

Aus der Kinderchirurgischen Klinik und Poliklinik  
im Dr. von Haunerschen Kinderspital  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Prof. Dr. med. Dietrich von Schweinitz

# **Validierung prognostisch relevanter Biomarker bei pädiatrischen Tumoren der Leber**

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



Vorgelegt von  
Michaela Hagemann  
aus Frankfurt am Main

2017



Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Roland Kappler

Mitberichterstatter: PD Dr. Irmela Jeremias  
Prof. Dr. Michael Ewers

Betreuung durch die  
promovierte Mitarbeiterin: Dr. rer. nat. Melanie Eichenmüller

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 16.02.2017

*Meinen Eltern*

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom 01.04.2012 bis 15.12.2013 in der Kinderchirurgischen Klinik und Poliklinik des Dr. von Haunerschen Kinderspitals der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt.

Die Arbeit wurde von Prof. Dr. rer. nat. Roland Kappler betreut.

Aus dem Projekt hervorgegangene Veröffentlichungen:

**Publikationen:**

Beck A, Eberherr C, Hagemann M, Cairo S, Häberle B, Vokuhl C, von Schweinitz D, Kappler R; **Connectivity map identifies HDAC inhibition as an effective treatment of high-risk hepatoblastoma**; *Cancer Biol Ther.* 2016 Nov; 17(11):1168-1176

Eichenmüller M, Trippel F, Kreuder M, Beck A, Schwarzmayr T, Häberle B, Cairo S, Leuschner I, von Schweinitz D, Strom TM, Kappler R; **The genomic landscape of hepatoblastoma and their progenies with HCC-like features.**, *J Hepatol.* 2014 Dec;61(6):1312-20

**Tagungsbeiträge:**

Eichenmüller M, Kreuder M, Regel I, Häberle B, Müller-Höcker J, von Schweinitz D, Kappler R; **Evaluating RASSF1 promoter methylation and the 16-gene signature as a prognostic marker in hepatoblastoma**; *J Clin Oncol* 30: 2012 (suppl 30; abstr 63)

Kappler R, Eichenmüller M, Kreuder M, Häberle B, Regel I, von Schweinitz D; **Evaluierung prognostischer Biomarker für das Hepatoblastom**; *Monatsschr Kinderheilkd* 2013; 161: 475

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>8</b>
1.1	Hepatoblastom	8
1.1.1	Epidemiologie	8
1.1.2	Ätiologie und Pathogenese	9
1.1.3	Klinik	10
1.1.4	Diagnostik	11
1.1.5	Staging	11
1.1.6	Therapie	13
1.2	Hepatozelluläres Karzinom	13
1.3	Einführung zu Biomarkern	14
1.4	Aktueller Stand der Hepatoblastom-Forschung	15
1.4.1	β-Catenin im Wnt-Signalweg und dessen Einfluss auf die Tumorentstehung	16
1.4.2	Die Rolle der Hedgehog-Kaskade in der Hepatoblastomogenese	17
1.4.3	Der IGF2-Signalweg beeinflusst das Wachstumsverhalten von Hepatoblastomen	19
1.4.4	Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen durch DNA-Hypermethylierung	20
1.4.5	Die 16-Gen-Signatur zur Einteilung des Hepatoblastoms	21
1.4.5.1	Die C1-Gene	24
1.4.5.2	Die C2-Gene	25
<b>2</b>	<b>Zielstellung der Arbeit</b>	<b>28</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>30</b>
3.1	Verwendete Materialien	30
3.2	Geräte	34
3.3	Software	35
3.4	Zellbiologische Methoden	36
3.5	Molekularbiologische Methoden	37
3.5.1	RNA-Isolierung	37
3.5.2	DNase-Verdau und RNA Aufreinigung	38
3.5.3	cDNA-Synthese	38
3.5.4	Quantitative <i>real-time</i> PCR	39
3.6	Statistische Analysen	40
<b>4</b>	<b>Resultate</b>	<b>42</b>
4.1	Einteilung der Hepatoblastome in zwei Gruppen anhand ihrer Gen-Signatur	42
4.1.1	Ermittlung der Genprofile beider Gruppen mittels qRT-PCR	42
4.1.2	Die Clusteranalyse der Tumoren führt zur eindeutigen Zuordnung	43
4.1.3	Genprofil eines Normalleberpräparates	45
4.1.4	Die Höhe der Genexpression ist relevant für die Klassifizierung des Tumors	45

