza/TSA-Behandlung keine Reaktivierung von *DKK1* mittels Q-PCR nachgewiesen werden (Bild 14c).



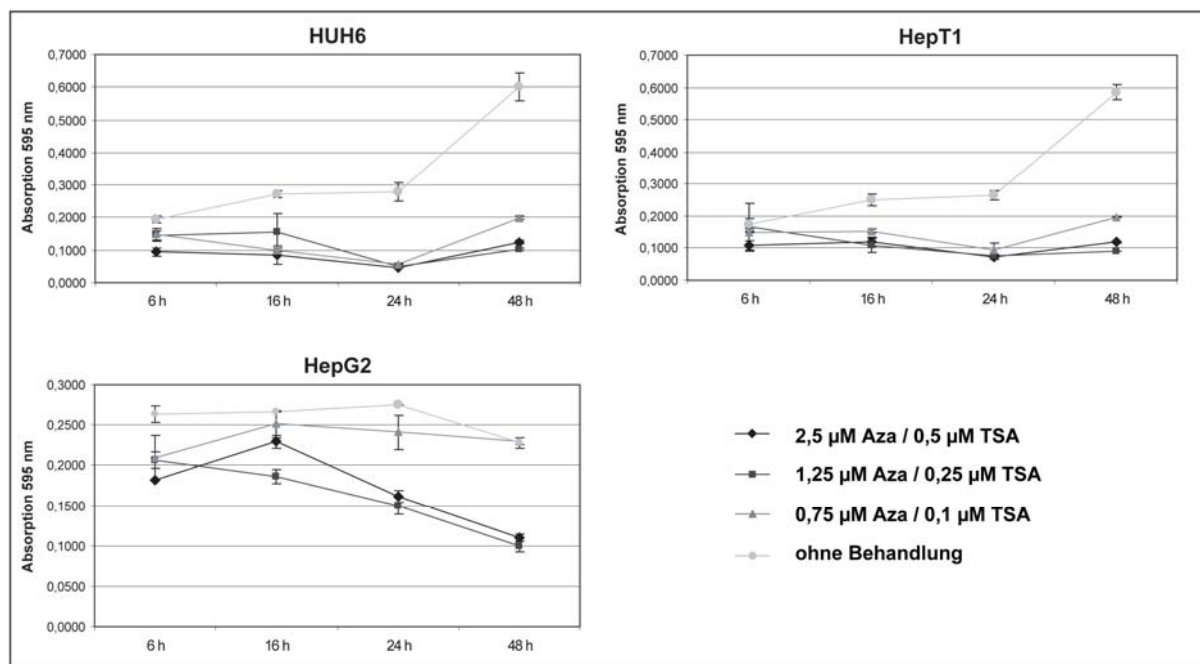
**Bild 14:** Bestimmung der Genexpression von *APC* (a), *CDH1* (b) *DKK1* (c), *SFRP1* (d) und *WIF1* (e) in den Zelllinien HUH6, HepT1, HepT3 und HepG2, ohne Behandlung, 3 d und 5 d Behandlung der Zellen mit 5-Aza/TSA. \* Signifikante Erhöhung der Expression im Vergleich zu unbehandelten Zellen ( $p \leq 0,05$ ).

Nach der Kultivierung der Zelllinien mit 5-Aza/TSA wurde ebenfalls eine Reaktivierung der Expression bei *SFRP1* beobachtet. Alle vier Zelllinien wurden durch die Behandlung demethyliert und nach 3 d stieg die Expression in HUH6, HepT1 und HepG2 signifikant an. Eine ebenfalls signifikante Erhöhung zeigten die Zelllinien HUH6, HepT3 und HepG2 nach 5 d 5-Aza/TSA-Behandlung (Bild 14d).

In der MSP wurde für alle vier Zelllinien eine *WIF1* Methylierung und nach Kultivierung mit 5-Aza/TSA eine Demethylierung festgestellt. Nach 3 d 5-Aza/TSA-Behandlung konnte eine signifikant erhöhte Expression in HUH6 und nach 5 d in allen vier Zelllinien beobachtet werden (Bild 14e).

### 5.1.3.2. Vitalitätstest nach 5-Aza/TSA-Behandlung

Die Zelllinien HUH6, HepT1 und HepG2 wurden für 48 h mit unterschiedlichen Konzentrationen 5-Aza und TSA behandelt (4.14.2.). Mit dem MTT-Assay (4.14.5.) wurde an vier Zeitpunkten (6, 16, 24 und 48 h) die Menge vitaler Zellen bestimmt und anschließend Proliferationskurven erstellt.



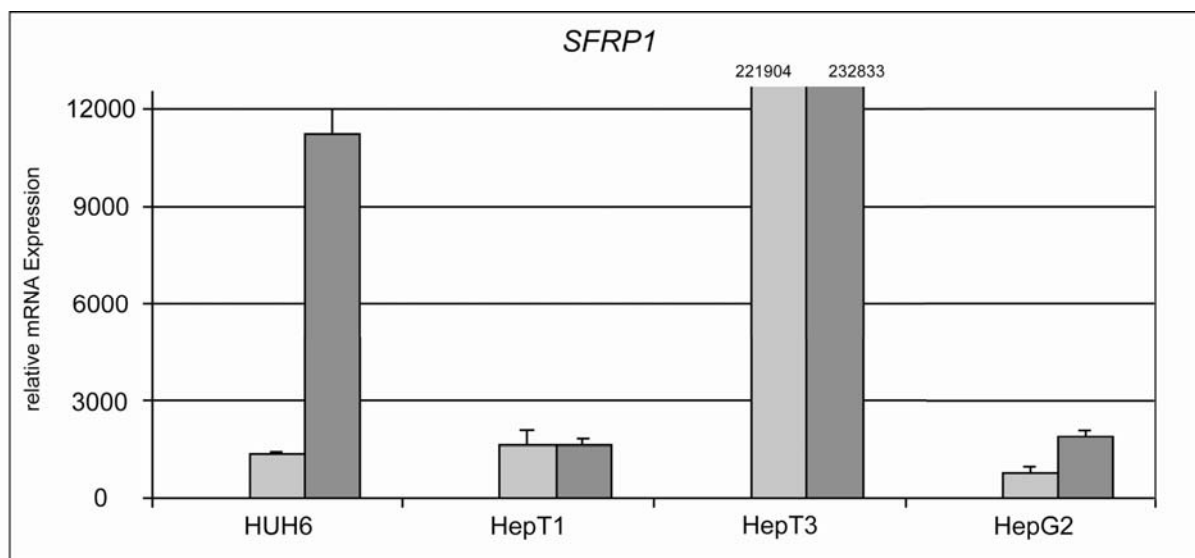
**Bild 15:** Proliferationskurven der Zelllinien HUH6, HepT1 und HepG2 bei unterschiedlichen 5-Aza/TSA Konzentrationen bzw. ohne Behandlung über einen Zeitraum von 48 h. Dargestellt ist der Mittelwert und die Standardabweichung aus zwei Messungen.

In allen drei Zelllinien ist deutlich zu erkennen, dass die Zellen im Gegensatz zu den unbehandelten Zellen keine Proliferation zeigten (Bild 15). Bei HUH6 und HepT1 unterschieden sich die drei Proliferationskurven für die verschiedenen Konzentrationen an 5-Aza/TSA nur sehr gering. Bei HepG2 ist die Proliferationskurve für die geringste Konzentration an 5-Aza/TSA ähnlich der Kurve ohne Behandlung. Eine eingeschränkte Vitalität der Zellen war erst bei einer höheren Konzentration zu sehen.

### 5.1.4. Überexpression des Inhibitors SFRP1

Nach der 5-Aza/TSA-Behandlung (4.14.2.) und der anschließenden Überprüfung der Expression der Kandidatengene des Wnt-Signalweges konnte bei *SFRP1* in allen vier Zelllinien ein signifikanter Anstieg der Expression gezeigt werden. Ebenso wurde gezeigt, dass die Zellen nach 5-Aza/TSA-Behandlung eine eingeschränkte Vitalität aufwiesen. In diesem Versuch sollte hinterfragt werden, ob dies von einer erhöhten *SFRP1* Expression abhängig ist.

Dazu wurden zunächst HUH6, HepT1, HepT3 und HepG2 transient mit pcDNA3.1/V5-His\_SFRP1 (pSFRP1) und dem Leervektor pcDNA3.1/V5-His (pcDNA3.1) transfiziert (4.14.4.1.). Nach 48 und 72 h wurde RNA isoliert (4.6.) und mit Hilfe der Q-PCR (4.9.2.) die Expression von *SFRP1* bestimmt.



**Bild 16:** Expression von *SFRP1* in HUH6, HepT1, HepT3 und HepG2, 48 und 72h nach pSFRP1-Transfektion □ pcDNA3.1 / 48h □ pSFRP1 / 48h ■ pSFRP1 / 72h

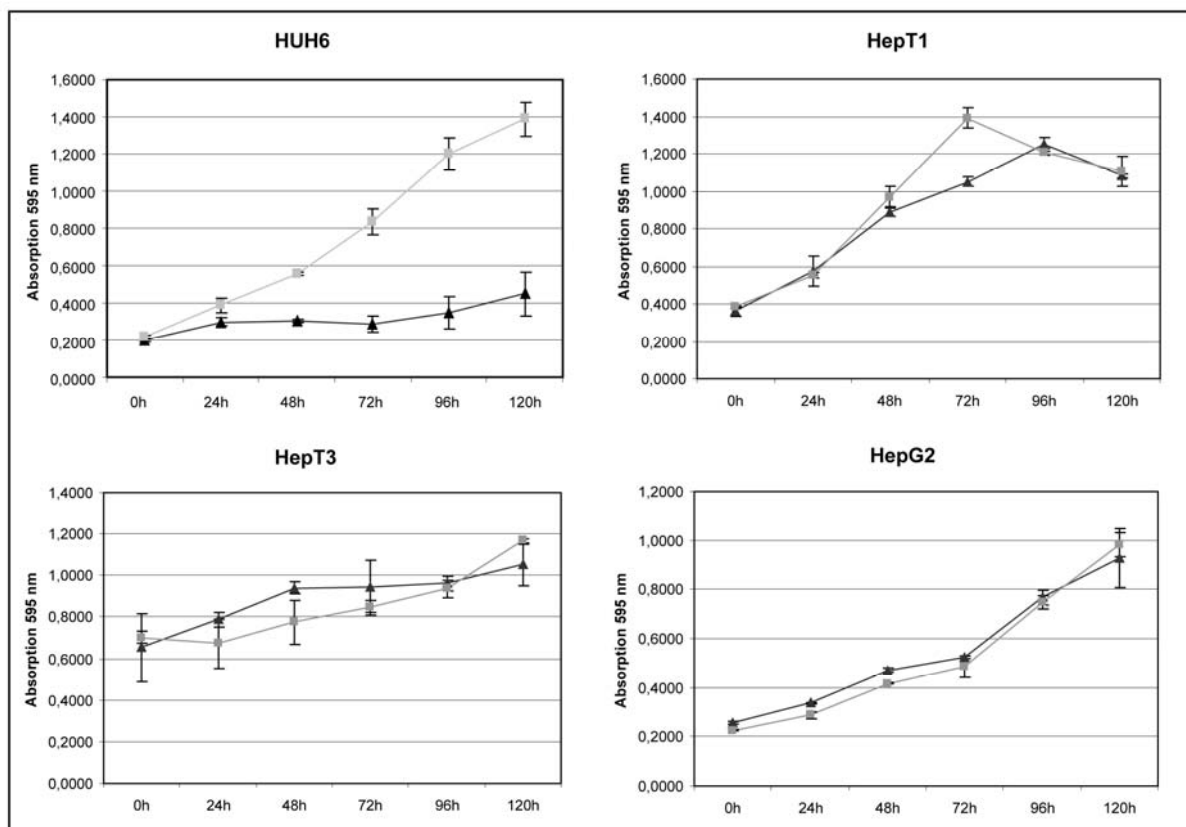
Die mit Leervektor pcDNA3.1 transfizierten Zelllinien zeigen das basale Expressionslevel von *SFRP1*. Dagegen erkennt man 48 und 72 h nach Transfektion eine starke Überexpression von *SFRP1* in den pSFRP1 transfizierten Zelllinien (Bild 16).

#### 5.1.4.1. Vitalitätsmessung nach transienter Transfektion

Nach der Transfektion von pSFRP1 und dem Leervektor pcDNA3.1 wurden die Zellen über einen Zeitraum von 120 h auf ihr Wachstum untersucht. Die Messung der Zellproliferation erfolgte mit dem MTT-Assay (4.14.5.).

Im Wachstumsverhalten zwischen pSFRP1 und Leervektor transfizierten Zellen gab es in den Zelllinien HepT1, HepT3 und HepG2 keinen deutlichen Unterschied zu sehen (Bild 17). Bei den pSFRP1 transfizierten HUH6 Zellen erkennt man jedoch eine niedrigere Vitalitätsrate als bei den pcDNA3.1 transfizierten Zellen. Die Überexpression von *SFRP1* in den HUH6 Zellen hat somit einen deutlichen Einfluss auf deren Proliferation. Um das Wachstumsverhalten über einen längeren Zeitraum zu untersuchen und um sicher zu stellen, dass nur transfizierte Zellen untersucht werden, wurde für die Zelllinie HUH6 pSFRP1 stabil transfizierte Zellen hergestellt (4.14.4.2.).





**Bild 17:** Proliferationskurven nach transienter Transfektion von HUH6, HepT1, HepT3 und HepG2 mit pSFRP1 und dem Leervektor pcDNA3.1 bei einem Zeitverlauf über 120 h.

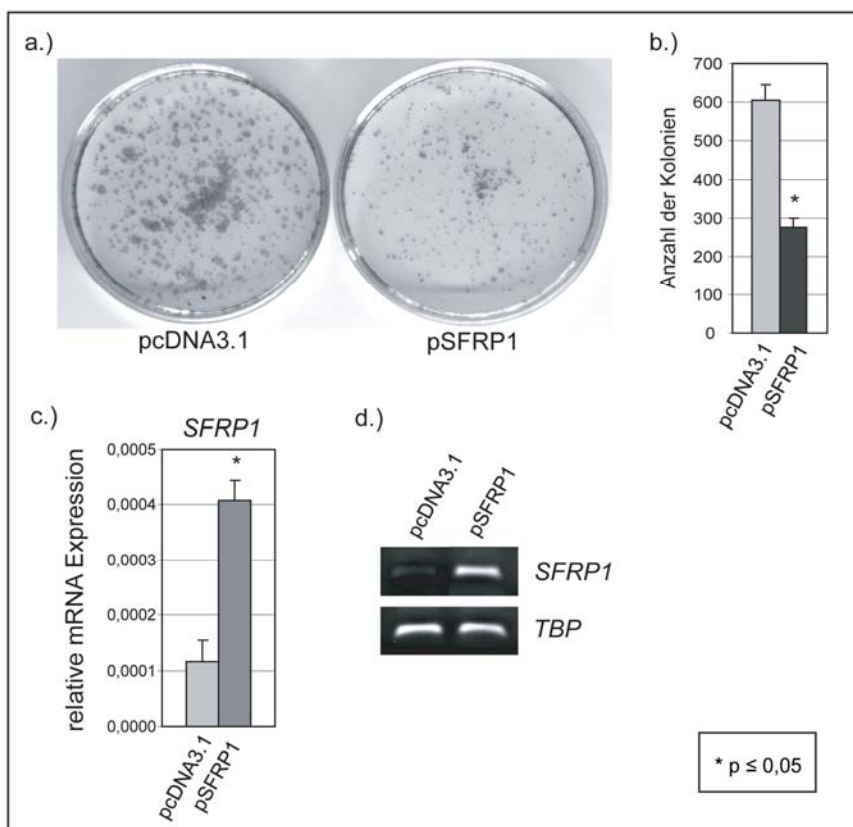
—■— pcDNA3.1 —▲— pSFRP1

#### 5.1.4.2. Expression von *SFRP1* in stabil transfizierten Zellen

Stabil transfizierte HUH6 Zellklone wurden expandiert und deren RNA isoliert (4.6.). Mit Hilfe der anschließenden Q-PCR (4.9.2.) wurde die *SFRP1* Expression der Zellklone bestimmt. Dabei konnte eine vierfache Überexpression in den pSFRP1 stabil transfizierten HUH6 Zellen gegenüber den kontrolltransfizierten pcDNA3.1 Zellen bestimmt werden (Bild 18c, d).

#### 5.1.4.3. Untersuchung der Zellproliferation

Mit dem Colony Formation Assay (4.14.6.) kann das Wachstumsverhalten der Zelllinien über einen längeren Zeitraum untersucht werden. Stabil transfizierte HUH6 und HepG2 Zellen mit pSFRP1 und mit pcDNA3.1 wurden stark vereinzelt (5000 Zellen / Well) und unter Selektionsmedium gehalten, so dass einzelne Zellkolonien entstanden. Diese wurden nach 14 d ausgezählt.



**Bild 18:** (a) Färbung der HUH6 Zellkolonien des Colony Formation Assay, transfiziert mit pcDNA3.1 und pSFRP1; (b) MW der Zellkolonien aus drei Versuchen; (c) relative mRNA Expression bei pcDNA3.1 und pSFRP1 stabil transfizierter HUH6 Zelllinie; (d.) Darstellung der erhöhten *SFRP1* Expression im Agarosegel. \* Signifikante Veränderung ( $p \leq 0,05$ ).

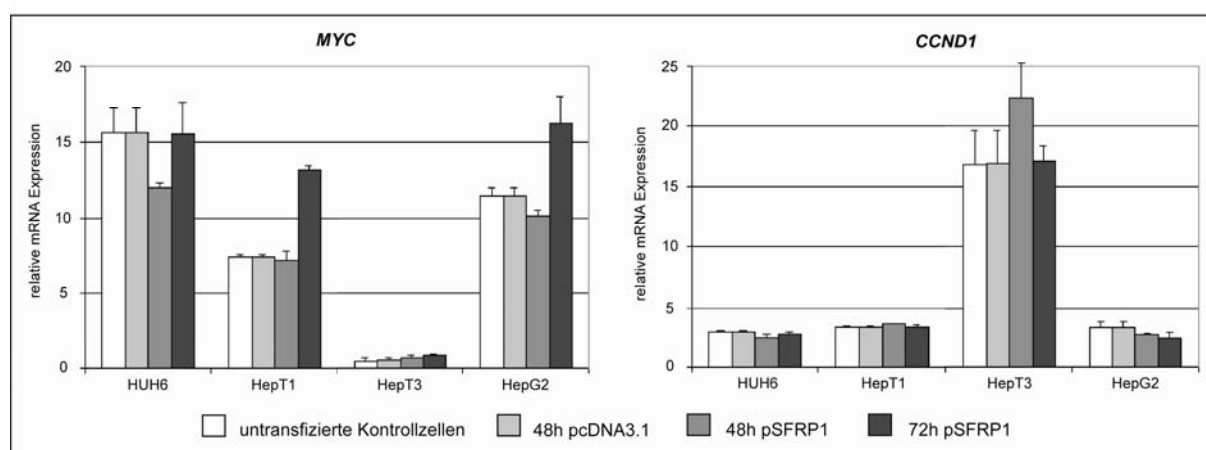
Die Auszählung ergab eine signifikant erniedrigte Anzahl an Kolonien der pSFRP1 stabil transfizierten HUH6 Zellen (Bild 18b). Die Zelllinie HUH6 zeigte ein deutlich verringertes Wachstum bei einer Überexpression von *SFRP1* (Bild 18a).

### 5.1.5. Untersuchung der Aktivität des Signalweges

Durch die bisherigen Ergebnisse stellte sich nun die Frage, ob der Wnt-Signalweg bei der Überexpression von *SFRP1* weiterhin aktiv ist oder ob dieser abgeschaltet wird. Für die Experimente wurden *SFRP1* transient und stabil transfizierte Zellen verwendet.

### 5.1.5.1. Expression der Zielgene

Es wurden zunächst die Zielgene *MYC* (cMyc Protoonkogen) und *CCND1* (Cyclin D1) des Wnt-Signalweges untersucht. Bei Überexpression des Inhibitors *SFRP1* sollte der Signalweg ausgeschaltet und die Zielgene runterreguliert werden. Dafür wurden die Zellen mit pSFRP1 und als Kontrolle mit pcDNA3.1 transfiziert, nach 48 und 72 h die RNA isoliert (4.6.) und die Expression von *MYC* und *CCND1* mittels Q-PCR (4.9.2.) untersucht. Ebenfalls wurde die *SFRP1* Expression in untransfizierten Kontrollzellen gemessen.



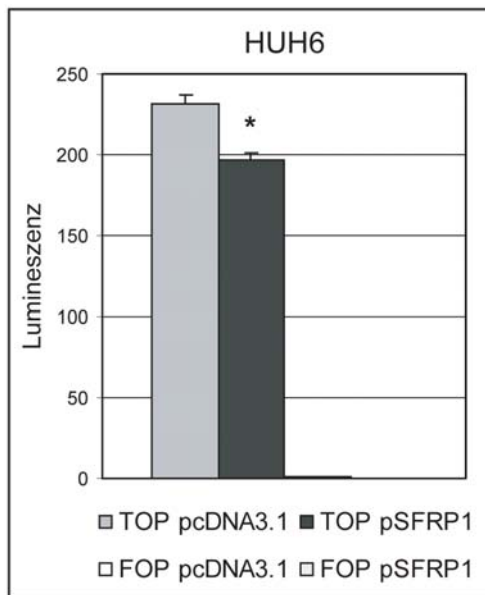
**Bild 19:** Expressionsstatus der Zielgene *MYC* und *CCND1* des Wnt-Signalweges in den Zelllinien HUH6, HepT1, HepT3 und HepG2 nach 48 und 72 h Transfektion mit pSFRP1 und pcDNA3.1.

Weder bei *MYC* noch bei *CCND1* konnte eine signifikante Erniedrigung der Expression nachgewiesen werden. Der Signalweg ist trotz der Überexpression von *SFRP1* weiterhin aktiv (Bild 19).

### 5.1.5.2. Aktivitätsbestimmung mit dem TOP/FOP-Flash-Promoter Assay

Der TOP/FOP Assay dient ebenfalls zur Bestimmung der Aktivität des Wnt-Signalweges und wurde mit pSFRP1 stabil transfizierten HUH6 Zellen durchgeführt. Bei einem aktiven Wnt-Signalweg bindet  $\beta$ -Catenin an den Transkriptionsfaktor TCF und es erfolgt die Expression des Firefly-Luciferase Reportergens (4.14.7.).

Die pSFRP1 stabil transfizierten HUH6 Zellen besitzen eine signifikant erniedrigte  $\beta$ -Catenin Aktivität im Vergleich zu den normalen HUH6 Zellen (Bild 20). Die Lumineszenzmessung ergab eine erniedrigte Firefly-Luciferase Aktivität in den pSFRP1 stabil transfizierten Zellen. Bei den pFOP kontrolltransfizierten Zellen wurde keine Firefly-Luciferase Aktivität gemessen. Das Plasmid besitzt Mutationen in seinen TCF-Bindestellen, die Transkription kann daher nicht über den  $\beta$ -Catenin/TCF-Komplex aktiviert werden.



**Bild 20:** Der TOP/FOP Assay vergleicht die Aktivität des Wnt-Signalweges von Kontroll- und pSFRP1 stabil transfizierten HUH6 Zellen. Durch die Lumineszenzmessung der Firefly-Luciferase Aktivität der Reporterplasmide pTOP und pFOP kann die  $\beta$ -Catenin/TCF-vermittelte Expression des Reportergens bestimmt werden. \* Signifikante Erniedrigung der Luciferaseaktivität ( $p \leq 0,05$ ).

### 5.1.6. $\beta$ -Catenin Mutationsstatus

Die Untersuchung des  $\beta$ -Catenin Mutationsstatus erbrachte folgende Ergebnisse (Tab.5). Es konnte für 7 Hepatoblastome eine Deletion von 6 bp – 255 bp im Exon 3 festgestellt werden. Bei 3 Tumoren lag eine komplette Deletion des Exons 3 vor. Für 4 weitere Tumore wurden verschiedene Punktmutationen nachgewiesen, die einen Basenaustausch zur Folge hatten und 4 Hepatoblastome zeigten keine Mutation. Somit konnte insgesamt für 12 von 18 (67%) Hepatoblastomen eine Mutation ermittelt werden.

Durch die Bindung von  $\beta$ -Catenin an die TCF/LEF Transkriptionsfaktoren wird die Expression der Zielgene *MYC* und *CCND1* aktiviert. Durch die Bestimmung des relativen mRNA Expressionslevel von *MYC* und *CCND1* sollte die Aktivität von  $\beta$ -Catenin in den Hepatoblastomen bestimmt werden. Bei 6 von 24 Tumoren wurde im Vergleich zu normaler Leber eine Repression der *MYC* Expression ( $< 0,33$ ) gemessen. Bis auf 2 Tumore (T84 und T91) war die *MYC* Expression im Vergleich zum Normalgewebe immer niedriger ( $< 1$ ). Bei der Bestimmung des Expressionsstatus von *CCND1* wurde im Vergleich zu normaler Leber weder eine Repression ( $< 0,33$ ) noch eine Überexpression des Zielgens gemessen ( $> 3$ ). Die niedrigste Expressionsrate lag bei 0,61 und die höchste bei 1,59 (Tab.5).

Bei den Tumoren konnte weder eine erhöhte noch eine verminderte Expression der Zielgene mit dem  $\beta$ -Catenin Mutationsstatus korreliert werden. Die  $\beta$ -Catenin Mutation hat keinen Einfluss auf die Expression der Zielgene *MYC* und *CCND1*.

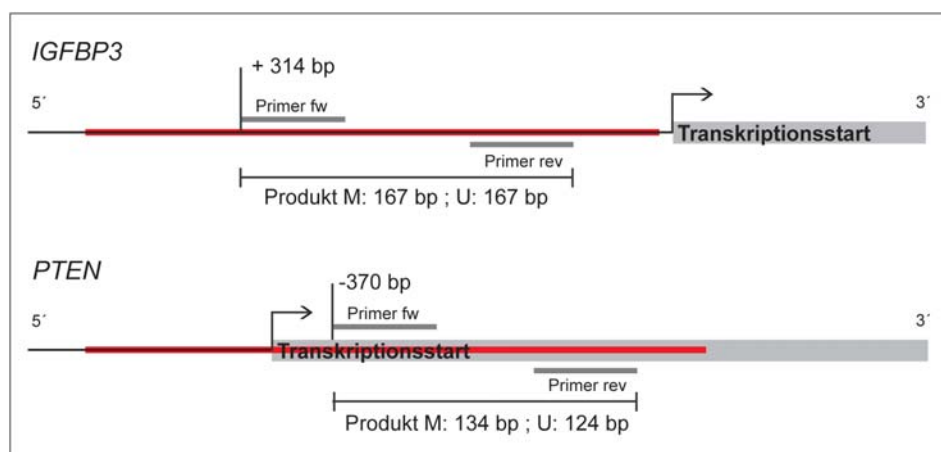
Tumor	Alter/ Geschl.	Tumor/ Histologie	Stadium	Chemo	Outcome	β-Catenin Mutation	relativer mRNA Expressionslevel	
							MYC	CCND1
T4	56/m	HB/epith (F/E)	IV HR	ja	DOD	Δ 111bp	0,86	0,74
T5	42/m	HB/mixed (E)	k.D.	k.D.	k.D.	Δ 255bp	0,48	1,15
T6	15/w	HB/epith (F)	IV HR	ja	NED	Gly34Val	0,38	1,13
T7	22/m	HB/epith (F)	III SR	ja	NED	Δ 48 bp	0,82	1,24
T9	5/m	HB/epith (E)	III SR	ja	NED	Ser37Phe	0,79	1,05
T10	29/m	HB/epith (F/E)	III SR	ja	k.D.	Gly34Arg	0,51	1,11
T12	9/f	HB/epith (F)	k.D.	k.D.	k.D.	k.D.	0,43	0,96
T13	54/w	HB/epith (F)	IV HR	ja	NED	k.D.	<b>0,18</b>	0,86
T14	15/m	HB/epith (F)	III SR	ja	k.D.	k.D.	<b>0,31</b>	1,51
T15	7/m	HB/mixed	IV HR	ja	k.D.	k.D.	<b>0,19</b>	1,23
T16	42/w	HB/epith (F)	IV HR	k.D.	k.D.	k.D.	0,64	1,17
T17	18/w	HB/mixed	III SR	ja	k.D.	k.D.	<b>0,24</b>	0,61
T29	11/m	HB/mixed	I	nein	NED	no	0,46	1,15
T77	16/w	HB/epith (F)	I	nein	NED	Δ 6 bp	<b>0,24</b>	0,67
T82	4/m	HB/epith	IV HR	ja	DOD	no	0,57	0,82
T84	1/m	HB/epith (F)	III SR	ja	NED	Δ 75 bp	1,87	1,59
T91	31/w	HB/epith (F)	IV HR	ja	NED	Δ 36 bp	1,15	0,72
T96	13/m	HB/epith (F)	IV HR	ja	DOD	no	0,71	0,58
T145	9/w	HB/mixed (F/E)	III SR	ja	NED	Δ exon 3	<b>0,18</b>	0,73
T175	96/m	TLCT	I	nein	NED	no	0,74	0,71
T198	10/w	HB/epith (F)	III SR	ja	NED	Δ exon 3	0,68	0,81
T227	114/w	HB/epith (F)	IV HR	ja	k.D.	Δ exon 3	0,54	1,57
T253	15/w	HB/epith (F/E)	IV HR	ja	k.D.	Gly34Val	0,76	0,99
T254	6/m	HB/epith (F)	III SR	ja	NED	Δ 148 bp	0,52	1,29
FL	16W/m	fetale Leber	-	-	-	-	0,51	0,72

**Tab 5:** Übersicht der Tumorfälle, Normalgewebe und fetaler Leber mit klinischen Daten und relativem mRNA Expressionslevel der Gene *MYC* und *CCND1*, Alter in Monaten (W: Schwangerschaftswoche), Geschlecht m: männlich, w: weiblich, HB (Hepatoblastom), F: fetale Differenzierung, E: embryonale Differenzierung, TLCT: Transitioneller Leberzelltumor (Prokurat et al., 2002), Tumorstadium (von Schweinitz et al., 1997), SR: Standardrisiko, HR: Hochrisiko, Chemo: präoperative Chemotherapie, DOD: verstorben, NED: in Remission, relative mRNA Expression im Vergleich zum Durchschnitt aus 7 Normallebern: > 3-fache Überexpression (unterstrichen) oder Repression < 0,33 (fett), k.D.: keine Daten

## 5.2. IGF-Signalweg

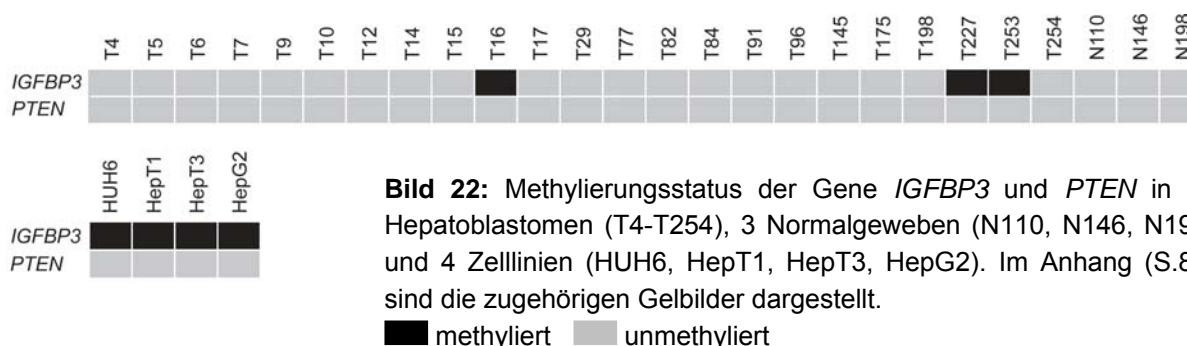
### 5.2.1. Methylspezifische PCR

In 23 Hepatoblastomen, drei normalen Lebern, in den Hepatoblastomzelllinien HUH6, HepT1, HepT3 und in der hepatozellulären Karzinom-Zelllinie HepG2 wurden die Gene *IGFBP3* und *PTEN* aus dem IGF-Signalweg mit Hilfe der MSP (4.9.1.) auf ihren Methylierungszustand untersucht.



**Bild 21:** Übersicht der MSP-Primer Bindestellen im *IGFBP3* und *PTEN* Promoter. M: methyliert, U: unmethyliert (+) upstream oder (-) downstream vom Transkriptionsstart, █ CpG Insel

Für *IGFBP3* wurde eine Region 314 bp upstream vom Transkriptionsstart untersucht (Bild 21). Die Primer deckten einen Bereich von 4 - 5 CpGs ab und konnten somit spezifisch zwischen dem methylierten und dem unmethylierten Zustand unterscheiden. Für T16, T253, T254 und alle vier Zelllinien konnte eine Methylierung nachgewiesen werden. Alle anderen Tumore und die Normalgewebe waren in der untersuchten Region unmethyliert (Bild 22).



Das Gen *PTEN* war in allen Geweben und auch in den Zelllinien unmethyliert (Bild 22). Dabei wurde eine Region 370 bp upstream vom Transkriptionsstart untersucht (Bild 21). Vier bis fünf CpGs wurden pro Primerpaar in der MSP überprüft.

### 5.2.2. IGF2/H19 - Lokus

Für die Bestimmung des LOH (*loss of heterozygosity*) / LOI (*loss of imprinting*) Status wurde der IGF2/H19 - Lokus in der Region 11p15 mit einem Assay (4.12.) nach Fukuzawa et al. untersucht (Fukuzawa et al., 2004).

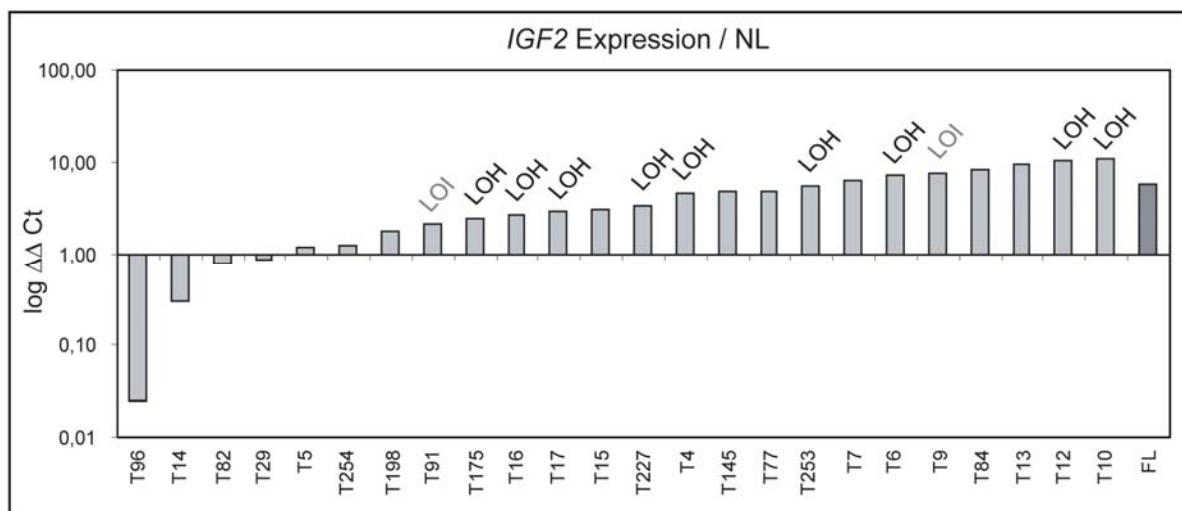
Für 7/23 (30 %) Tumore konnte LOH im 11p15 Lokus nachgewiesen werden. Ebenso wurde in den vier Zelllinien ein LOH festgestellt. 4 Tumore (17%) (T9, T16, T91 und T175) zeigten einen LOI auf dem maternalen Allel durch fehlerhafte Methylierung in der Region 11p15. Die genomische DNA und 12/23 (53%) Hepatoblastome zeigten keine Veränderung (ROI) (Tab.6).

Tumor	H19	KvDMR	H19/KvDMR	Status
T4	49	6,4	7,66	LOH
T5	52	52	1,00	ROI
T6	70	3,4	20,59	LOH
T7	76	47	1,62	ROI
T9	29	14	2,07	LOI
T10	84	8	10,50	LOH
T12	51	2,5	20,40	LOH
T14	41	43	0,95	ROI
T15	23	28	0,82	ROI
T16	83	39	2,13	LOI
T17	73	2,7	27,04	LOH
T29	60	52	1,15	ROI
T77	54	40	1,35	ROI
T82	73	76	0,96	ROI
T84	46	52	0,88	ROI
T91	74	31	2,39	LOI
T96	37	34	1,09	ROI
T145	62	62	1,00	ROI
T175	36	20	1,80	LOI
T198	30	21	1,43	ROI
T227	86	8	11,17	LOH
T253	145	3	53,70	LOH
T254	32	31	1,03	ROI
HUH6	95	3	31,67	LOH
HepT1	74	1	74,00	LOH
HepT3	44	1	44,00	LOH
HepG2	70	1	70,00	LOH
genom.	29	24	1,21	ROI

**Tab. 6:** LOH/LOI Status der Hepatoblastome (T4 - T254) und Zelllinien HUH6, HepT1, HepT3 und HepG2, H19 und KvDMR Methylierungsgrad in %, H19/KvDMR Quotient 0,8 - 1,7 = ROI (*retention of imprinting*), 1,8 - 2,8 = LOI (*loss of imprinting*), < 2,9 = LOH (*loss of heterozygosity*)

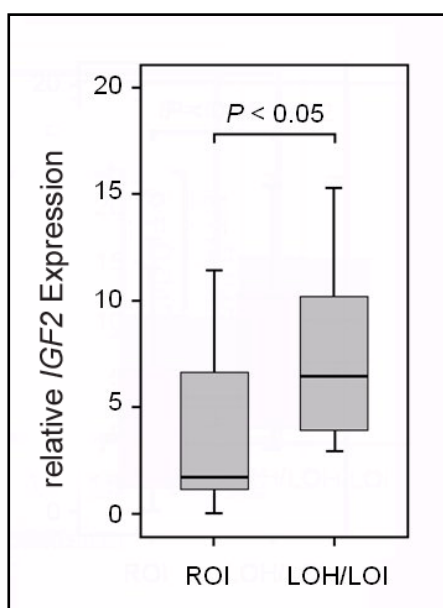
### 5.2.3. Expression verschiedener Gene aus dem IGF-Signalweg

24 Hepatoblastome, 7 normale Lebern und eine fetale Leber wurden mittels Q-PCR (4.9.2.) auf ihre *IGF2*, *IGFBP3*, *PTEN* und *PLAG1* Expression untersucht. Die Genexpression der Tumore und der fetalen Leber wurde mit dem Mittelwert aus den 7 Normallebern (N110, N146, N175, N198, N227, N253 und N254) verglichen.



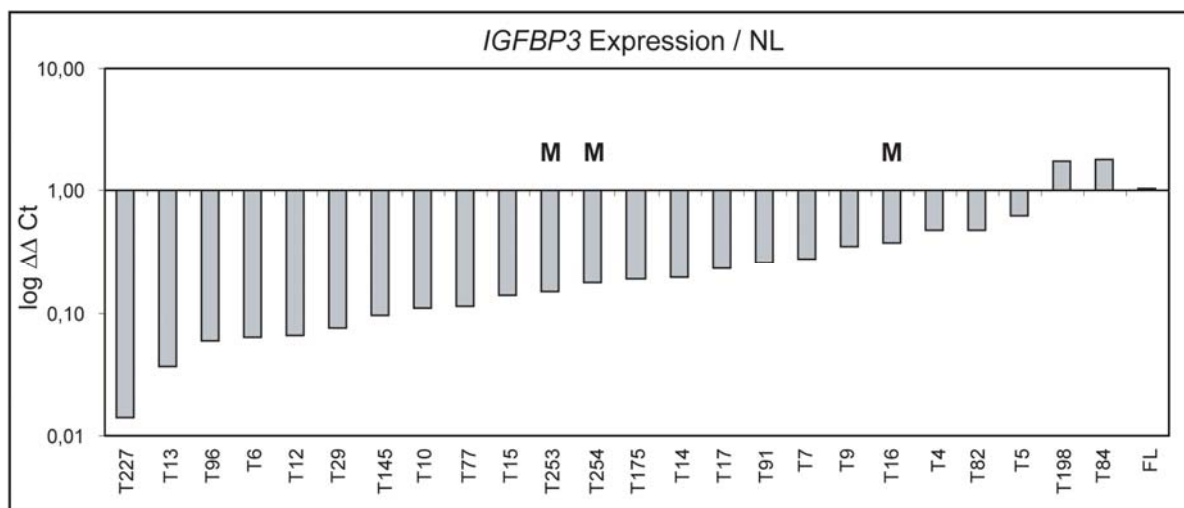
**Bild 23a:** Die Genexpression von *IGF2* in den Geweben T4-T254 und fetaler Leber (FL) wurde mit der Expression in Normalleber (NL) verglichen. LOI: *loss of imprinting*, LOH: *loss of heterozygosity*

Die *IGF2* Expression war in 19/24 Hepatoblastomen hochreguliert (Bild 23a). Dabei zeigte T10 mit einer 11-fachen Überexpression den deutlichsten Unterschied im Vergleich zu Normalleber. 58 % der Tumore mit einer erhöhten *IGF2* Expression besaßen einen LOI oder LOH. Somit ist der LOH/LOI Status signifikant assoziiert mit erhöhter *IGF2* Expression (Bild 23b).