4.1.5	Genprofil eines kindlichen hepatozellulären Karzinoms (HCC)	49
4.1.6	Genprofil von Hepatoblastom- und HCC-Zelllinien	50
4.2	Korrelation der 16-Gen-Signatur mit klinischen Parametern	52
4.2.1	Das Patientenüberleben korreliert signifikant mit ihrer Gruppenzugehörigkeit	52
4.2.2	Korrelation weiterer klinischer Marker mit der 16-Gen-Signatur	53
4.2.3	Epigenetische Modifizierung der Gene <i>RASSF1A</i> und <i>SFRP1</i>	55
4.2.4	Zusammenfassung der Korrelationen der 16-Gen-Signatur	56
4.3	Gene aus anderen Signalwegen korrelieren mit C1 und C2	56
4.4	Klinische Parameter korrelieren mit epigenetischen Markern	59
4.4.1	<i>RASSF1A</i> als präziser prognostischer Marker für das Outcome	59
4.4.2	Hypermethylierung von <i>IGFBP3</i> korreliert mit invasivem Tumorwachstum	61
4.4.3	Hypermethylierung von <i>SFRP1</i> korreliert mit dem R1-Resektionsstatus	63
4.4.4	Die Methylierung von <i>HHIP</i> korreliert nicht mit klinischen Daten	65
4.5	Reduzierung der 16-Gen-Signatur auf sechs Gene	65
4.6	Zusammenfassende Beurteilung der Resultate	67
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>69</b>
5.1	Unterschiede und Gemeinsamkeiten im klinischen Verlauf der Patienten	70
5.2	Die 16-Gen-Signatur als prognostischer Marker für das Hepatoblastom	71
5.3	Anwendbarkeit der 16-Gen-Signatur auf HCCs und Zelllinien	73
5.3.1	Hepatozelluläre Karzinome weisen überwiegend ein C1-Profil auf	73
5.3.2	Zelllinien haben durchweg ein C2-Profil	74
5.4	Evaluation der 16-Gen-Signatur	74
5.5	<i>RASSF1A</i> liefert signifikante prognostische Aussagen für das Überleben	75
5.6	Korrelation der Expression von <i>IGFBP3</i> und <i>SFRP1</i> mit dem klinischen Verlauf	77
5.7	Weitere Biomarker des Hepatoblastoms	78
5.7.1	Der Hedgehog-Signalweg beherbergt potenzielle Biomarker	78
5.7.2	AFP – der wichtigste klinische Parameter für das Hepatoblastom	79
5.8	Identifikation neuer Marker durch Exome Sequencing	80
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>82</b>
<b>7</b>	<b>Abbildungs- und Tabellenverzeichnis</b>	<b>83</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>85</b>
<b>9</b>	<b>Anhang</b>	<b>98</b>

## 1 Einleitung

Primäre Neoplasien der Leber kommen im Kindesalter mit einer Inzidenz von 0,5-2 auf 1 Millionen Kinder in Mitteleuropa allgemein sehr selten vor. Jedoch sind zwei Drittel dieser Neoplasien maligne und erfordern unsere besondere Aufmerksamkeit [1]. Die beiden häufigsten malignen Tumoren sind das Hepatoblastom [2] und das hepatozelluläre Karzinom (HCC). Während das Hepatoblastom vorwiegend bei Kindern unter 3 Jahren auftritt, tritt das hepatozelluläre Karzinom bei Kindern zwischen 12 und 15 Jahren auf [3]. Trotz moderner chirurgischer und onkologisch-internistischer Verfahren gilt es, die Diagnostik und die prognostische Abschätzung dieser Erkrankungen zu verbessern um die Überlebensraten weiter zu steigern.

### 1.1 Hepatoblastom

#### 1.1.1 Epidemiologie

Das Hepatoblastom ist mit einem Anteil von 43% aller kindlichen Lebertumoren die häufigste maligne Neoplasie der Leber und betrifft überwiegend Säuglinge und Kleinkinder zwischen 6 Monaten und 3 Jahren [1]. Assoziiert ist es mit einer Reihe von kongenitalen Anomalien wie dem Beckwith-Wiedemann-Syndrom (BWS) [4], einem genetisch bedingten Großwuchs-Syndrom, sowie der familiären adenomatösen Polyposis (FAP) [5], einer autosomal-dominant vererbten Krankheit, die sich in dem massiven Befall des Dickdarms mit Polypen äußert. Ein gehäuftes Vorkommen des Hepatoblastoms lässt sich außerdem nach extremer Frühgeburt mit niedrigem Geburtsgewicht des Neugeborenen beobachten [6; 7]. Durch die stetig erhöhten Überlebenschancen von Frühgeborenen lässt sich auch die ansteigende Inzidenz der Hepatoblastome in den letzten Jahren erklären [8].