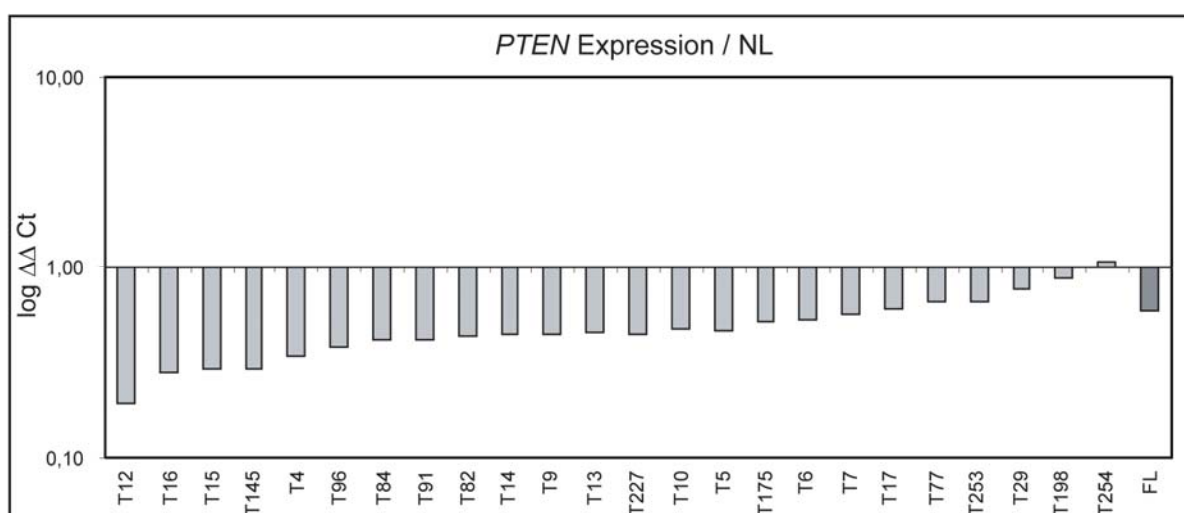
**Bild 23b:** Signifikant erhöhte Expression ( $p \leq 0,05$ ) von *IGF2* in Tumoren mit LOH/LOI Status





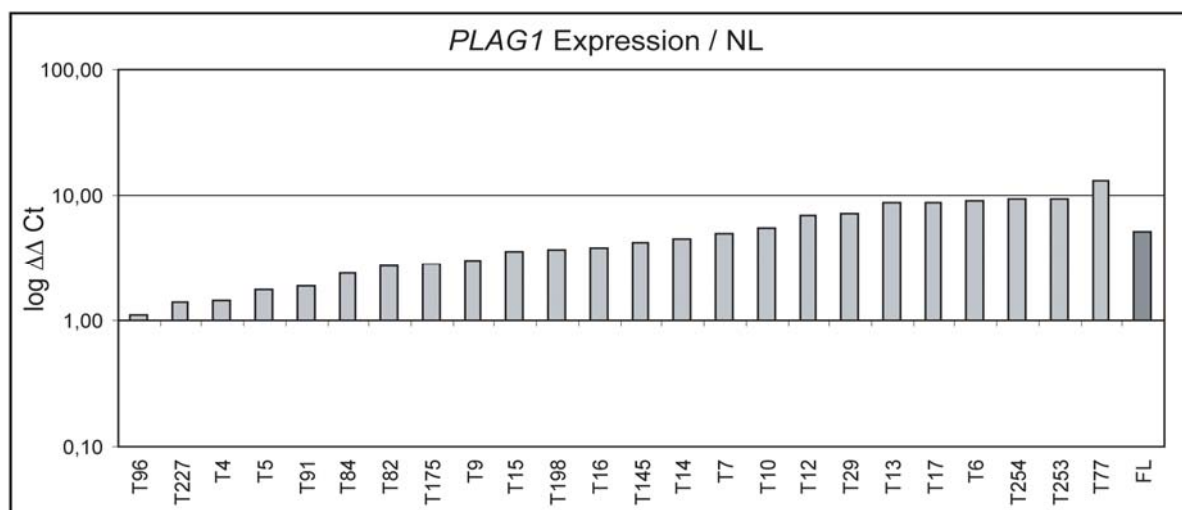
**Bild 23c:** Die Genexpression von *IGFBP3* in den Geweben T4-T254 und fetaler Leber (FL) wurde mit der Expression in Normalleber (NL) verglichen. M: methyliert

Bei der *IGFBP3* Expression ist deutlich zu erkennen, dass 21/24 Tumore im Vergleich zum Normalgewebe runterreguliert sind (Bild 23c). Der Bereich der verringerten Expression lag zwischen 0,01 für T227 und 0,63 für T5. Von diesen 21 Hepatoblastomen lagen drei methyliert vor. Die Tumore T198 und T84 waren geringfügig *IGFBP3* überexprimiert (1,7- und 1,8-fach) und zeigten keine Methylierung. Da *IGFBP3* in 15 % der Hepatoblastome mit verminderter *IGFBP3* Expression methyliert vorlag, könnte dies ein Hinweis für eine epigenetische Regulation des Inhibitors von IGF2 sein.



**Bild 23d:** Die Genexpression von *PTEN* in den Geweben T4-T254 und fetaler Leber (FL) wurde mit der Expression in Normalleber (NL) verglichen.

Ein weiterer Inhibitor des *IGF* Signalweges ist *PTEN*, jedoch lag dieser in allen Geweben unmethyliert vor. Die Expression war, mit Ausnahme von T254, im Vergleich zum Normalgewebe deutlich verringert. Dabei zeigte T12 mit 0,2 die niedrigste relative Expression (Bild 23d).



**Bild 23e:** Die Genexpression von *PLAG1* in den Geweben T4-T254 und fetaler Leber (FL) wurde mit der Expression in Normalleber (NL) verglichen.

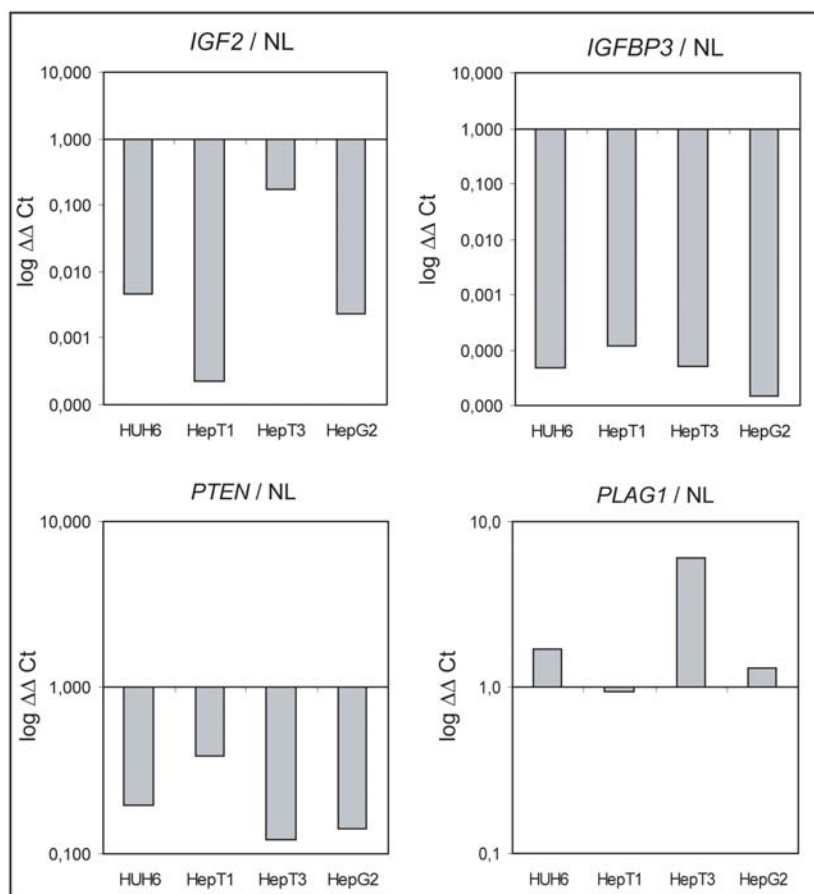
Das Proto-Onkogen *PLAG1* war im Vergleich zur normalen Leber in allen Tumoren und in der fetalen Leber deutlich überexprimiert. T96 zeigte mit 1,11 die niedrigste relative Expression und T77 mit einer Überexpression von 13,2 die höchste (Bild 23e).

### 5.2.3.1. Expression in den Zelllinien

Die Zelllinien HUH6, HepT1, HepT3 und HepG2 wurden ebenfalls mittels Q-PCR (4.9.2.) in ihrer *IGF2*, *IGFBP3*, *PTEN* und *PLAG1* Expression untersucht und mit dem Mittelwert aus den Normalgeweben verglichen.

Im Gegensatz zu den Tumoren war *IGF2* im Vergleich zum Normalgewebe in den Zelllinien reprimiert, obwohl die Zelllinien einen LOH Status besitzen (Bild 24, Tab 2). Der niedrigste Wert der relative Expression von 0,0002 konnte bei HepT1 festgestellt werden.

*IGFBP3* war im Vergleich zum Normalgewebe deutlich transkriptionell runterreguliert. Mit einer relativen Expression von 0,00001 zeigte HepG2 die geringste *IGFBP3* Expression (Bild 24). Dies korreliert mit dem Methylierungsstatus. In allen vier Zelllinien wurde eine Methylierung des untersuchten Promoterbereiches mittels MSP (Bild 25) nachgewiesen.



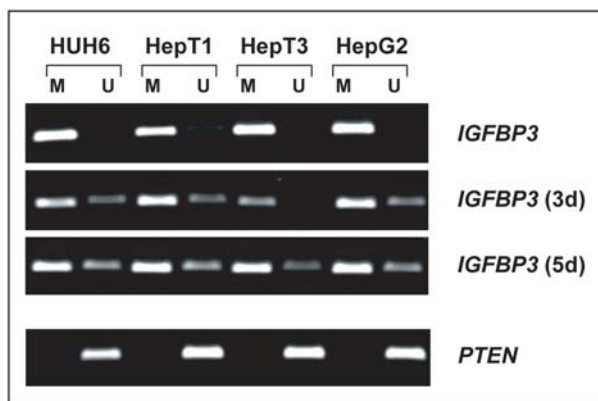
**Bild 24:** *IGF2*, *IGFBP3*, *PTEN* und *PLAG1* Expression in den Zelllinien HUH6, HepT1, HepT3 und HepG2 im Vergleich zu Normalleber (NL).

Ebenfalls konnte bei *PTEN* eine verringerte Expression im Vergleich zum Normalgewebe festgestellt werden. HepT3 zeigte mit 0,123 die geringste relative Expression von *PTEN* (Bild 24). Alle vier Zelllinien waren im untersuchten Promoterbereich unmethyliert (Bild 25).

Für *PLAG1* wurde in HUH6, HepT3 und HepG2 eine Überexpression im Vergleich zum Normalgewebe nachgewiesen. Mit einer relativen Expression von 5,9 war *PLAG1* in HepT3 am stärksten exprimiert. Eine leicht verringerte Expression gegenüber normaler Leber zeigte mit 0,9 nur die Zelllinie HepT1.

#### 5.2.4. Behandlung der Zelllinien mit Demethylierungsagenzien

Wie schon bei der Untersuchung des Wnt-Signalweges (5.1.3.) wurden die Zelllinien HUH6, HepT1, HepT3 und HepG2 mit den Demethylierungsagenzien 5-Aza-2'-deoxycytidine (5-Aza) und Trichostatin A (TSA) behandelt (4.14.2.), wodurch es zu einer Reexpression epigenetisch stillgelegter Gene kommen kann.



**Bild 25:** MSP der Gene *IGFBP3* und *PTEN*. Untersucht wurden die Zelllinien HUH6, HepT1, HepT3 und HepG2 unbehandelt, 3 Tage (3d) und 5 Tage (5d) 5-Aza/TSA behandelt. M: methyliert, U: unmethyliert

Nach 3 Tagen (3 d) und 5 Tagen (5 d) wurde die DNA und RNA (4.1. und 4.6.) isoliert und das Gen *IGFBP3* auf seinen Methylierungszustand mittels MSP (4.9.1.) überprüft. Ebenfalls wurde nach 3 d und 5 d 5-Aza/TSA-Behandlung die Expression der Gene *IGFBP3* und *PTEN* mit Hilfe der Q-PCR (4.9.2.) untersucht und mit den unbehandelten Kontrollzellen verglichen.

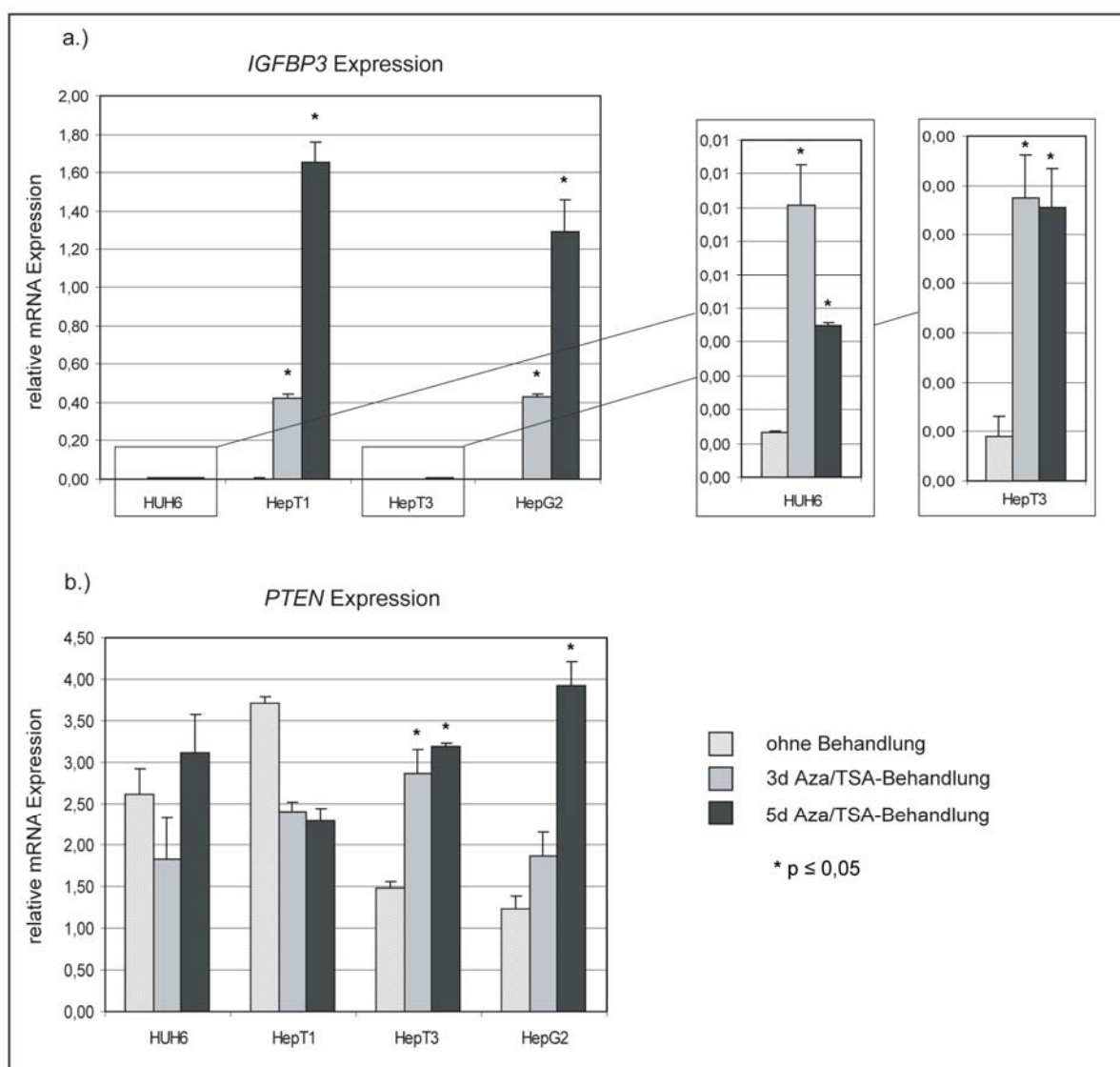
Für *IGFBP3* wurde eine vollständige Methylierung in den Zelllinien HUH6, HepT3 und HepG2 festgestellt. HepT1 zeigte darüber hinaus eine schwache Bande für den unmethylierten Zustand. Nach der 5-Aza/TSA-Behandlung konnte man eine deutliche Demethylierung des untersuchten Promoterbereiches erkennen. In allen vier Zelllinien war eine Bande für den unmethylierten Zustand nachweisbar (Bild 25).

Das Gen *PTEN* lag in allen vier Zelllinien unmethyliert vor (Bild 25). Eine MSP nach 5-Aza/TSA-Behandlung wurde daher nicht durchgeführt.

#### 5.2.4.1. Expression der Kandidatengene nach 5-Aza/TSA-Behandlung

Die Untersuchung der Expression nach 5-Aza/TSA-Behandlung wurde mittels Q-PCR (4.9.2.) durchgeführt. Dafür wurden alle Reaktionen in Dubletten angelegt und auf das Haushaltsgen *TBP* normiert. Verglichen wurden unbehandelte Zellen, 3 d und 5 d 5-Aza/TSA behandelte Zellen.

Für *IGFBP3* konnte in allen vier Zelllinien mittels MSP eine Methylierung in der untersuchten Promoterregion nachgewiesen werden. Nach der 5-Aza/TSA-Behandlung wurde dieser Bereich demethyliert (Bild 25) und es war ein signifikanter Anstieg der Expression sowohl nach 3 d als auch nach 5 d in allen vier Zelllinien zu erkennen (Bild 26a).

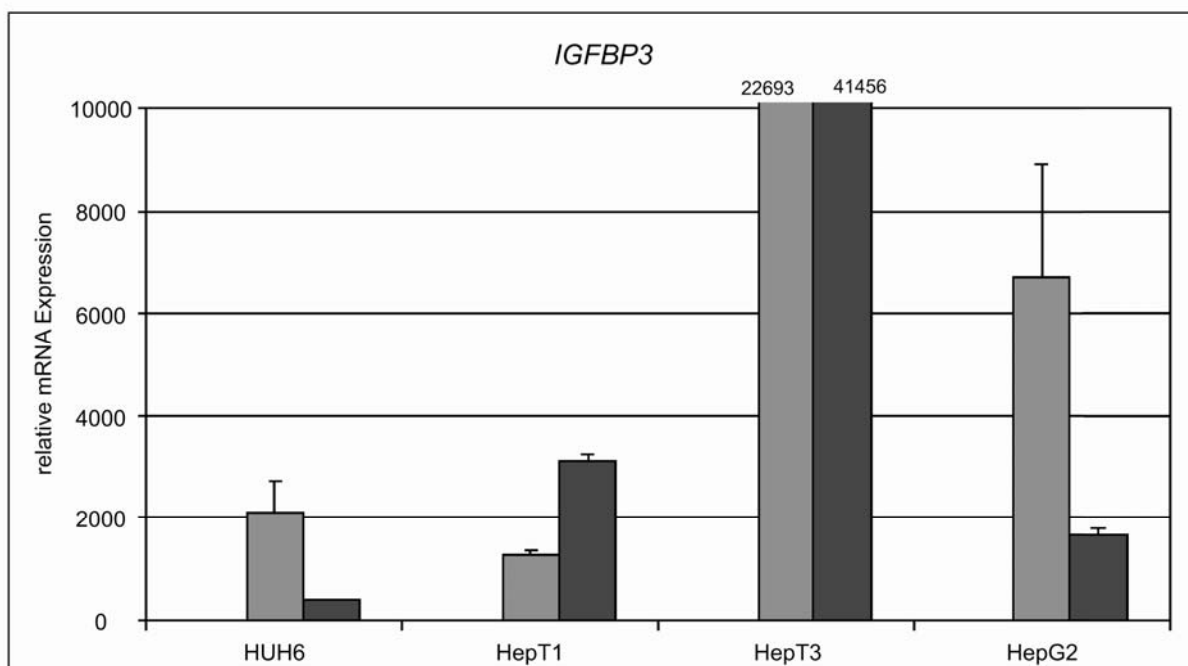


**Bild 26:** Bestimmung der Genexpression von *IGFBP3* (a) und *PTEN* (b) in den Zelllinien HUH6, HepT1, HepT3 und HepG2, ohne Behandlung, 3 d und 5 d Behandlung der Zellen mit 5-Aza/TSA. \* Signifikante Erhöhung der Expression im Vergleich zu unbehandelten Zellen ( $p \leq 0,05$ ).

Das Gen *PTEN* zeigte in der MSP keine Methylierung der untersuchten Promoterregion (Bild 25). Jedoch konnte man bei der Bestimmung der Expression nach 5-Aza/TSA-Behandlung einen signifikanten Anstieg der *PTEN* Expression in den Zelllinien HepT3 und HepG2 feststellen. Für die Zelllinien HUH6 und HepT1 wurde keine signifikante Erhöhung der Expression nachgewiesen (Bild 26b).

### 5.2.5. Überexpression von *IGFBP3*

Nach der 5-Aza/TSA-Behandlung konnte in allen vier Zelllinien ein signifikanter Anstieg der *IGFBP3* Expression festgestellt werden. Nachdem gezeigt wurde, dass die Zellen nach der 5-Aza/TSA-Behandlung eine eingeschränkte Vitalität haben (5.1.3.2.), sollte überprüft werden, ob dies ebenfalls mit einer Überexpression von *IGFBP3* erreicht werden kann.



**Bild 27:** Expression von *IGFBP3* in HUH6, HepT1, HepT3 und HepG2, 48 und 72h nach pIGFBP3-Transfektion □ pIRES / 48h ■ pIGFBP3 / 48h ■ pIGFBP3 / 72h

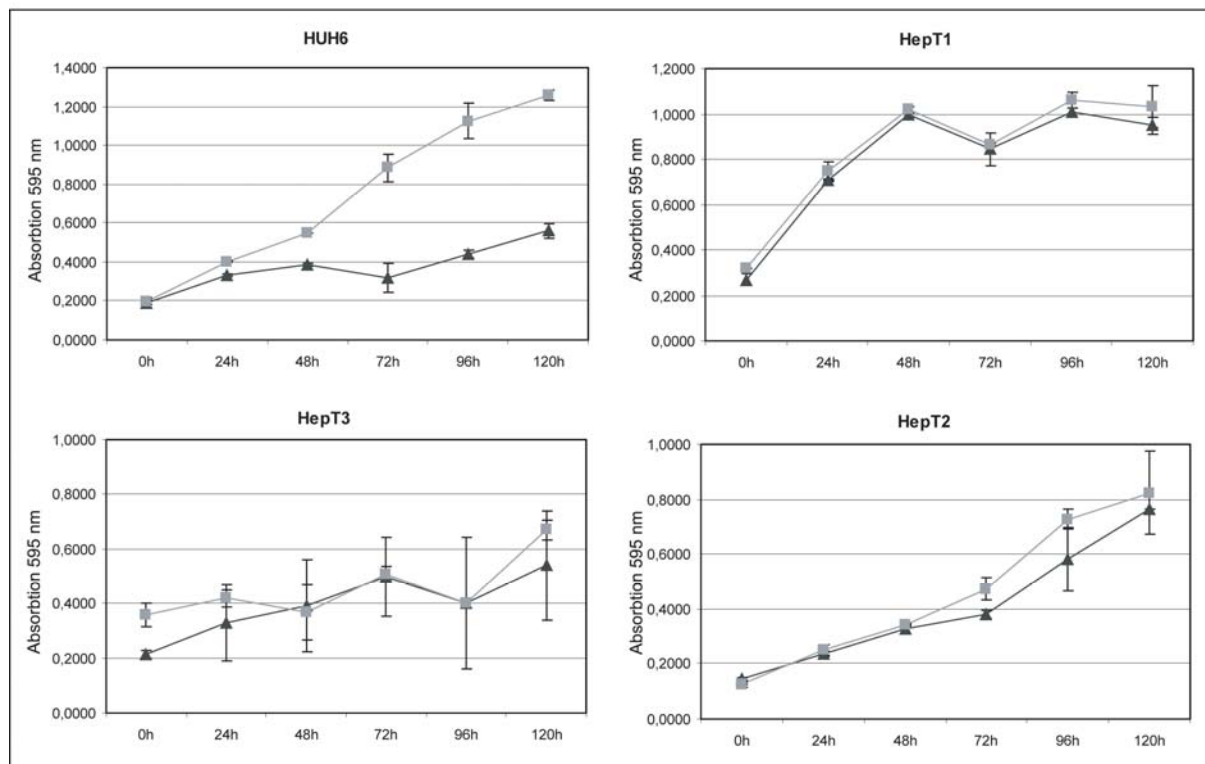
Die Zellen HUH6, HepT1, HepT3 und HepG2 wurden transient mit dem Leervektor pIRESpuro (pIRES) und mit pIRES\_IGFBP3 (pIGFBP3) transfiziert. Nach 48 h und 72 h wurde die RNA isoliert (4.6.) und die Expression von *IGFBP3* mittels Q-PCR (4.9.2.) gemessen. Die mit Leervektor transfizierten Zelllinien zeigten eine sehr geringe Expression von *IGFBP3*, wohingegen nach der Transfektion mit pIGFBP3 eine deutliche Überexpression zu erkennen war (Bild 27).

#### 5.2.5.1. Vitalitätsmessung nach transienter Transfektion

Nach der transienten Transfektion von pIGFBP3 und dem Leervektor pIRES wurde die Proliferation der vier Zelllinien untersucht. Die Messungen erfolgten über einen Zeitraum von 120 h und wurde mit dem MTT-Assay (4.14.5.) durchgeführt.

Für die Zelllinien HUH6 war eine deutlich verminderte Proliferationsrate der pIGFBP3 transfizierten Zellen im Vergleich zu den pIRES transfizierten Zellen erkennbar (Bild 28).

Somit hat die Überexpression einen direkten Einfluss auf das Wachstumsverhalten der HUH6 Zelllinie. Im Gegensatz dazu zeigten die Zelllinien HepT1, HepT3 und HepG2 keinen Unterschied in ihrem Wachstumsverhalten zwischen pIGFBP3 und pIRES transfizierten Zellen (Bild 28).



**Bild 28:** Proliferationskurven nach transienter Transfektion von HUH6, HepT1, HepT3 und HepG2 mit pIGFBP3 und dem Leervektor pIRES bei einem Zeitverlauf über 120 h.

—■— pIRES    —▲— pIGFBP3

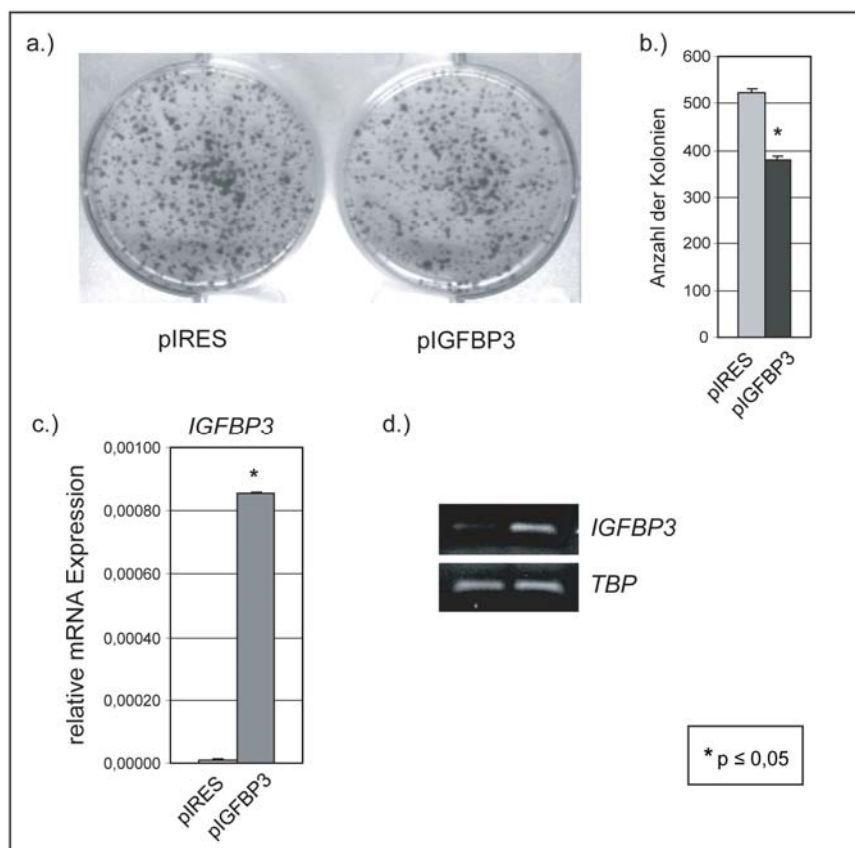
Um das Proliferationsverhalten über einen längeren Zeitraum zu untersuchen und um sicher zu stellen, dass nur transfizierte Zellen in ihrem Wachstum untersucht werden, wurden stabil transfizierte Zellen (4.16.4.2.) hergestellt. Diese wurden für den folgenden Versuch verwendet.

### 5.2.5.2. Expression von *IGFBP3* in stabil transfizierten Zellen

Um die *IGFBP3* Expression in den pIGFBP3 stabil transfizierten Zellen zu überprüfen, wurden HepT1 Zellklone expandiert und deren RNA isoliert (4.6.). Mit einer anschließenden Q-PCR (4.9.2.) wurde die *IGFBP3* Expression bestimmt. Es konnte eine starke Überexpression im Vergleich zu den mit Leervektor pIRES transfizierten Zellen festgestellt werden (Bild 29c, d).

### 5.2.5.3. Untersuchung der Zellproliferation

Mit dem Colony Formation Assay (4.14.6.) wurde das Wachstumsverhalten der stabil transfizierten HepT1 Zellen über einen Zeitraum von zwei Wochen bestimmt. Die stabil transfizierten Zellen wurden stark vereinzelt (5000 Zellen / Well) und in Selektionsmedium kultiviert. Anschließend wurden die Kolonien gefärbt und ausgezählt.



**Bild 29:** (a) Färbung der HepT1 Zellkolonien des Colony Formation Assay, transfiziert mit pIRES und pIGFBP3. (b) MW der Zellkolonien aus drei Versuchen. (c) Relative mRNA Expression bei pIRES und pIGFBP3 stabil transfizierter HepT1 Zelllinie. (d) Darstellung der erhöhten *IGFBP3* Expression im Agarosegel. \* Signifikante Veränderung ( $p \leq 0,05$ ).

Die Anzahl der Kolonien (Bild 29b) ließ einen signifikanten Unterschied zwischen kontrolltransfizierten pIRES Zellen und pIGFBP3 Zellen erkennen. Bei der Überexpression von *IGFBP3* zeigten die HepT1 Zellen ein vermindertes Wachstumsverhalten (Bild 29a).



## 6. Diskussion

Bei der Ausbildung von Hepatoblastomen liegt häufig ein Defekt im Wnt- oder IGF-Signalweg vor. Während es sich bei den Veränderungen im Wnt-Signalweg meist um Mutationen der Gene *β-Catenin*, *APC* und *AXIN2* handelt (Koch et al., 1999), (Oda et al., 1996), (Koch et al., 2004), wurde beim IGF-Signalweg eine Störung der genomischen Prägung (*genomic imprinting*) beobachtet. Durch den Verlust des maternalen Allels (LOH, *loss of heterozygosity*) oder durch fehlerhafte Methylierung (LOI, *loss of imprinting*) des *IGF2/H19* Locus kommt es zu einer erhöhten *IGF2* Expression (Rainier et al., 1995), (Albrecht et al., 1994). Diese fehlerhafte Regulation der Methylierung deutet bereits darauf hin, dass neben den genetischen Mutationen auch epigenetische Mechanismen eine entscheidende Rolle bei der Ausbildung von Hepatoblastomen spielen. Die fehlerhafte Methylierung im Promoterbereich verschiedener Gene ist ein häufiges Phänomen bei der Tumorentstehung. Durch die Hypermethylierung der CpG Inseln im Promoter erfolgt die Stilllegung der Genexpression. Oft sind Tumorsuppressorgene und Gene aus Signalwegen betroffen, welche die Proliferation der Zellen regulieren (Esteller, 2007). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Hepatoblastome und daraus abgeleitete Zelllinien CpG Promotermethylierungen in inhibitorischen Komponenten des Wnt- und des IGF-Signalweges besitzen. Beim Wnt-Signalweg konnten für *APC*, *DKK1*, *SFRP1* und *WIF1* methylierte Bereiche nachgewiesen werden, für den IGF-Signalweg wurde *IGFBP3* als epigenetisch stillgelegtes Gen identifiziert. Funktionelle Analysen der Signalwegsinhibitoren *SFRP1* und *IGFBP3* belegen die Relevanz bei der Tumorpheriferation.

### 6.1. Wnt-Signalweg

Zu den negativen Regulatoren des Wnt-Signalweges gehören unter anderem *APC*, *DKK1*, *SFRP1* und *WIF1*. Es wurde untersucht, ob diese Wnt-Signalwegs Inhibitoren epigenetisch stillgelegt sind und dadurch einen aktiven Signalweg begünstigen, der die Tumorentstehung und auch dessen Wachstum fördert. In den Hepatoblastomen und in den verwendeten Zelllinien konnten Methylierungen für diese Gene in der Promoterregion nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis zeigte, dass CpG Methylierung ein häufiges Ereignis in Hepatoblastomen ist und wahrscheinlich eine entscheidende Funktion bei der Entstehung der Tumore übernimmt.

*APC* vermittelt die Inhibition des Signalweges durch die Ausbildung eines Proteinkomplexes mit *β-Catenin* (siehe 1.3.). In Tumoren kommt es häufig durch Punktmutationen, LOH oder Promotermethylierung zur Stilllegung des *APC* Gens (Smith et al., 1993), (Kurahashi et al.,

1995). Es wurde bereits gezeigt, dass Methylierungen des *APC* Promoters im Kolonkarzinom als auch im hepatozellulären Karzinom vorkommen (Esteller et al., 2000b), (Csepregi et al., 2008). Bei den Hepatoblastomen konnte eine Promotermethylierung in 9/23 Fällen nachgewiesen werden. Ebenfalls lagen alle vier Zelllinien in der untersuchten Promoterregion methyliert vor. Im Gegensatz zu diesem Ergebnis steht eine Arbeit von Harada et al., die in 27 Hepatoblastomen keine Methylierung der *APC* Promoterregion nachweisen konnte (Harada et al., 2002). Die Autoren machten jedoch keine Angabe zur untersuchten Promoterregion, so dass nur vermutet werden kann, dass die Analyse der Methylierung in einer anderen als in unserer Arbeit untersuchten Region stattfand. Auch deckt man mit der Methylspezifischen PCR (MSP) nur einen sehr geringen Anteil an CpGs innerhalb der Promoterregion ab. Untersucht man dann eine Region, die nicht durch differenzielle Methylierung reguliert wird, kann leicht ein falscher Methylierungsstatus angenommen werden.

Einen Aufschluss über die Relevanz der Methylierung gibt die Genexpressionsanalyse. 46 % der Tumore mit verminderter *APC* Expression zeigten eine Methylierung. Jedoch waren auch 27 % der Tumore mit einer erhöhten *APC* Expression methyliert. Im Kolonkarzinom wurde dagegen eine transkriptionelle Inhibierung durch Promotermethylierung vorgefunden. Dort waren 4/8 Tumore methyliert und zeigten keine Expression im Vergleich zu den unmethylierten Tumoren (Esteller et al., 2000b). Ebenfalls wurde im hepatozellulären Karzinom ein Zusammenhang zwischen Methylierung und verminderter Expression hergestellt (Csepregi et al., 2008). Im Hepatoblastom kann aufgrund der methylierten Tumoren mit erhöhter *APC* Expression kein eindeutiger Zusammenhang zwischen Methylierung und verminderter Genexpression gezeigt werden. Bei der Methylierung von nur einem Allel wird keine vollständige Inaktivierung des *APC* Gens erreicht und die Expression ist daher nicht beeinträchtigt (Esteller et al., 2000b). Eine Verminderung der *APC* Genexpression ist jedoch in den vier untersuchten Tumorzelllinien HUH6, HepT1, HepT3 und HepG2 zu erkennen. Nach der Behandlung der Zelllinien mit den Demethylierungsagenzien 5-Aza und TSA konnte bei der Zelllinie HepG2 eine Reaktivierung der *APC* Expression aufgrund der Demethylierung der DNA festgestellt werden. Die anderen Zelllinien zeigten hingegen keine Veränderung. Insgesamt deuten diese Ergebnisse eher darauf hin, dass die *APC* Methylierung keine entscheidende Rolle bei der Entstehung von Hepatoblastomen übernimmt. Weitere Versuche müssen jedoch bestätigen und klären, ob nicht doch Methylierungen im *APC* Promoter zum Teil zur Tumorentwicklung beitragen. So könnte eine Bisulfidsequenzierung Aufschluss über zusätzliche hypermethylierte Promoterbereiche geben, die für die Regulation der *APC* Expression verantwortlich sein können. Ebenfalls fehlt noch der Nachweis, ob in primären Hepatoblastomen *APC*

Mutationen vorliegen. Koch et al. zeigte nur in den Zelllinien HUH6 und HepG2, dass keine *APC* Mutation nachweisbar waren (Koch et al., 1999).

E-Cadherin (*CDH1*) ist ein Zell-Adhäsionsvermittelndes Protein, das durch die Bindung von  $\beta$ -Catenin dessen Fähigkeit als Vermittler des Wnt-Signalweges beeinträchtigt (Behrens, 1999). Eine verminderte *CDH1* Expression kommt über einen aktiven Wnt-Signalweg zustande, ist verantwortlich für einen undifferenzierten Phänotyp und eine erhöhte Metastasierungsfähigkeit des Tumors (Behrens, 1999), (Willert and Jones, 2006). In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob epigenetische Faktoren für die verminderte Expression des *CDH1* Gens im Hepatoblastom verantwortlich sind. Immerhin war in 21/23 Tumore *CDH1* runterreguliert. Bei der Methylierungsanalyse des *CDH1* Promoters konnte in keinem Tumor und in keiner Zelllinie eine Methylierung in der untersuchten Region festgestellt werden. Bei Hepatoblastomen sind somit keine epigenetische Mechanismen für die verminderte *CDH1* Expression verantwortlich. Das jedoch durchaus eine epigenetische Stilllegung von *CDH1* in Tumoren vorkommen kann, zeigten Graff et al. beim Brustkrebs und Prostatakarzinom und Yoshiura et al. bei verschiedenen Karzinom-Zelllinien (Graff et al., 1995), (Yoshiura et al., 1995). Ein unerwartetes Ergebnis dieser Arbeit war, dass alle vier Zelllinien im Vergleich zu normaler Leber eine deutlich erhöhte *CDH1* Expression vorwiesen. Zu erklären ist dies durch Anpassung der Zellen an die Zellkulturbedingungen. Die adhärenen Zelllinien wachsen in Kolonien mit starken Zell-Zell-Kontakten und sind im Gegensatz zu den Zellen in einem Gewebe nicht in eine extrazelluläre Matrix eingebettet. Somit ist E-Cadherin ein entscheidender Faktor, um die Zelladhäsion bei der Kultivierung von adhärenen Zellen zu gewährleisten.

Ein weiterer Inhibitor des Wnt-Signalweges ist *DKK1*. Die Analyse des extrazellulären Regulators ergab bei 35 % aller Hepatoblastome (8/23) und in allen vier Zelllinien eine Methylierung der untersuchten Promoterregion. Bei kolorektalen Karzinomen und Tumoren des Gastrointestinaltraktes konnten bereits DNA-Methylierungen von *DKK1* beobachtet werden. In beiden Tumorarten wurde weiterhin gezeigt, dass die Methylierung eine verminderte *DKK1* Expression zur Folge hat. Bei der Behandlung der entsprechenden Zelllinien mit Demethylierungsagenzien wurde eine Reaktivierung der *DKK1* Expression festgestellt (Aguilera et al., 2006), (Sato et al., 2007). Die beiden Zelllinien HUH6 und HepG2 zeigten im Vergleich zu normaler Leber eine verminderte *DKK1* Expression. Nach Kultivierung aller vier Zelllinien mit Demethylierungsagenzien konnte bei HUH6, HepT3 und HepG2 ebenfalls eine Zunahme der *DKK1* Expression beobachtet werden. Ein völlig unerwartetes Bild ergab sich jedoch bei der Untersuchung der Expression in den primären Hepatoblastomen. Es konnte eine deutliche Überexpression von *DKK1* im Vergleich zu

normaler Leber nachgewiesen werden. Dies ist in Übereinstimmung mit einer früheren Arbeit von Wirths et al., in der eine erhöhte *DKK1* Expression in 81% der Hepatoblastome und in 100% der untersuchten Zelllinien gefunden wurde (Wirths et al., 2003). Die Methylierung der CpG Inseln im Promoter von *DKK1* regulieren somit nicht die Genexpression. Weitere Versuche wie die Bisulfidsequenzierung sind notwendig um eindeutig zu klären, ob nur ein Allel von der Methylierung betroffen ist oder ob die von uns untersuchte Methylierung in einem Promoterbereich liegt, der für die Regulation der Genexpression keine Relevanz besitzt. Eine Erklärung für die hohe *DKK1* Genexpression könnte ein negativer Feedback-Mechanismus sein, wobei die Zelle versucht den Wnt-Signalweg zu inaktivieren (Wirths et al., 2003). Die Inaktivierung erfolgt über die Bindung von *DKK1* an den LRP Rezeptor. Da Hepatoblastome jedoch häufig *β-Catenin* Mutationen tragen, ist der Wnt-Signalweg ständig aktiv und die hohe Expression von *DKK1* verfehlt ihre Wirkung (Koch et al., 1999).

Die Aufgabe von *WIF1* besteht ebenfalls in der Inaktivierung des Wnt-Signalweges. Dabei bindet *WIF1* nicht an den Rezeptor, sondern direkt an Wnt Liganden und verhindert damit die Aktivierung des Signalweges (Kawano and Kypta, 2003). Eine epigenetische Stilllegung des *WIF1* Gens wurde unter anderem bei Melanomzelllinien (Lin et al., 2007) und malignen Tumoren des Kolons (Belshaw et al., 2008) nachgewiesen. Um zu überprüfen, ob *WIF1* ebenfalls im Hepatoblastom epigenetisch stillgelegt ist, wurde der Methylierungsstatus des *WIF1* Promoters untersucht. Bei allen Hepatoblastomen und in den verwendeten Zelllinien lag eine starke Methylierung vor. Da jedoch auch die Normalgewebe eine Methylierung zeigten, musste ein methodisches Problem durch unspezifische Primerbindung in der MSP ausgeschlossen werden. Daher wurden für die entsprechende Promoterregion verschiedene Primer verwendet, jedoch immer mit einem gleich bleibenden Ergebnis. Somit muss davon ausgegangen werden, dass auch die Normalgewebe in der untersuchten Promoterregion eine Methylierung tragen. Belegt wird diese Annahme durch die Arbeit von Belshaw et al., in der ebenfalls kein Unterschied des *WIF1* Methylierungsstatus zwischen Normalgewebe und Tumor gefunden wurde (Belshaw et al., 2008). Die anschließende Analyse der *WIF1* Genexpression sollte eine Aussage über die Relevanz der Methylierung treffen. Es zeigte sich jedoch ein ähnliches Ergebnis, wie bei *DKK1*. Trotz Methylierung wurde in 21/24 primären Tumoren eine erhöhte *WIF1* Expression im Vergleich zum Normalgewebe festgestellt. Da bei der MSP sowohl für den methylierten als auch für den unmethylierten Zustand Produkte nachweisbar waren, kann angenommen werden, dass eine partielle Methylierung vorliegt, welche die Genexpression nicht beeinflusst. Die Überexpression von *WIF1* könnte wie beim *DKK1* auf eine Besonderheit im Hepatoblastom hinweisen. Dabei versucht die Zelle einen negativen Feedback-Mechanismus anzuschalten, um den konstitutiv aktiven Wnt-Signalweg aufgrund von *β-Catenin* Mutationen zu inhibieren. In keiner anderen

Tumorart wurde dieses Phänomen beobachtet. So liegt *WIF1* zum Beispiel bei Brustkrebs (Ai et al., 2006), Lungenkrebs (Mazieres et al., 2004) und beim Mesotheliom (Batra et al., 2006) methyliert vor, jedoch ist bei diesen Arbeiten auch eine verminderte *WIF1* Genexpression in den Primärtumoren gezeigt worden. In diesen Fällen wird die Expression von *WIF1* wahrscheinlich durch eine komplette Methylierung unterdrückt. So gehen Ai et al., Mazieres et al. und Batra et al. davon aus, dass allein durch die Repression von *WIF1* ein angeschalteter Wnt-Signalweg in den jeweiligen Tumorarten vorliegt. Untersuchungen von *β-Catenin* Mutationen, die ebenfalls für einen aktiven Wnt-Signalweg verantwortlich sein können, wurden in den erwähnten Arbeiten nicht durchgeführt.

Vergleichbare Ergebnisse zur Literatur gab es bei der Genexpressionsanalyse der Zelllinien. Für HUH6, HepT1 und HepG2 konnte eine *WIF1* Repression und für die Zelllinie HepT3 eine ähnliche *WIF1* Expression wie im Normalgewebe nachgewiesen werden. Dass die *WIF1* Promotermethylierung in den Zelllinien einen Einfluss auf die Genexpression hat, konnte bei der Behandlung der Zelllinien mit den Demethylierungsagenzien 5-Aza und TSA dargelegt werden. Bei allen vier Zelllinien fand ein signifikanter Anstieg der Genexpression nach DNA-Demethylierung statt. Verschiedene Arbeiten zeigen ebenso eine Wiederkehr der *WIF1* Genexpression nach Behandlung der Zelllinien mit Demethylierungsagenzien (Lin et al., 2006), (Clement et al., 2008), (Urakami et al., 2006). Bei den Ergebnissen der MSP sieht man deutlich, dass in den Zelllinien ein vollständig methylierter *WIF1* Promoter vorliegt, da keine Bande für den unmethylierten Zustand zu erkennen ist. Die partielle Methylierung des *WIF1* Promoters, die in den primären Tumoren identifiziert wurde, ist in den Zelllinien nicht mehr vorhanden. Zu vermuten ist, dass durch die langjährige Kultivierung von Zelllinien sich nicht nur Mutationen anreichern, sondern auch Methylierungen in der Zelle vermehrt vorkommen. Da *WIF1* nur in den Zelllinien epigenetisch stillgelegt ist, kann eine direkte Verantwortung bei der Entstehung von Hepatoblastomen nicht bewiesen werden.

*SFRP1* ist ein weiterer negativer Regulator des Wnt-Signalweges. Dieser bindet wie *WIF1* an die Wnt Faktoren und verhindert damit die Aktivierung des Wnt-Signalweges über den FRZ Rezeptor (Kawano and Kypta, 2003). In kolorektalen Tumoren (Suzuki et al., 2004), Magentumoren (Nojima et al., 2007) und in hepatozellulären Karzinomen (Huang et al., 2007) wurde bereits epigenetisch stillgelegtes *SFRP1* identifiziert. Die Untersuchung des Methylierungsstatus und die anschließende Analyse der *SFRP1* Expression zeigten diesmal sowohl in den Hepatoblastomen als auch in den Zelllinien einen Zusammenhang zwischen Methylierung und verminderter Genexpression. 17/24 Tumore hatten im Vergleich zum Normalgewebe eine deutlich verminderte *SFRP1* Expression, 24 % (4/17) dieser Tumore lag methyliert vor. Ebenso waren alle Zelllinien methyliert und zeigten eine stark herabgesetzte

Expression. Diese konnte nach der Behandlung der Zelllinien mit den Demethylierungsagenzien 5-Aza und TSA wieder reaktiviert werden. Vergleichende Ergebnisse aus den bereits genannten Arbeiten von Suzuki et al., Nojima et al. und Huang et al. können eine Reaktivierung der *SFRP1* Expression nach 5-Aza-Behandlung der entsprechenden Zelllinien bestätigen. Nun musste geklärt werden, ob die epigenetische Stilllegung von *SFRP1* Konsequenzen für das Tumorwachstum hat und ob eine Reaktivierung des Inhibitors *SFRP1* das Verhalten der Tumorzellen ändert. Dafür wurden verschiedene funktionelle Analysen durchgeführt.

Entscheidender Faktor war die Reexpression von *SFRP1* in den Zelllinien. Transiente und stabile Transfektionen wurden dafür durchgeführt und zunächst wurde das Proliferationsverhalten der Zelllinien untersucht. Unsere Daten zeigten, dass sowohl im Proliferationsassay bei der transienten *SFRP1* Transfektion als auch im Colony Formation Assay bei den stabilen Transfektanten eine verminderte Proliferation der Zelllinie HUH6 nachweisbar war. Die Überexpression von *SFRP1* in der HUH6 Zelllinie inhibiert daher sowohl das Zellwachstum als auch die Koloniebildung. Die Arbeiten von Shih et al. und Huang et al. bestätigen dieses Ergebnis. Es wurden transfizierte hepatozelluläre Karzinomzelllinien untersucht und eine verminderte Proliferation bei erhöhter *SFRP1* Expression festgestellt (Shih et al., 2007). Damit konnte bereits bei hepatozellulären Karzinomen bewiesen werden, dass *SFRP1* als Tumorsuppressor fungiert (Huang et al., 2007). In weiteren Arbeiten zeigte die Reexpression von *SFRP1* ein ähnliches Verhalten der Zelllinien. SAS und KOSC-3 sind Plattenepithelkarzinom Zelllinien, bei denen *SFRP1* als Tumorsuppressorgen identifiziert wurde, da es ebenfalls die Zellproliferation inhibiert (Sogabe et al., 2008). Ebenso wurde bei stabil transfizierten Magenkarzinom-Zelllinien und bei Lungenkrebs-Zelllinien eine Wachstumssuppression gezeigt (Nojima et al., 2007), (Fukui et al., 2005). Die Stilllegung des *SFRP1* Gens durch Promotermethylierung beeinflusst über die Aktivierung des Wnt-Signalweges die Tumorentstehung und dessen Wachstum.

Für einen aktiven Wnt-Signalweg ist jedoch nicht nur die Inhibition von negativen Regulatoren erforderlich, sondern häufig liegt eine *β-Catenin* Mutation vor, die den Signalweg konstitutiv aktiviert. Die Überexpression von *DKK1* und *WIF1* in den Hepatoblastomen zeigte, dass diese Inhibitoren des Signalweges einen negativen Feedback-Mechanismus auslösen sollen, um den aktiven Wnt-Signalweg auszuschalten. Dies ist jedoch aufgrund von *β-Catenin* oder *APC* Mutationen nicht möglich. Anders scheint der Fall bei *SFRP1* zu sein, bei dem zusätzlich epigenetische Mechanismen auftreten. Eine Überexpression löst in diesem Fall einen negativen Feedback-Mechanismus aus und inhibiert den Wnt-Signalweg. Dass diese Theorie stimmen könnte, zeigen sowohl die Daten

dieser Arbeit als auch Ergebnisse von anderen Arbeitsgruppen. Dass eine erhöhte *SFRP1* Expression das Wachstum von Tumorzellen einschränkt und dabei unabhängig vom  $\beta$ -Catenin Status den kanonischen Wnt-Signalweg inhibiert, wurde als erstes von Suzuki et al. im kolorektalem Karzinom nachgewiesen. Bei der Überexpression von *SFRP1*, *SFRP2* und *SFRP5* wurde ein vermindertes  $\beta$ -Cateninproteinlevel sowohl bei der mutierten Variante als auch bei der Wildtyp Form beobachtet (Suzuki et al., 2004). Ebenso wurde bei der Cotransfektion von *SFRP1* mit mutiertem oder Wildtyp  $\beta$ -Catenin kein Unterschied bei der TCF-vermittelten Transkription im TOP/FOP-Assay festgestellt. Das heißt, dass *SFRP1* die Transkription der Luciferase in diesem Assay unabhängig davon inhibiert, ob eine  $\beta$ -Catenin Mutation vorliegt. Diesen Wirkmechanismus konnte Fukui et al. auch in Lungenkrebs-Zelllinien nachweisen (Fukui et al., 2005). Unsere eigenen Daten stimmen damit überein. Trotzdem die Zelllinie HUH6 eine  $\beta$ -Catenin Mutation besitzt (Koch et al., 1999), erfolgte die inhibitorische Wirkung von *SFRP1* über den kanonischen Wnt-Signalweg. Im TOP/FOP Assay konnte für die stabil transfizierte Zelllinie HUH6 eine signifikant erniedrigte Aktivität des Wnt-Signalweges gezeigt werden. Die  $\beta$ -Catenin vermittelte Transkriptionsaktivierung des Luciferasesgens wurde durch die Reexpression von *SFRP1* inhibiert. Bei der Analyse der Zielgene *MYC* und *CCND1* des Wnt-Signalweges konnte zwar kein signifikanter Unterschied zwischen den transient transfizierten und den unbehandelten Zelllinien festgestellt werden, jedoch ist eine verminderte Expression der Gene *MYC* und *CCND1* in der Zelllinie HUH6 zu erkennen. In der Arbeit von Shih et al. wurde ebenfalls eine verminderte Expression der Zielgene bei stabil transfizierten HUH6 Zellen gezeigt und auch Suzuki et al. bewies im Northern Blot eine verminderte *MYC* Expression in stabil transfizierten Zelllinien. So ist durchaus belegt, dass die Reexpression von *SFRP1*, unabhängig vom  $\beta$ -Catenin Mutationsstatus, den kanonischen Wnt-Signalweg inhibiert und verantwortlich für eine Suppression des Tumorwachstums ist. Für die Entstehung von Hepatoblastomen spielen daher nicht nur somatische Mutationen von *APC* und  $\beta$ -Catenin eine entscheidende Rolle (Koch et al., 1999), (Oda et al., 1996). Die Daten dieser Arbeit zeigen, dass die epigenetische Stilllegung von *SFRP1* ebenfalls zu einem aktiven Wnt-Signalweg führt und damit die Bildung dieser Tumore begünstigt.

Ob die Untersuchung der Zielgene *MYC* und *CCND1* ein geeigneter Weg ist, um auf die Aktivität des Wnt-Signalweges zu schließen, bleibt fraglich. Bei dem Vergleich des  $\beta$ -Catenin Mutationsstatus mit der Expression der Zielgene in den Primärtumoren konnte keine Korrelation festgestellt werden. So führt eine Mutation von  $\beta$ -Catenin nicht unbedingt zu einer erhöhten Expression der spezifischen Zielgene. Dies wurde ebenfalls bei Wilms Tumoren beobachtet, welche  $\beta$ -Catenin Mutationen besaßen (Zirn et al., 2006). In vielen Arbeiten wurde gezeigt, dass  $\beta$ -Catenin Mutationen für einer verminderte Degradierung des

Proteins verantwortlich sind und damit eine Anreicherung im Kern zur Folge haben, jedoch wurde keine Transkriptionsrate der Zielgene untersucht (Jeng et al., 2000), (Park et al., 2001), (Koch et al., 1999). Dass Punktmutationen und Deletionsmutationen von *β-Catenin* durchaus zu einer vermehrten Expression führen können, wurde allerdings nur *in-vitro* mit einem TOP/FOP Assay gezeigt (Wei et al., 2000). Ebenso ist anzumerken, dass die Gene *MYC* und *CCND1* von weiteren Signalwegen wie dem MAPK/ERK-Signalweg beeinflusst werden (Sears and Nevins, 2002), (Klein and Assoian, 2008) und daher keine eindeutige Aussage über die Aktivität des Wnt-Signalweges zulassen, sondern lediglich einen Hinweis liefern.

In dieser Arbeit wurden zum ersten Mal die vier negativen Regulatoren des Wnt-Signalweges APC, DKK1, SFRP1 und WIF1 zusammen einer epigenetischen Analyse im Hepatoblastom unterzogen. Zwar konnten für *APC*, *DKK1* und *WIF1* Methylierungen der Promoterregion nachgewiesen werden, jedoch korrelierte dieses Ergebnis nicht mit einer verminderten Genexpression. Nur die *SFRP1* Genexpression wurde durch epigenetische Mechanismen reguliert und erniedrigt. Die Reexpression von *SFRP1* zeigte vermindertes Zellwachstum und inhibierte unabhängig vom *β-Catenin* Mutationsstatus den Wnt-Signalweg. Die epigenetische Stilllegung von *SFRP1* war bisher ein unbekannter Faktor bei der Entstehung von Hepatoblastomen, spielt jedoch eine große Rolle bei der Tumorentwicklung.

## 6.2. IGF-Signalweg

Im Rahmen dieser Arbeit wurde darüber hinaus der IGF-Signalweg auf epigenetische Veränderungen untersucht. Der IGF-Signalweg besitzt eine regulatorische Funktion in der fetalen Wachstumsphase. Dies wurde zunächst bei Mäusen gezeigt, die einen Verlust des paternalen *IGF2* Allels besaßen. Bei der Geburt betrug ihr Gewicht nur etwa 60% vom normalen Geburtsgewicht (DeChiara et al., 1990). Bei einer Überexpression von *IGF2* hingegen wurde eine starke Zunahme des Geburtsgewichts bei Mäusen beobachtet (Ferguson-Smith et al., 1991). Reguliert wird die *IGF2* Expression durch das nicht-kodierende Gen *H19*. Auf dem paternalen Allel liegt dieses methyliert vor und die Expression von *IGF2* ist aktiv. Auf dem maternalen Allel ist der *H19* Promoter unmethyliert und die Expression von *IGF2* ist inhibiert (Chao and D'Amore, 2008). Bedingt durch diese genomische Prägung ist die Expression von *IGF2* strikt reguliert. Durch fehlerhafte Methylierung des *IGF2/H19*-Lokus (LOI) oder den Verlust des maternalen Allels (LOH) gerät diese Regulation aus dem Gleichgewicht. Wachstumsdefekte wie beim Beckwith-Wiedemann Syndrom sind daher auf eine Überexpression von *IGF2* zurückzuführen (Steenman et al., 2000). Menschen mit dieser Krankheit besitzen eine höhere Inzidenz für



die Ausbildung von Hepatoblastomen. Doch auch in sporadisch auftretenden Tumoren wurden Veränderungen des *IGF2/H19*-Lokus gefunden (Albrecht et al., 1994), (Hartmann et al., 2000). In anderen Arbeiten wurden Wilmstumore und auch Tumore, die erst in späteren Lebensjahren auftreten wie Kolonkarzinome untersucht, diese besaßen ebenfalls einen Defekt im *IGF2/H19*-Lokus (Taniguchi et al., 1995), (Kaneda and Feinberg, 2005). Die Untersuchung des LOI/LOH Status im Rahmen dieser Arbeit ergab bei 30% der primären Tumore einen LOH, 17% der Tumore einen LOI und bei 53% der Tumore einen ROI. Eine ähnliche prozentuale Verteilung wurde auch von Honda et al. beobachtet. Dort wurden 54 Hepatoblastome auf ihren LOI/LOH Status untersucht und mit einer Überexpression von *IGF2* in Verbindung gebracht. Die *IGF2* Expression zwischen LOI und LOH zeigte keinen signifikanten Unterschied (Honda et al., 2008). Im Gegensatz dazu steht die Arbeit von Hartmann et al., in dieser wurden 56 Hepatoblastome untersucht, wovon 25 % einen LOH Status besaßen. Der LOI konnte nur von 5 Tumoren bestimmt werden, da die Analyse über einen SNP (single nucleotide polymorphism) erfolgte, der in den anderen Fällen keine informative Aussage zuließ. Somit kam Hartman et al. zum dem Ergebnis, dass der LOI nicht für eine Überexpression von *IGF2* verantwortlich ist (Hartmann et al., 2000). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen dagegen, dass es in fast allen primären Tumoren zu einer Überexpression des Wachstumsfaktors *IGF2* kommt und die Expression signifikant mit einem LOI/LOH Status assoziiert ist. Dass LOI zu einer gesteigerten Expression von *IGF2* führt, zeigen vergleichende Ergebnisse von Ravenel et al. im Wilmstumor, Kondo et al. bei Lungenkrebs und van Roozendaal et al. bei Brustkrebs (Ravenel et al., 2001), (Kondo et al., 1995), (van Roozendaal et al., 1998). Durch die Aktivierung des maternalen Allels beim LOI, geht Ravenel et al. von einer Verdopplung der *IGF2* Genexpression aus (Ravenel et al., 2001), (Feinberg, 2004). In den untersuchten Tumoren dieser Arbeit war die Expression gegenüber dem normalen Status jedoch bis zu 11fach erhöht. Erklären könnte dies eine Arbeit von Zatkova et al., in der beschrieben wird, dass die Überexpression von *IGF2* im Hepatoblastom auch durch das Onkogen *PLAG1* reguliert werden kann (Zatkova et al., 2004). Ebenso wurde bei neoplastischen Tumoren der Speicheldrüsen gezeigt, dass *PLAG1* die *IGF2* Expression stimuliert (Voz et al., 2000). Daher wurde in dieser Arbeit zusätzlich die *PLAG1* Genexpression untersucht und ergab, dass alle primären Tumore und drei von vier Zelllinien eine deutlich erhöhte *PLAG1* Expression vorwiesen. Die Ergebnisse deuten demnach darauf hin, dass eine Überexpression von *PLAG1* ebenfalls für die deutlich erhöhte *IGF2* Expression verantwortlich ist. Damit sind sowohl genetische als auch epigenetische Mechanismen an der Regulation von *IGF2* im Hepatoblastom beteiligt.

Da die epigenetische Regulation des IGF-Signalweges eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Hepatoblastomen spielt, wurden Analysen des Methylierungsstatus der

beiden Signalwegsinhibitoren IGFBP3 und PTEN durchgeführt. In anderen Arbeiten wurde bereits aufgeführt, dass beide Gene in verschiedenen Tumoren epigenetisch reguliert sind. In Nierentumoren, hepatozellulären Karzinomen, bei Brustkrebs, Magen- und Kolonkarzinomen lag *IGFBP3* methyliert vor (Ibanez de Caceres et al., 2006), (Hanafusa et al., 2002), (Tomii et al., 2007). Auch *PTEN* wurde zuvor auf seinen Methylierungsstatus bei Melanomen und hepatozellulären Karzinomen untersucht (Mirmohammadsadegh et al., 2006), (Wang et al., 2007). Die Methylierungsanalyse des *IGFBP3* Promoters ergab bei allen vier Hepatoblastomzelllinien ein positives Ergebnis. Ebenso konnte für 13 % Tumore eine Methylierung gezeigt werden. Untersucht wurden CpGs, die bei der Expressionsregulation eine entscheidende Rolle spielen. Identifiziert wurden diese CpGs durch Hanafusa et al. bei der Untersuchung des *IGFBP3* Promoters im hepatozellulärem Karzinom (Hanafusa et al., 2002). Die Promoterregion trägt Bindestellen des Tumorsuppressorgens p53 (Hanafusa et al., 2005). Eine Methylierung dieser Region verhindert somit die p53-vermittelte Wachstums-suppression durch IGFBP3. Anschließende Expressionsanalysen konnten die Relevanz der Methylierung bestätigen. Sowohl bei den Zelllinien als auch bei den methylierten Primärtumoren war die *IGFBP3* Expression im Vergleich zum Normalgewebe deutlich niedriger. Die *IGFBP3* Expressionsanalyse ergab jedoch insgesamt eine verminderte Genexpression in 22/23 Tumoren. Folglich muss es neben der epigenetischen Stilllegung noch weitere Mechanismen der *IGFBP3* Genregulation geben. Mannhardt et al. zeigte, dass das Onkogen E7 aus humanen Papillomviren, welche unter anderem Gebärmutterhalskrebs hervorrufen, für eine verminderte Expression von *IGFBP3* verantwortlich ist (Mannhardt et al., 2000). Kommende Versuche müssen klären, welche Mechanismen neben der epigenetischen Stilllegung bei der verminderten *IGFBP3* Expression im Hepatoblastom eine Rolle spielen.

Ein weiterer negativer Regulator des IGF-Signalweges, der auf epigenetische Stilllegung untersucht wurde, ist PTEN. Die Aufgabe von PTEN besteht in der Reduktion von PIP-3 (Phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphat), einem wichtigen Botenstoff, der bei der Regulation des Zellwachstums beteiligt ist (Maehama and Dixon, 1998). Eine verminderte Expression von *PTEN* aktiviert wachstumsfördernde Signalwege, inhibiert die Apoptose und treibt somit die Krebsentstehung voran. In verschiedenen Tumoren wurden Mutationen, Deletionen, Proteininstabilitäten oder epigenetische Stilllegung von *PTEN* gefunden (Ali et al., 1999). Bei Magentumoren und Plattenepithelkarzinomen konnte eine erniedrigte *PTEN* Expression beobachtet werden (Wang et al., 2003), (Shin et al., 2002). Ebenso wurde im hepatozellulären Karzinom ein Verlust der *PTEN* Expression festgestellt (Ma et al., 2005), (Wang et al., 2007). In den Hepatoblastomen ergab die Expressionsanalyse von *PTEN* im Vergleich zum Normalgewebe eine verminderte Expression in 23 von 24 Tumoren. Ob die

Stilllegung des Gens auf epigenetische Mechanismen beruht, wurde mit Hilfe der MSP geklärt. Die Methylierungsanalyse des *PTEN* Promoters ergab, dass weder in den Zelllinien noch in den Primärtumoren eine Methylierung der untersuchten Promoterregion vorlag. Verwendet wurden MSP-Primer, die bereits in anderen Arbeiten einen positiven Methylierungsstatus für *PTEN* in hepatozellulären Karzinomen, Endometriumkarzinomen, Brustkrebs und Kolonkarzinomen zeigten (Zysman et al., 2002), (Wang et al., 2007). Dass *PTEN* durchaus über Methylierung im Hepatoblastom reguliert sein könnte, wurde durch Versuche mit den Demethylierungsagenzien 5-Aza und TSA festgestellt. Nach der Behandlung konnte in den Zelllinien HepT3 und HepG2 eine signifikant erhöhte Expression von *PTEN* gemessen werden. Da mit der MSP nur 3-4 CpGs im Promoterbereich auf Methylierung untersucht wurden, ist es durchaus möglich, dass in einem anderen Bereich methylierte CpGs vorliegen, die für die Regulation der *PTEN* Expression im Hepatoblastom verantwortlich sind. Letztendlich gibt nur die aufwendige Bisulfitsequenzierung des gesamten Promoterbereiches über den Methylierungsstatus aller CpGs Aufschluss. Ein anderer Mechanismus der *PTEN* Transkriptionsregulation ist die Bindung spezifischer Transkriptionsfaktoren wie p53 und NF-kappaB. Beide Gene aktivieren die *PTEN* Expression und inaktivieren damit den wachstumsfördernden IGF-Signalweg (Ma et al., 2005). Letztendlich sind weitere Versuche notwendig, um die genaue Regulation von *PTEN* im Hepatoblastom zu erklären.

Die Behandlung der Zelllinien mit den Demethylierungsagenzien 5-Aza und TSA bestätigte hingegen die epigenetische Regulation von *IGFBP3* im Hepatoblastom. Alle vier Zelllinien zeigten nach der Behandlung eine signifikant erhöhte Expression von *IGFBP3*. Darüber hinaus konnte mit Hilfe der MSP eine Demethylierung der *IGFBP3* Promoterregion nachgewiesen werden. Die Demethylierung der DNA im Promoter des *IGFBP3* Gens reaktiviert somit die Expression und bewirkt eine Verminderung des Tumorzellwachstums. Dass die verminderte Wachstumsrate der Zellen auf eine Reexpression von *IGFBP3* zurückzuführen ist, wurde durch die Transfektion der Zelllinien mit *IGFBP3* cDNA bewiesen. *IGFBP3* wurde in den Zelllinien zunächst transient überexprimiert, wobei die Zelllinie HUH6 im Vitalitätsassay eine deutlich verminderte Wachstumsrate zeigte. Um die Proliferation über einen längeren Zeitraum zu beobachten, wurde *IGFBP3* in stabil transfizierten HUH6 Zellen dauerhaft exprimiert und im Colony Formation Assay analysiert. Es konnte eine signifikante Reduktion der Kolonienzahl festgestellt werden. Nur durch die Reexpression von *IGFBP3* wurde das Wachstum der Tumorzellen verlangsamt. Dass nicht etwa Proteinmodifizierungen die Regulation von *IGFBP3* beeinflussen, wurde von Chang et al. bewiesen. Er zeigte, dass der Protein-Level mit der mRNA Expression von *IGFBP3* übereinstimmt, daher wird die Aktivität von *IGFBP3* allein auf transkriptioneller Ebene reguliert (Chang et al., 2004). Eine

fehlerhafte Regulation durch Hypermethylierung des *IGFBP3* Promoters unterdrückt damit dessen Tumorsuppressoreigenschaften. Bei immortalisierten LFS- (Li-Fraumeni Syndrom) Zelllinien wurden ebenfalls Untersuchungen zum Wachstumsverhalten nach *IGFBP3* Überexpression durchgeführt. Für *IGFBP3* transfizierte Zellen konnte ein verringertes Wachstum bestätigt werden (Fridman et al., 2007). In Nierentumoren wurde wie bei den Hepatoblastomen eine erhöhte *IGFBP3* Expression nach 5-Aza/TSA Behandlung gemessen und eine Demethylierung der Promoterregion gezeigt. Der Methylierungsgrad in den Tumoren war dabei gegenüber dem Normalgewebe deutlich erhöht, so dass Ibanez de Caceres et al. davon ausgeht, dass *IGFBP3* bei der Entstehung von Nierentumoren eine entscheidende Rolle übernimmt und als Marker für molekulare Diagnostik dienen könnte (Ibanez de Caceres et al., 2006). Chang et al. kommt zu einer ähnlichen Schlussfolgerung. Bei Lungenkrebs wurden hypermethylierte Bereiche im Promoter von *IGFBP3* identifiziert und eine verminderte Expression festgestellt. Fortgeschrittene Tumorstadien zeigten dabei öfter Methylierungsereignisse gegenüber frühen Tumorstadien. Ähnliche Ergebnisse wurden auch in dieser Arbeit gefunden. Die drei Patienten mit methyliertem *IGFBP3* waren Hochrisiko-Patienten mit Tumorstadium IV. Zwei Patienten sind an den Folgen des Tumors gestorben, bei dem anderen Patient ist der Verlauf nicht bekannt. Damit könnte methyliertes *IGFBP3* als Marker für späte Tumorstadien dienen, die mit einer schlechten Prognose assoziiert sind und Hoch-Risiko-Patienten kennzeichnen. Beim Lungenkrebs schlägt Chang et al. methyliertes *IGFBP3* als einen Screening Marker für die Früherkennung vor, dies ist jedoch beim Hepatoblastom aufgrund des späten Methylierungsereignisses nicht übertragbar. Weiterhin zeigt er die Möglichkeit von demethylierenden Reagenzien als Therapeutika auf (Chang et al., 2004). Die Reaktivierung von *IGFBP3* vermindert die Zellproliferation und fördert die Apoptose und könnte daher ein geeignetes Mittel für die Verringerung des Tumorwachstums darstellen. Der Einsatz von demethylierenden Substanzen könnte auch im Hepatoblastom einen Erfolg in der Bekämpfung des Tumorwachstums bewirken.

### **6.3. Ausblick - epigenetische Therapeutika und Biomarker**

Dass epigenetische Veränderungen bei der Tumorentstehung eine große Bedeutung haben, zeigt die Entwicklung von epigenetischen Therapeutika, die immer öfter in Kombination mit klassischen Chemotherapeutika oder auch allein bei der Krebstherapie eingesetzt werden. Die epigenetischen Therapeutika unterteilt man in zwei Klassen der DNA-Methylierungsinhibitoren (DNMTi) und Histondeacetylaseinhibitoren (HDACi) (Mulero-Navarro and Esteller, 2008). Einige Inhibitoren wurden bereits als Medikamente für verschiedene Krankheiten eingesetzt, wie zum Beispiel Valproinsäure bei Epilepsie (Strolin Benedetti et al., 1984), bei dem man mittlerweile jedoch auch seine antitumorale Wirkung

entdeckt hat. Da epigenetisch stillgelegte Tumorsuppressorgene im Hepatoblastom identifiziert wurden und bei der Behandlung der Zelllinien mit 5-Aza/TSA eine verminderte Proliferation festgestellt wurde, könnten auch DNMTi und HDACi geeignete Therapeutika für Hepatoblastome darstellen. Zu den am häufigsten untersuchten und verwendeten DNMTi gehören 5-Azacytidin (Vid5-Aza) und 5-Aza-2'-deoxycytidine (Decitabine). Beides sind Nukleotidanaloga, die sich während der Replikation der Zellen in die DNA einlagern und einen inaktiven Komplex mit DNMTs eingehen. Nach mehreren Zellteilungen liegt die DNA unmethyliert vor (Hellebrekers et al., 2007). Nicht-analoga DNMTi lagern sich direkt an das aktive Zentrum der DNMTs an, wobei keine Einlagerung in die DNA erfolgt. Beispiele hierfür sind Procain (Villar-Garea and Esteller, 2003), Epigallocatechin-3-gallat ein Produkt aus grünem Tee (Fang et al., 2003) und das synthetische RG108 (Brueckner et al., 2005). Ziel dieser Inhibitoren ist die Reaktivierung von Tumorsuppressorgenen und die Initiation der Apoptose, um das Tumorwachstum zu stoppen oder den Tumor sogar schrumpfen zu lassen. HDACi sollen eine offene Chromatinkonformation induzieren und somit für eine erhöhte Transkription epigenetisch stillgelegter Gene sorgen. HDACi werden eingeteilt in kurzkettige Fettsäuren, Hydroxaminsäuren, zyklische Tetrapeptide und Benzamine. Trichostatin A (TSA) gehört zu den Hydroxaminsäuren und bindet stark, jedoch reversible an das aktive Zentrum der HDACs (Hellebrekers et al., 2007).

DNMTi und HDACi werden häufig bei Untersuchungen von DNA-Methylierung und Histondeacetylierung im Bereich der Molekularbiologie eingesetzt. Dabei sollen weitere stillgelegte Gene identifiziert werden, die in der Tumorentwicklung eine entscheidende Rolle spielen. Entweder werden einzelne Gene aus bestimmten Signalwegen untersucht, wie in dieser Arbeit, oder es können Microarray Analysen durchgeführt werden, die den Effekt von DNMTi und HDACi auf die Genexpression des gesamten Genoms überprüfen (Karpf, 2007), (Suzuki et al., 2002).

Die Identifizierung epigenetisch stillgelegter Gene wird neben der Aufklärung der Tumorentstehung, immer häufiger für diagnostische Zwecke eingesetzt. DNA kann aus vielen Proben wie Blut, Urin und Gewebe isoliert werden und auch archivierte Proben können zur Detektion von Methylierungsmustern herangezogen werden (Mulero-Navarro and Esteller, 2008). Es gibt viele Beispiele, in denen spezifische Gene hypermethyliert sind oder die Methylierung bestimmter Gene mit einer schlechteren Prognose einhergeht. So liegt *GSTP1* (glutathione S-transferase pi 1) in 80-90 % aller Prostatatumore methyliert vor und ist daher ein idealer Marker für diese Neoplasie (Jeronimo et al., 2001). Die Hypermethylierung von *SFRP1* in Brustkrebs ist assoziiert mit einer geringeren Überlebenschancen (Veeck et al., 2006) und die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass in

Hepatoblastomen die Hypermethylierung von *IGFBP3* mit einer schlechten Prognose und einem bestimmtem Tumorstadium assoziiert ist. Gleichzeitig können methylierte Gene auch über die Behandlung des Krebs entscheiden. Zum Beispiel reagieren Patienten mit methyliertem *MGMT* (O-6-methylguanin-DNA-Methyltransferase), ein Enzym für die DNA-Reparatur, sensitiver auf die Behandlung mit bestimmten Chemotherapeutika (Esteller et al., 2000a). Die fehlerhafte Regulation der DNA-Methylierung und Histonacetylierung ist ein bisher ungeklärtes Phänomen bei Krebszellen. Warum bestimmte Tumorsuppressorgene in verschiedenen Tumoren stillgelegt werden, ist immer noch ein Rätsel. Die Entwicklung von epigenetischen Therapeutika und deren erfolgreicher Einsatz gerade im Bereich hämatologischer Krebserkrankungen (Kaminskas et al., 2005) zeigt jedoch, wie wichtig die Epigenetik bei der Krebsentstehung ist und welches Potential in den epigenetischen Therapeutika steckt.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass in den untersuchten Hepatoblastomen und Zelllinien hypermethylierte Promotorbereiche von *SFRP1* und *IGFBP3* vorliegen. Die Gene sind dadurch epigenetisch stillgelegt. Nach deren Reaktivierung kann ein vermindertes Wachstum der Zelllinien festgestellt werden. Die Inaktivierung des Wnt-Signalweges verdeutlichte dabei eine  $\beta$ -Catenin-unabhängige Regulation des Signalweges durch *SFRP1*. Methyliertes *IGFBP3* konnte darüber hinaus mit einer schlechten Prognose bei Patienten mit Hepatoblastomen in Zusammenhang gebracht werden. *SFRP1* und *IGFBP3* übernehmen daher eine wichtige Rolle bei der Tumorentstehung und könnten in zukünftigen Studien als Angriffspunkte für epigenetische Therapeutika dienen.

## 7. Zusammenfassung

Das Hepatoblastom ist einer der häufigsten Tumoren des Kindesalters. Patienten mit familiärer adenomatöser Polyposis (FAP) besitzen durch Keimbahnmutationen im *APC* Gen eine höhere Inzidenz für die Ausbildung von Hepatoblastomen. Die meisten Fälle treten jedoch sporadisch auf und Mutationen findet man vor allem im Wnt-Signalweg, wobei häufig *β-Catenin*, *APC*, *AXIN1* und *AXIN2* betroffen sind. Ebenfalls ist bekannt, dass im Hepatoblastom der Wachstumsfaktor *IGF2* aufgrund eines LOI (*loss of imprinting*) oder LOH (*loss of heterozygosity*) in der 11p15 Region stark überexprimiert ist und daher auch der IGF-Signalweg die Entstehung von Hepatoblastomen beeinflusst.

Da beide Signalwege für ihre Regulation auch negativ wirkende Komponenten aufweisen und diese über DNA-Methylierung inaktiviert sein könnten, stellte sich die Frage, ob der Wnt- und IGF-Signalweg epigenetischen Veränderungen unterliegt und inwieweit diese die Tumorentstehung beeinflussen. In dieser Arbeit wurden zum ersten Mal alle wichtigen negativen Regulatoren des Wnt- und IGF-Signalweges auf epigenetische Veränderungen im Hepatoblastom untersucht.

Es wurden *APC*, *CDH1*, *DKK1*, *SFRP1*, *WIF1*, *IGFBP3* und *PTEN* auf Methylierungen in ihrer Promoterregion mittels methylspezifischer PCR (MSP) untersucht. Es zeigten jedoch nur *SFRP1* und *IGFBP3* Promotermethylierungen, die auch mit einer verminderten Genexpression assoziiert waren. Bei den anderen Genen korrelierte entweder die gefundene Methylierung nicht mit der Genexpression oder die Gene lagen unmethyliert vor. Diese Ergebnisse ließen vermuten, dass nur *SFRP1* und *IGFBP3* in den Hepatoblastomen epigenetisch reguliert werden. Dass epigenetische Veränderungen eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von Hepatoblastomen spielen, zeigte die Analyse des LOI/LOH Status. Fast die Hälfte aller Tumore trugen ein LOI oder LOH und waren im Vergleich zum ROI mit einer signifikant erhöhten *IGF2* Expression assoziiert.

Die anschließende Behandlung der Zelllinien mit dem Demethylierungsagens 5-Aza und dem Histondeacetylaseinhibitor TSA verdeutlichte die epigenetische Regulation von *SFRP1* und *IGFBP3*. Die Expression der Gene wurde während der Behandlung reaktiviert und die Zellen zeigten eine verminderte Zellproliferation. Es folgten funktionelle Analysen bei transienter und stabiler Überexpression von *SFRP1* und *IGFBP3*. Dabei wurde sowohl die Zellproliferation als auch die Koloniebildung untersucht und in beiden Experimenten konnten eine deutlich verminderte Zellteilung beobachtet werden.

Bei der Überexpression von *SFRP1* wurde weiterhin die Aktivität des Signalweges mittels TOP/FOP Assay getestet und die Expression der Zielgene des Wnt-Signalweges bestimmt. Es wurde nachgewiesen, dass die Inhibition des Wnt-Signalweges bei Überexpression von *SFRP1* unabhängig vom  $\beta$ -*Catenin* Mutationsstatus erfolgte. Es wurde mittels Sequenzierung  $\beta$ -*Catenin* Mutationen bestimmt und ebenfalls mit der Expression bekannter Zielgene wie *MYC* und *CCND1* verglichen. Es konnte keine Korrelation zwischen Mutation und Expression der Zielgene festgestellt werden.

Für den *IGFBP3* Methylierungsstatus wurde mit Hilfe der Patientendaten eine Korrelation zwischen Methylierung und Hoch-Risikopatienten mit Tumorstadium IV gefunden. Patienten mit methyliertem *IGFBP3* sind mit einer schlechten Prognose assoziiert.

Es konnte gezeigt werden, dass die Reaktivierung von *SFRP1* das Zellwachstum verringert und den Wnt-Signalweg inhibiert. Ebenfalls führt die Demethylierung und Überexpression von *IGFBP3* zu einer verminderten Zellproliferation. Weiterhin wurde festgestellt, dass Hoch-Risikopatienten mit Tumorstadium IV methyliertes *IGFBP3* tragen. Die Untersuchung von epigenetischen Veränderungen im Wnt- und IGF-Signalweg sollte zum besseren Verständnis bei der Entstehung der Hepatoblastome beitragen. Demethylierende Agenzien könnten somit einen hohen Stellenwert bei der Therapie von Hepatoblastomen einnehmen, einem bösartige Tumor des Kleinkindalters, bei dem Hochrisikopatienten noch immer eine hohe Sterblichkeitsrate aufweisen.



## 8. Literaturverzeichnis

Aguilera, O., Fraga, M. F., Ballestar, E., Paz, M. F., Herranz, M., Espada, J., Garcia, J. M., Munoz, A., Esteller, M., and Gonzalez-Sancho, J. M. (2006). Epigenetic inactivation of the Wnt antagonist DICKKOPF-1 (DKK-1) gene in human colorectal cancer. *Oncogene* 25, 4116-4121.

Ai, L., Tao, Q., Zhong, S., Fields, C. R., Kim, W. J., Lee, M. W., Cui, Y., Brown, K. D., and Robertson, K. D. (2006). Inactivation of Wnt inhibitory factor-1 (WIF1) expression by epigenetic silencing is a common event in breast cancer. *Carcinogenesis* 27, 1341-1348.

Alaminos, M., Davalos, V., Cheung, N. K., Gerald, W. L., and Esteller, M. (2004). Clustering of gene hypermethylation associated with clinical risk groups in neuroblastoma. *J Natl Cancer Inst* 96, 1208-1219.

Albrecht, S., von Schweinitz, D., Waha, A., Kraus, J. A., von Deimling, A., and Pietsch, T. (1994). Loss of maternal alleles on chromosome arm 11p in hepatoblastoma. *Cancer Res* 54, 5041-5044.

Ali, I. U., Schriml, L. M., and Dean, M. (1999). Mutational spectra of PTEN/MMAC1 gene: a tumor suppressor with lipid phosphatase activity. *J Natl Cancer Inst* 91, 1922-1932.

Antequera, F. (2003). Structure, function and evolution of CpG island promoters. *Cell Mol Life Sci* 60, 1647-1658.

Batra, S., Shi, Y., Kuchenbecker, K. M., He, B., Reguart, N., Mikami, I., You, L., Xu, Z., Lin, Y. C., Clement, G., and Jablons, D. M. (2006). Wnt inhibitory factor-1, a Wnt antagonist, is silenced by promoter hypermethylation in malignant pleural mesothelioma. *Biochem Biophys Res Commun* 342, 1228-1232.

Behrens, J. (1999). Cadherins and catenins: role in signal transduction and tumor progression. *Cancer Metastasis Rev* 18, 15-30.

Belshaw, N. J., Elliott, G. O., Foxall, R. J., Dainty, J. R., Pal, N., Coupe, A., Garg, D., Bradburn, D. M., Mathers, J. C., and Johnson, I. T. (2008). Profiling CpG island field methylation in both morphologically normal and neoplastic human colonic mucosa. *Br J Cancer* 99, 136-142.

Bestor, T. H. (2000). The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet* 9, 2395-2402.

Bird, A. P. (1986). CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature* 321, 209-213.

Brueckner, B., Garcia Boy, R., Siedlecki, P., Musch, T., Kliem, H. C., Zielenkiewicz, P., Suhai, S., Wiessler, M., and Lyko, F. (2005). Epigenetic reactivation of tumor suppressor genes by a novel small-molecule inhibitor of human DNA methyltransferases. *Cancer Res* 65, 6305-6311.

Buendia, M. A. (2002). Genetic alterations in hepatoblastoma and hepatocellular carcinoma: common and distinctive aspects. *Med Pediatr Oncol* 39, 530-535.

- Chang, Y. S., Wang, L., Suh, Y. A., Mao, L., Karpen, S. J., Khuri, F. R., Hong, W. K., and Lee, H. Y. (2004). Mechanisms underlying lack of insulin-like growth factor-binding protein-3 expression in non-small-cell lung cancer. *Oncogene* *23*, 6569-6580.
- Chao, W., and D'Amore, P. A. (2008). IGF2: epigenetic regulation and role in development and disease. *Cytokine Growth Factor Rev* *19*, 111-120.
- Christman, J. K. (2002). 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy. *Oncogene* *21*, 5483-5495.
- Clement, G., Guilleret, I., He, B., Yagui-Beltran, A., Lin, Y. C., You, L., Xu, Z., Shi, Y., Okamoto, J., Benhattar, J., and Jablons, D. (2008). Epigenetic alteration of the Wnt inhibitory factor-1 promoter occurs early in the carcinogenesis of Barrett's esophagus. *Cancer Sci* *99*, 46-53.
- Clevers, H. (2006). Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* *127*, 469-480.
- Csepregi, A., Rocken, C., Hoffmann, J., Gu, P., Saliger, S., Muller, O., Schneider-Stock, R., Kutzner, N., Roessner, A., Malfertheiner, P., and Ebert, M. P. (2008). APC promoter methylation and protein expression in hepatocellular carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* *134*, 579-589.
- DeChiara, T. M., Efstratiadis, A., and Robertson, E. J. (1990). A growth-deficiency phenotype in heterozygous mice carrying an insulin-like growth factor II gene disrupted by targeting. *Nature* *345*, 78-80.
- Edwards, C. A., and Ferguson-Smith, A. C. (2007). Mechanisms regulating imprinted genes in clusters. *Curr Opin Cell Biol* *19*, 281-289.
- Esteller, M. (2007). Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat Rev Genet* *8*, 286-298.
- Esteller, M. (2007). Epigenetic gene silencing in cancer: the DNA hypermethylome. *Hum Mol Genet* *16 Spec No 1*, R50-59.
- Esteller, M., Corn, P. G., Baylin, S. B., and Herman, J. G. (2001). A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res* *61*, 3225-3229.
- Esteller, M., Garcia-Foncillas, J., Andion, E., Goodman, S. N., Hidalgo, O. F., Vanaclocha, V., Baylin, S. B., and Herman, J. G. (2000a). Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N Engl J Med* *343*, 1350-1354.
- Esteller, M., Sparks, A., Toyota, M., Sanchez-Cespedes, M., Capella, G., Peinado, M. A., Gonzalez, S., Tarafa, G., Sidransky, D., Meltzer, S. J., *et al.* (2000b). Analysis of adenomatous polyposis coli promoter hypermethylation in human cancer. *Cancer Res* *60*, 4366-4371.
- Fang, M. Z., Wang, Y., Ai, N., Hou, Z., Sun, Y., Lu, H., Welsh, W., and Yang, C. S. (2003). Tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits DNA methyltransferase and reactivates methylation-silenced genes in cancer cell lines. *Cancer Res* *63*, 7563-7570.
- Feinberg, A. P. (2004). The epigenetics of cancer etiology. *Semin Cancer Biol* *14*, 427-432.

- Feinberg, A. P., and Tycko, B. (2004). The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer* 4, 143-153.
- Ferguson-Smith, A. C., Cattanach, B. M., Barton, S. C., Beechey, C. V., and Surani, M. A. (1991). Embryological and molecular investigations of parental imprinting on mouse chromosome 7. *Nature* 351, 667-670.
- Foulstone, E., Prince, S., Zaccheo, O., Burns, J. L., Harper, J., Jacobs, C., Church, D., and Hassan, A. B. (2005). Insulin-like growth factor ligands, receptors, and binding proteins in cancer. *J Pathol* 205, 145-153.
- Fridman, A. L., Rosati, R., Li, Q., and Tainsky, M. A. (2007). Epigenetic and functional analysis of IGFBP3 and IGFBPPr1 in cellular immortalization. *Biochem Biophys Res Commun* 357, 785-791.
- Fukui, T., Kondo, M., Ito, G., Maeda, O., Sato, N., Yoshioka, H., Yokoi, K., Ueda, Y., Shimokata, K., and Sekido, Y. (2005). Transcriptional silencing of secreted frizzled related protein 1 (SFRP 1) by promoter hypermethylation in non-small-cell lung cancer. *Oncogene* 24, 6323-6327.
- Fukuzawa, R., Breslow, N. E., Morison, I. M., Dwyer, P., Kusafuka, T., Kobayashi, Y., Becroft, D. M., Beckwith, J. B., Perlman, E. J., and Reeve, A. E. (2004). Epigenetic differences between Wilms' tumours in white and east-Asian children. *Lancet* 363, 446-451.
- Gennigens, C., Menetrier-Caux, C., and Droz, J. P. (2006). Insulin-Like Growth Factor (IGF) family and prostate cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 58, 124-145.
- Graff, J. R., Herman, J. G., Lapidus, R. G., Chopra, H., Xu, R., Jarrard, D. F., Isaacs, W. B., Pitha, P. M., Davidson, N. E., and Baylin, S. B. (1995). E-cadherin expression is silenced by DNA hypermethylation in human breast and prostate carcinomas. *Cancer Res* 55, 5195-5199.
- Greger, V., Passarge, E., Hopping, W., Messmer, E., and Horsthemke, B. (1989). Epigenetic changes may contribute to the formation and spontaneous regression of retinoblastoma. *Hum Genet* 83, 155-158.
- Gregorieff, A., and Clevers, H. (2005). Wnt signaling in the intestinal epithelium: from endoderm to cancer. *Genes Dev* 19, 877-890.
- Grimberg, A., and Cohen, P. (2000). Role of insulin-like growth factors and their binding proteins in growth control and carcinogenesis. *J Cell Physiol* 183, 1-9.
- Hahn, W. C., and Weinberg, R. A. (2002). Rules for making human tumor cells. *N Engl J Med* 347, 1593-1603.
- Hanafusa, T., Shinji, T., Shiraha, H., Nouse, K., Iwasaki, Y., Yumoto, E., Ono, T., and Koide, N. (2005). Functional promoter upstream p53 regulatory sequence of IGFBP3 that is silenced by tumor specific methylation. *BMC Cancer* 5, 9.
- Hanafusa, T., Yumoto, Y., Nouse, K., Nakatsukasa, H., Onishi, T., Fujikawa, T., Taniyama, M., Nakamura, S., Uemura, M., Takuma, Y., *et al.* (2002). Reduced expression of insulin-like growth factor binding protein-3 and its promoter hypermethylation in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett* 176, 149-158.
- Harada, K., Toyooka, S., Maitra, A., Maruyama, R., Toyooka, K. O., Timmons, C. F., Tomlinson, G. E., Mastrangelo, D., Hay, R. J., Minna, J. D., and Gazdar, A. F. (2002).

- Aberrant promoter methylation and silencing of the RASSF1A gene in pediatric tumors and cell lines. *Oncogene* 21, 4345-4349.
- Hartmann, W., Waha, A., Koch, A., Goodyer, C. G., Albrecht, S., von Schweinitz, D., and Pietsch, T. (2000). p57(KIP2) is not mutated in hepatoblastoma but shows increased transcriptional activity in a comparative analysis of the three imprinted genes p57(KIP2), IGF2, and H19. *Am J Pathol* 157, 1393-1403.
- Hellebrekers, D. M., Griffioen, A. W., and van Engeland, M. (2007). Dual targeting of epigenetic therapy in cancer. *Biochim Biophys Acta* 1775, 76-91.
- Herman, J. G., and Baylin, S. B. (2003). Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med* 349, 2042-2054.
- Herman, J. G., Graff, J. R., Myohanen, S., Nelkin, B. D., and Baylin, S. B. (1996). Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 9821-9826.
- Honda, S., Arai, Y., Haruta, M., Sasaki, F., Ohira, M., Yamaoka, H., Horie, H., Nakagawara, A., Hiyama, E., Todo, S., and Kaneko, Y. (2008). Loss of imprinting of IGF2 correlates with hypermethylation of the H19 differentially methylated region in hepatoblastoma. *Br J Cancer* 99, 1891-1899
- Huang, J., Zhang, Y. L., Teng, X. M., Lin, Y., Zheng, D. L., Yang, P. Y., and Han, Z. G. (2007). Down-regulation of SFRP1 as a putative tumor suppressor gene can contribute to human hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer* 7, 126.
- Ibanez de Caceres, I., Dulaimi, E., Hoffman, A. M., Al-Saleem, T., Uzzo, R. G., and Cairns, P. (2006). Identification of novel target genes by an epigenetic reactivation screen of renal cancer. *Cancer Res* 66, 5021-5028.
- Jeng, Y. M., Wu, M. Z., Mao, T. L., Chang, M. H., and Hsu, H. C. (2000). Somatic mutations of beta-catenin play a crucial role in the tumorigenesis of sporadic hepatoblastoma. *Cancer Lett* 152, 45-51.
- Jeronimo, C., Usadel, H., Henrique, R., Oliveira, J., Lopes, C., Nelson, W. G., and Sidransky, D. (2001). Quantitation of GSTP1 methylation in non-neoplastic prostatic tissue and organ-confined prostate adenocarcinoma. *J Natl Cancer Inst* 93, 1747-1752.
- Jones, P. A., and Baylin, S. B. (2002). The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 3, 415-428.
- Jones, P. A., and Baylin, S. B. (2007). The epigenomics of cancer. *Cell* 128, 683-692.
- Kaminskas, E., Farrell, A., Abraham, S., Baird, A., Hsieh, L. S., Lee, S. L., Leighton, J. K., Patel, H., Rahman, A., Sridhara, R., *et al.* (2005). Approval summary: azacitidine for treatment of myelodysplastic syndrome subtypes. *Clin Cancer Res* 11, 3604-3608.
- Kaneda, A., and Feinberg, A. P. (2005). Loss of imprinting of IGF2: a common epigenetic modifier of intestinal tumor risk. *Cancer Res* 65, 11236-11240.
- Karpf, A. R. (2007). Epigenomic reactivation screening to identify genes silenced by DNA hypermethylation in human cancer. *Curr Opin Mol Ther* 9, 231-241.
- Kawano, Y., and Kypta, R. (2003). Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. *J Cell Sci* 116, 2627-2634.

Kinderkrebsregister: <http://www.kinderkrebsregister.de/>

Klein, E. A., and Assoian, R. K. (2008). Transcriptional regulation of the cyclin D1 gene at a glance. *J Cell Sci* 121, 3853-3857.

Knudson, A. G. (2001). Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nat Rev Cancer* 1, 157-162.

Koch, A., Denkhaus, D., Albrecht, S., Leuschner, I., von Schweinitz, D., and Pietsch, T. (1999). Childhood hepatoblastomas frequently carry a mutated degradation targeting box of the beta-catenin gene. *Cancer Res* 59, 269-273.

Koch, A., Weber, N., Waha, A., Hartmann, W., Denkhaus, D., Behrens, J., Birchmeier, W., von Schweinitz, D., and Pietsch, T. (2004). Mutations and elevated transcriptional activity of conductin (AXIN2) in hepatoblastomas. *J Pathol* 204, 546-554.

Kondo, M., Suzuki, H., Ueda, R., Osada, H., Takagi, K., Takahashi, T., and Takahashi, T. (1995). Frequent loss of imprinting of the H19 gene is often associated with its overexpression in human lung cancers. *Oncogene* 10, 1193-1198.

Kurahashi, H., Takami, K., Oue, T., Kusafuka, T., Okada, A., Tawa, A., Okada, S., and Nishisho, I. (1995). Biallelic inactivation of the APC gene in hepatoblastoma. *Cancer Res* 55, 5007-5011.

Kraus, J. A., Albrecht, S., Wiestler, O. D., von Schweinitz, D., and Pietsch, T. (1996). Loss of heterozygosity on chromosome 1 in human hepatoblastoma. *Int J Cancer* 67, 467-471.

Land, H., Parada, L. F., and Weinberg, R. A. (1983). Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes. *Nature* 304, 596-602.

LeRoith, D., and Roberts, C. T., Jr. (2003). The insulin-like growth factor system and cancer. *Cancer Lett* 195, 127-137.

Levy, D. B., Smith, K. J., Beazer-Barclay, Y., Hamilton, S. R., Vogelstein, B., and Kinzler, K. W. (1994). Inactivation of both APC alleles in human and mouse tumors. *Cancer Res* 54, 5953-5958.

Lin, Y. C., You, L., Xu, Z., He, B., Mikami, I., Thung, E., Chou, J., Kuchenbecker, K., Kim, J., Raz, D., *et al.* (2006). Wnt signaling activation and WIF-1 silencing in nasopharyngeal cancer cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 341, 635-640.

Lin, Y. C., You, L., Xu, Z., He, B., Yang, C. T., Chen, J. K., Mikami, I., Clement, G., Shi, Y., Kuchenbecker, K., *et al.* (2007). Wnt inhibitory factor-1 gene transfer inhibits melanoma cell growth. *Hum Gene Ther* 18, 379-386.

Ma, D. Z., Xu, Z., Liang, Y. L., Su, J. M., Li, Z. X., Zhang, W., Wang, L. Y., and Zha, X. L. (2005). Down-regulation of PTEN expression due to loss of promoter activity in human hepatocellular carcinoma cell lines. *World J Gastroenterol* 11, 4472-4477.

Maehama, T., and Dixon, J. E. (1998). The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J Biol Chem* 273, 13375-13378.

Mannhardt, B., Weinzimer, S. A., Wagner, M., Fiedler, M., Cohen, P., Jansen-Durr, P., and Zwerschke, W. (2000). Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein binds and inactivates growth-inhibitory insulin-like growth factor binding protein 3. *Mol Cell Biol* 20, 6483-6495.

- Manning, B. D., and Cantley, L. C. (2007). AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 129, 1261-1274.
- Mazieres, J., He, B., You, L., Xu, Z., Lee, A. Y., Mikami, I., Reguart, N., Rosell, R., McCormick, F., and Jablons, D. M. (2004). Wnt inhibitory factor-1 is silenced by promoter hypermethylation in human lung cancer. *Cancer Res* 64, 4717-4720.
- Meyers, R. L. (2007). Tumors of the liver in children. *Surg Oncol* 16, 195-203.
- Mirmohammadsadegh, A., Marini, A., Nambiar, S., Hassan, M., Tannapfel, A., Ruzicka, T., and Hengge, U. R. (2006). Epigenetic silencing of the PTEN gene in melanoma. *Cancer Res* 66, 6546-6552.
- Morison, I. M., and Reeve, A. E. (1998). Insulin-like growth factor 2 and overgrowth: molecular biology and clinical implications. *Mol Med Today* 4, 110-115.
- Mulero-Navarro, S., and Esteller, M. (2008). Epigenetic biomarkers for human cancer: the time is now. *Crit Rev Oncol Hematol* 68, 1-11.
- Nojima, M., Suzuki, H., Toyota, M., Watanabe, Y., Maruyama, R., Sasaki, S., Sasaki, Y., Mita, H., Nishikawa, N., Yamaguchi, K., *et al.* (2007). Frequent epigenetic inactivation of SFRP genes and constitutive activation of Wnt signaling in gastric cancer. *Oncogene* 26, 4699-4713.
- Nomoto, S., Kinoshita, T., Kato, K., Otani, S., Kasuya, H., Takeda, S., Kanazumi, N., Sugimoto, H., and Nakao, A. (2007). Hypermethylation of multiple genes as clonal markers in multicentric hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer* 97, 1260-1265.
- Oda, H., Imai, Y., Nakatsuru, Y., Hata, J., and Ishikawa, T. (1996). Somatic mutations of the APC gene in sporadic hepatoblastomas. *Cancer Res* 56, 3320-3323.
- Park, W. S., Oh, R. R., Park, J. Y., Kim, P. J., Shin, M. S., Lee, J. H., Kim, H. S., Lee, S. H., Kim, S. Y., Park, Y. G., *et al.* (2001). Nuclear localization of beta-catenin is an important prognostic factor in hepatoblastoma. *J Pathol* 193, 483-490.
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29, e45.
- Prokurat, A., Kluge, P., Kosciesza, A., Perek, D., Kappeler, A., and Zimmermann, A. (2002). Transitional liver cell tumors (TLCT) in older children and adolescents: a novel group of aggressive hepatic tumors expressing beta-catenin. *Med Pediatr Oncol* 39, 510-518.
- Rainier, S., Dobry, C. J., and Feinberg, A. P. (1995). Loss of imprinting in hepatoblastoma. *Cancer Res* 55, 1836-1838.
- Rainier, S., Johnson, L. A., Dobry, C. J., Ping, A. J., Grundy, P. E., and Feinberg, A. P. (1993). Relaxation of imprinted genes in human cancer. *Nature* 362, 747-749.
- Ravenel, J. D., Broman, K. W., Perlman, E. J., Niemitz, E. L., Jayawardena, T. M., Bell, D. W., Haber, D. A., Uejima, H., and Feinberg, A. P. (2001). Loss of imprinting of insulin-like growth factor-II (IGF2) gene in distinguishing specific biologic subtypes of Wilms tumor. *J Natl Cancer Inst* 93, 1698-1703.
- Reik, W. (2007). Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. *Nature* 447, 425-432.

- Sato, H., Suzuki, H., Toyota, M., Nojima, M., Maruyama, R., Sasaki, S., Takagi, H., Sogabe, Y., Sasaki, Y., Idogawa, M., *et al.* (2007). Frequent epigenetic inactivation of DICKKOPF family genes in human gastrointestinal tumors. *Carcinogenesis* 28, 2459-2466.
- Scarano, M. I., Strazzullo, M., Matarazzo, M. R., and D'Esposito, M. (2005). DNA methylation 40 years later: Its role in human health and disease. *J Cell Physiol* 204, 21-35.
- Scotting, P. J., Walker, D. A., and Perilongo, G. (2005). Childhood solid tumours: a developmental disorder. *Nat Rev Cancer* 5, 481-488.
- Sears, R. C., and Nevins, J. R. (2002). Signaling networks that link cell proliferation and cell fate. *J Biol Chem* 277, 11617-11620.
- Shih, Y. L., Hsieh, C. B., Lai, H. C., Yan, M. D., Hsieh, T. Y., Chao, Y. C., and Lin, Y. W. (2007). SFRP1 suppressed hepatoma cells growth through Wnt canonical signaling pathway. *Int J Cancer* 121, 1028-1035.
- Shin, K. H., Kim, J. M., Rho, K. S., Park, K. H., Oh, J. E., and Min, B. M. (2002). Inactivation of the PTEN gene by mutation, exonic deletion, and loss of transcript in human oral squamous cell carcinomas. *Int J Oncol* 21, 997-1001.
- Smith, K. J., Johnson, K. A., Bryan, T. M., Hill, D. E., Markowitz, S., Willson, J. K., Paraskeva, C., Petersen, G. M., Hamilton, S. R., Vogelstein, B., and *et al.* (1993). The APC gene product in normal and tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 2846-2850.
- Sogabe, Y., Suzuki, H., Toyota, M., Ogi, K., Imai, T., Nojima, M., Sasaki, Y., Hiratsuka, H., and Tokino, T. (2008). Epigenetic inactivation of SFRP genes in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oncol* 32, 1253-1261.
- Steenman, M., Westerveld, A., and Mannens, M. (2000). Genetics of Beckwith-Wiedemann syndrome-associated tumors: common genetic pathways. *Genes Chromosomes Cancer* 28, 1-13.
- Strolin Benedetti, M., Rumigny, J. F., and Dostert, P. (1984). [Mechanisms of action and biochemical toxicology of valproic acid]. *Encephale* 10, 177-188.
- Suzuki, H., Gabrielson, E., Chen, W., Anbazhagan, R., van Engeland, M., Weijnenberg, M. P., Herman, J. G., and Baylin, S. B. (2002). A genomic screen for genes upregulated by demethylation and histone deacetylase inhibition in human colorectal cancer. *Nat Genet* 31, 141-149.
- Suzuki, H., Watkins, D. N., Jair, K. W., Schuebel, K. E., Markowitz, S. D., Chen, W. D., Pretlow, T. P., Yang, B., Akiyama, Y., Van Engeland, M., *et al.* (2004). Epigenetic inactivation of SFRP genes allows constitutive WNT signaling in colorectal cancer. *Nat Genet* 36, 417-422.
- Suzuki, M., Shigematsu, H., Shivapurkar, N., Reddy, J., Miyajima, K., Takahashi, T., Gazdar, A. F., and Frenkel, E. P. (2006). Methylation of apoptosis related genes in the pathogenesis and prognosis of prostate cancer. *Cancer Lett* 242, 222-230.
- Swarts, S., Wisecarver, J., and Bridge, J. A. (1996). Significance of extra copies of chromosome 20 and the long arm of chromosome 2 in hepatoblastoma. *Cancer Genet Cytogenet* 91, 65-67.

- Tomii, K., Tsukuda, K., Toyooka, S., Dote, H., Hanafusa, T., Asano, H., Naitou, M., Doihara, H., Kisimoto, T., Katayama, H., *et al.* (2007). Aberrant promoter methylation of insulin-like growth factor binding protein-3 gene in human cancers. *Int J Cancer* 120, 566-573.
- Turashvili, G., Bouchal, J., Burkadze, G., and Kolar, Z. (2006). Wnt signaling pathway in mammary gland development and carcinogenesis. *Pathobiology* 73, 213-223.
- Urakami, S., Shiina, H., Enokida, H., Kawakami, T., Tokizane, T., Ogishima, T., Tanaka, Y., Li, L. C., Ribeiro-Filho, L. A., Terashima, M., *et al.* (2006). Epigenetic inactivation of Wnt inhibitory factor-1 plays an important role in bladder cancer through aberrant canonical Wnt/beta-catenin signaling pathway. *Clin Cancer Res* 12, 383-391.
- Van Dyck, F., Declercq, J., Braem, C. V., and Van de Ven, W. J. (2007). PLAG1, the prototype of the PLAG gene family: versatility in tumour development (review). *Int J Oncol* 30, 765-774.
- van Roozendaal, C. E., Gillis, A. J., Klijn, J. G., van Ooijen, B., Claassen, C. J., Eggermont, A. M., Henzen-Logmans, S. C., Oosterhuis, J. W., Foekens, J. A., and Looijenga, L. H. (1998). Loss of imprinting of IGF2 and not H19 in breast cancer, adjacent normal tissue and derived fibroblast cultures. *FEBS Lett* 437, 107-111.
- Veeck, J., Niederacher, D., An, H., Klopocki, E., Wiesmann, F., Betz, B., Galm, O., Camara, O., Durst, M., Kristiansen, G., *et al.* (2006). Aberrant methylation of the Wnt antagonist SFRP1 in breast cancer is associated with unfavourable prognosis. *Oncogene* 25, 3479-3488.
- Villar-Garea, A., and Esteller, M. (2003). DNA demethylating agents and chromatin-remodelling drugs: which, how and why? *Curr Drug Metab* 4, 11-31.
- Veeman, M. T., Axelrod, J. D., and Moon, R. T. (2003). A second canon. Functions and mechanisms of beta-catenin-independent Wnt signaling. *Dev Cell* 5, 367-377.
- Vogelstein, B., and Kinzler, K. W. (2004). Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* 10, 789-799.
- von Schweinitz, D., Hecker, H., Schmidt-von-Arndt, G., and Harms, D. (1997). Prognostic factors and staging systems in childhood hepatoblastoma. *Int J Cancer* 74, 593-599.
- Voz, M. L., Agten, N. S., Van de Ven, W. J., and Kas, K. (2000). PLAG1, the main translocation target in pleomorphic adenoma of the salivary glands, is a positive regulator of IGF-II. *Cancer Res* 60, 106-113.
- Wang, J. Y., Huang, T. J., Chen, F. M., Hsieh, M. C., Lin, S. R., Hou, M. F., and Hsieh, J. S. (2003). Mutation analysis of the putative tumor suppressor gene PTEN/MMAC1 in advanced gastric carcinomas. *Virchows Arch* 442, 437-443.
- Wang, L., Wang, W. L., Zhang, Y., Guo, S. P., Zhang, J., and Li, Q. L. (2007). Epigenetic and genetic alterations of PTEN in hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res* 37, 389-396.
- Wang, X. W., and Harris, C. C. (1996). TP53 tumour suppressor gene: clues to molecular carcinogenesis and cancer therapy. *Cancer Surv* 28, 169-196.
- Weber, R. G., Pietsch, T., von Schweinitz, D., and Lichter, P. (2000). Characterization of genomic alterations in hepatoblastomas. A role for gains on chromosomes 8q and 20 as predictors of poor outcome. *Am J Pathol* 157, 571-578.



Wei, Y., Fabre, M., Branchereau, S., Gauthier, F., Perilongo, G., and Buendia, M. A. (2000). Activation of beta-catenin in epithelial and mesenchymal hepatoblastomas. *Oncogene* 19, 498-504.

Weinberg, A. G., and Finegold, M. J. (1983). Primary hepatic tumors of childhood. *Hum Pathol* 14, 512-537.

Wiley, A., Katsaros, D., Chen, H., Rigault de la Longrais, I. A., Beeghly, A., Puopolo, M., Singal, R., Zhang, Y., Amoako, A., Zelterman, D., and Yu, H. (2006). Aberrant promoter methylation of multiple genes in malignant ovarian tumors and in ovarian tumors with low malignant potential. *Cancer* 107, 299-308.

Willert, K., and Jones, K. A. (2006). Wnt signaling: is the party in the nucleus? *Genes Dev* 20, 1394-1404.

Wirhth, O., Waha, A., Weggen, S., Schirmacher, P., Kuhne, T., Goodyer, C. G., Albrecht, S., Von Schweinitz, D., and Pietsch, T. (2003). Overexpression of human Dickkopf-1, an antagonist of wingless/WNT signaling, in human hepatoblastomas and Wilms' tumors. *Lab Invest* 83, 429-434.

Yoshiura, K., Kanai, Y., Ochiai, A., Shimoyama, Y., Sugimura, T., and Hirohashi, S. (1995). Silencing of the E-cadherin invasion-suppressor gene by CpG methylation in human carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 7416-7419.

Yu, J., Ni, M., Xu, J., Zhang, H., Gao, B., Gu, J., Chen, J., Zhang, L., Wu, M., Zhen, S., and Zhu, J. (2002). Methylation profiling of twenty promoter-CpG islands of genes which may contribute to hepatocellular carcinogenesis. *BMC Cancer* 2, 29.

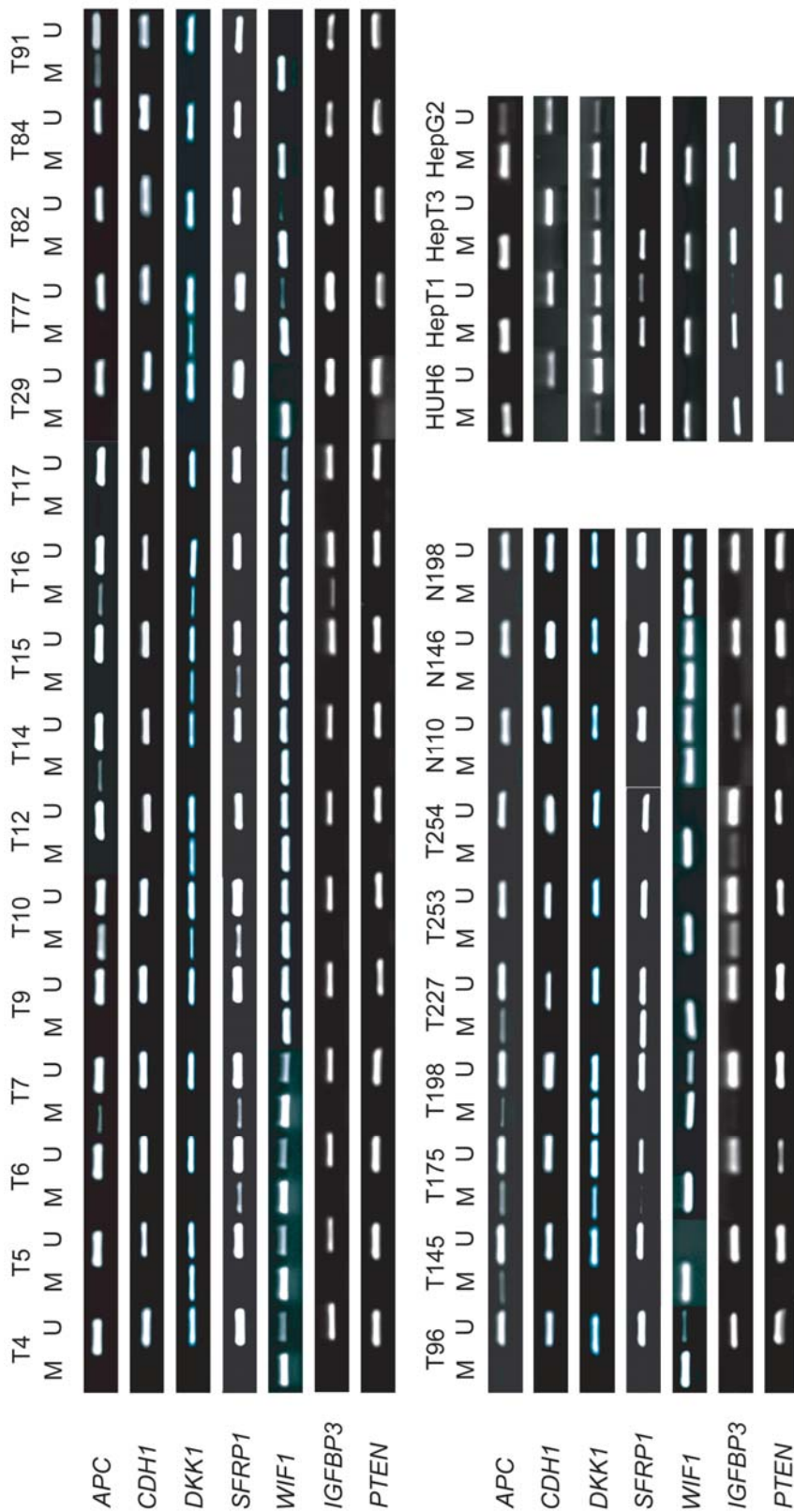
Zatkova, A., Rouillard, J. M., Hartmann, W., Lamb, B. J., Kuick, R., Eckart, M., von Schweinitz, D., Koch, A., Fonatsch, C., Pietsch, T., *et al.* (2004). Amplification and overexpression of the IGF2 regulator PLAG1 in hepatoblastoma. *Genes Chromosomes Cancer* 39, 126-137.

Zirn, B., Samans, B., Wittmann, S., Pietsch, T., Leuschner, I., Graf, N., and Gessler, M. (2006). Target genes of the WNT/beta-catenin pathway in Wilms tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 45, 565-574.

Zysman, M. A., Chapman, W. B., and Bapat, B. (2002). Considerations when analyzing the methylation status of PTEN tumor suppressor gene. *Am J Pathol* 160, 795-800.

## 9. Anhang

Abgebildet sind die Agarosegelbilder der MSPs. Die Ergebnisse wurden in den Bildern 10 und 22 graphisch dargestellt.



---

## 10. Abkürzungsverzeichnis

5-Aza	Aza-2'-deoxy-cytidin
APC	adenomatosis polyposis coli
AT	Annealing Temperatur
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
BWS	Beckwith-Wiedemann Syndrom
C	Cytosin
cDNA	komplementäre DNA
cm	Zentimeter
CpG	Cytosin Phosphodiesterbindung Guanin
CTNNB1	β-Catenin
d	Tag (day)
DKK	dickkopf protein
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNMT	DNA-Methyltransferase
dNTP	Deoxynucleotide Triphosphate
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FAP	Familiären Adenomatösen Polyposis
FBS	Fetal Bovine Serum
G418	Geneticin
G	Guanin
h	Stunden (hour)
HCl	Chlorwasserstoff (Salzsäure)
HR	Hoch-Risiko
IGF	insulin-like growth factor
IGFBP	insulin-like growth factor binding proteins
kb	Kilobasen
k.D.	keine Daten
LOH	Verlust der Heterozygotie (loss of heterozygosity)
LOI	Verlust der genetischen Prägung (loss of imprinting)
M	Mol
mM	Millimol

mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
MSP	Methylspezifische PCR
MTT	Tetrazoliumsalz 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MW	Mittelwert
nm	Nanometer
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase Kettenreaktion
pmol	Pikomol
RNA	Ribonukleinsäure
ROI	Beibehalten der genomischen Prägung (retention of imprinting)
RT	Raumtemperatur
SAM	S-Adenosyl-L-Methionin
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
sec	Sekunden (second)
SFRP	secreted frizzled-related protein
SR	Standard-Risiko
Tab.	Tabelle
U	Unit
Vol.	Volumen
WIF	WNT inhibitory factor
WNT	wingless-type
z.B.	zum Beispiel
µl	Mikroliter

## 11. Publikationen & Tagungsbeiträge

### 11.1. Publikationen

1. Eichenmüller M., Gruner I., Tarimoradi S., Promoli F., Heß I., Kappler R. Identification of *GLI1* target genes in human rhabdomyosarcoma cell lines. *Med. Genet.* (2007) 19:93
2. Eichenmüller M., Gruner I., Tarimoradi S., Müller-Höcker J., von Schweinitz D., Kappler R. Blocking the hedgehog pathway inhibits hepatoblastoma growth. *Hepatology.* 2009 Feb;49(2):482-90
3. Klaus F, Gehring EM, Zürn A, Laufer J, Lindner R, Strutz-Seebohm N, Tavaré JM, Rothstein JD, Boehmer C, Palmada M, Gruner I., Lang UE, Seebohm G, Lang F Regulation of the Na(+)-coupled glutamate transporter EAAT3 by PIKfyve. *Neurochem Int.* 2009 May-Jun; 54 (5-6):372-7
4. Rexhepaj R., Rotte A., Gruner I., Kempe D., Sopjani M., Föller M., Gehring EM, Mack A., Daniel H., Kuhl D., Lang F. Stimulation of electrogenic intestinal dipeptide transport by the glucocorticoid dexamethasone. *Pflugers Arch.* 2009 Aug 12.
5. Gruner I., Eichenmüller M., Hagl B., von Schweinitz D., Kappler R. (2009) Promoter demethylation and reactivation of *SFRP1* suppresses hepatoblastoma growth. (Manuskript in Vorbereitung)
6. Gruner I., Hagl B., Eichenmüller M., von Schweinitz D., Kappler R. Epigenetic inactivation of *IGFBP3* in advanced hepatoblastoma. (Manuskript in Vorbereitung)
7. Kunert A., Matzner N., Shumilina E., Eichenmüller M., Gruner I., Peinelt C., Penner R., Lang F. Stimulation of mast cell Ca<sup>2+</sup> channel Orai1/STIM1 by the serum- and glucocorticoid-inducible kinase SGK1. (Manuskript in Vorbereitung)
8. Gruner I., Kempe D., & Lang F. Hydration-sensitive cerebral gene expression and cell survival. (Manuskript in Vorbereitung)

## 11.2. Tagungsbeiträge

1. Gruner I., Längst G., von Schweinitz D., Kappler R. (2007) Epigenetic profiling of pediatric cancers. *Klin. Pädiat.* 219: 185
2. Gruner I., Längst G., von Schweinitz D., Kappler R. (2007) Profiling the epigenetic signature of pediatric tumors. *Emma Thaler Research Weekend, Herrsching*
3. Gruner I., Eichenmüller M., Tarimoradi S., Müller-Höcker J., von Schweinitz D., Kappler R. (2008) The hedgehog interacting protein is epigenetically silenced in hepatoblastoma. *Proc. Amer. Assoc. Cancer Res. (AACR Annual Meeting in San Diego)* 49:1026
4. Gruner I., Hagl B., Eichenmüller M., von Schweinitz D., Kappler R. (2008) CpG promoter methylation of Wnt signaling genes in hepatoblastoma. *Klin. Pädiat.* 220:201-202
5. Eichenmüller M., Gruner I., Hagl B., Müller-Höcker J., Häberle B., von Schweinitz D., Kappler R. (2008) Inhibierung des Hedgehog Signalwegs als Therapieansatz beim Hepatoblastom. *104. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kinder- und Jugendmedizin, München*
6. Wagner F., Gruner I., Eichenmüller M., von Schweinitz D., Kappler R. (2009) Blocking IGF2-signaling as a therapeutic option in childhood liver tumors. *10<sup>th</sup> EUPSA - CONGRESS 2009, Graz, Austria*
7. Wagner F., Eichenmüller M., Gruner I., von Schweinitz D., Kappler R. (2009) Blockierung des IGF2-Signalwegs durch Rapamycin in pädiatrischen Lebertumorerkrankungen. *105. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kinder- und Jugendmedizin, Mannheim*
8. Hagl B., Gruner I., Eichenmüller M., Müller-Höcker J., von Schweinitz D., Kappler R. (2009) Rare promoter hypermethylation of Hedgehog associated tumor suppressor genes. *Annual Conference of the German Genetics Society, Köln*
9. Joppien S., Gruner I., Felle M., Hagl B., Längst G., Kappler R. (2009) The mechanism of DNA methylation in tumors of early childhood. *Annual Conference of the German Genetics Society, Köln*

---

## 12. Lebenslauf

### ■ Persönliche Daten

Name: Ivonne Gruner  
Geburtsdatum: 15. März 1979  
Geburtsort: Magdeburg  
Familienstand: ledig  
Staatsangehörigkeit: deutsch

### ■ PostDoc

02/2009 – TU München, Klinikum rechts der Isar, 2. Med. Klinik  
Abt. Gastroenterologie

10/2008 – 01/2009 Physiologisches Institut der Uniklinik Tübingen

### ■ Promotion

04/2006 – 09/2008 Forschungslabor der Kinderchirurgie im Dr. von Haunerschen  
Kinderspital, Ludwig-Maximilian Universität München  
Thema: *Epigenetische Veränderung des Wnt- und IGF-Signalweges im Hepatoblastom*

### ■ Studium

10/1999 – 10/2001 Friedrich-Schiller-Universität, Jena  
Studiengang Lehramt Biologie / Chemie

10/2001 – 09/2005 Friedrich-Schiller-Universität, Jena  
Studiengang Dipl. Biochemie/Molekularbiologie (Note 1,8)

10/2004 – 03/2006 Diplomarbeit am Leibniz-Institut für Altersforschung – Fritz-Lipmann-Institute, Jena  
Thema: *Untersuchung der p53-vermittelten Aktivierung potentieller Promotoren im Gen des Cyclin-Kinase-Inhibitors p21<sup>CIP/WAF1</sup>*

## 13. Danksagung

In der Zeit meiner Promotion haben mich viele Menschen unterstützt. Mit ein paar Zeilen möchte ich mich gern bedanken. Ganz besonderer Dank gilt meinem Betreuer und Doktorvater Dr. Roland Kappler, der mir in den letzten Jahren mit Rat und Tat zur Seite stand. Vielen Dank für die großartige Hilfe bei meinem Forschungsprojekt und die guten Ideen zur Bewerksstellung dieser Arbeit.

Bei Prof. Dietrich von Schweinitz möchte ich mich herzlich bedanken, dass er mir die Möglichkeit gab an der Kinderchirurgischen Klinik die Promotion durchzuführen. Die Tumorentstehung im Kindesalter ist ein spannendes Thema. Sehr gern habe ich mich in die Problematik vertieft und hoffe mit meiner Arbeit zum besseren Verständnis der Hepatoblastomentstehung beitragen zu können.

Den Laboralltag meisterte ich mit Melanie Eichenmüller, Beate Hagl, Fatemeh Promoli und Sharareh Tarimoradi, vielen lieben Dank fürs Zuhören, Zeigen, Diskutieren, Helfen und für die manchmal notwendige Ablenkung.

Ein großes Dankeschön geht an meine Eltern und Großeltern. Schon im Studium konnte ich mich immer auf ihre Hilfe und ihren Beistand verlassen. Sie haben jedes Hoch und Tief während der Promotion miterlebt, haben mich aufgebaut, wenn es mal nicht so gut lief und haben sich mit mir über tolle Ergebnisse gefreut. Vielen Dank, dass ihr immer für mich da wart.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei Andreas bedanken, er hat mir die vielen Wochenenden Freiraum zum Schreiben gegeben, hat Korrektur gelesen und mit mir über die Arbeit diskutiert. Als Fachfremder war es bestimmt nicht immer einfach mir bei meinen Ausführungen zu folgen. Er hat mich großartig unterstützt, danke!