---

### 1.1.2 Ätiologie und Pathogenese

Pathohistologisch handelt es sich bei den Hepatoblastomen um epitheliale, embryonale Tumoren, die sich entsprechend der Stadien der embryonalen Leberentwicklung verschieden differenzieren lassen (fetal, embryonal oder kleinzellig undifferenziert). Man geht davon aus, dass sich Hepatoblastomzellen von pluripotenten hepatischen Stammzellen ableiten, die sich die Möglichkeit vorbehalten, sich entweder in Hepatozyten oder biliäre Epithelzellen zu differenzieren. Für beide Zelltypen werden von der Stammzelle aus Marker wie Cytokeratin 7, hepatisch, oder Cytokeratin 19, biliär, exprimiert, die auch in Hepatoblastomzellen gefunden werden können [9; 10]. Zusätzlich findet sich in manchen Tumoren extramedulläre Erythropoese, also knochenmarksferne rote Blutzellbildung, wie sie normalerweise nur in der fetalen Leber zu finden ist [11]. Dies verdeutlicht, dass es sich beim Hepatoblastom um einen Tumor handelt, der in der embryonalen Leberentwicklung entsteht und bei dem es aufgrund eines bislang unbeschriebenen Defektes nicht zur normalen Ausdifferenzierung der Leber kommt. Das von Tumor veränderte Lebergewebe verharrt in einem Vorläuferstadium.

Histologisch einteilen lassen sich Hepatoblastome anhand der Zellen, die in den Tumoren zu finden sind. Während der fetale Typ durch gleichmäßige, kuboidale Zellen mit niedriger Mitoseaktivität gekennzeichnet ist, zeichnet sich der unreifere embryonale Zelltyp durch hohe Zelldichte, vergrößerte Kerne und häufig ablaufende Mitosen aus [12]. Teilweise können diese Tumoren auch mit mesenchymalen Elementen durchsetzt sein, die unreifes fibröses Gewebe, Spindelzellen und Osteoid enthalten und dann als epithelial-mesenchymaler Mischtyp bezeichnet werden [1]. Ungefähr 5% der Hepatoblastome werden dem Subtyp der kleinzellig undifferenzierten Tumoren zugerechnet und weisen im Vergleich zu den anderen eine deutlich schlechtere Prognose und damit einhergehend das häufigere Auftreten von Rezidiven auf [13].

Immer wieder auftretende Veränderungen auf chromosomaler Ebene geben Hinweise auf zytogenetische Vorgänge in der Tumorgenese des Hepatoblastoms, obwohl sich nach dem aktuellen Standpunkt der Forschung dazu keine einheitliche Aussage treffen lässt. Trisomien der Chromosome 2, 8 und 20, sowie eine Translokation eines Teiles des langen Arms von Chromosom 1 auf Chromosom 4 treten beim Hepatoblastom häufig in Kombination auf [14], lassen jedoch noch keine

Rückschlüsse auf Ursachen oder Prognosen zu, da sie auch bei anderen kindlichen Tumoren auftreten können [15]. Der Verlust der Heterozygotie (*loss of heterozygosity* = LOH) im Bereich des Chromosoms 11p15.5, dem Lokus des Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor 2 (*IGF2*)-Gens, tritt bei einem Drittel aller Hepatoblastome auf und spielt in diesem Zusammenhang eine wesentlich größere Rolle, da er fast pathognomonisch für das Auftreten des BWS ist, welches wie bereits erwähnt ein Risikofaktor für das Auftreten eines Hepatoblastoms ist [16].

Auf molekularer Ebene zeigt sich in 10-62% aller Hepatoblastome eine Veränderung des *adenomatous polyposis coli* [17]-Gens [18; 19], eines Tumor-Suppressor Genes, welches auf Chromosom 5 lokalisiert ist und dessen Inaktivierung die Ursache für die Erkrankung an FAP, einem weiteren Risikofaktor, darstellt. Das *APC*-Gen ist Teil des Wnt-Signalweges, einem embryonalen Signaltransduktionsweg und sorgt für die Regulierung von  $\beta$ -Catenin. Im Hepatoblastom können Mutationen des *APC*-Gens sowie des  *$\beta$ -Catenin*-Gens (*CTNNB1*) festgestellt werden [20], was darauf schließen lässt, dass der Wnt-Signalweg eine Rolle in der Entstehung des Hepatoblastoms spielt.

Auch epigenetische Prozesse scheinen in der Entstehung des Hepatoblastoms von Wichtigkeit zu sein und lassen Aussagen über das Outcome eines Patienten zu. Beispielsweise führt die Methylierung in der Promotorregion des Tumorsuppressorgenes *RASSF1A* dazu, dass der Tumorsuppressor nicht mehr exprimiert wird und es zu einem mehr oder minder ungehinderten Tumorwachstum kommen kann [21]. Diese Veränderung ist in einem Drittel aller Hepatoblastome zu finden [22].

### 1.1.3 Klinik

Hepatoblastome imponieren meist als große, gut durchblutete, unifokale Tumoren, die gehäuft im rechten Leberlappen anzutreffen sind [23]. Im Vergleich zu anderen Tumoren kommt es erst in einem späten und fortgeschrittenen Stadium zu Fernmetastasen und nur selten zur Lymphknoteninfiltrierung. Tritt eine Fernmetastasierung des Tumors auf, was bei ungefähr 20% der Patienten bei Erstdiagnose der Fall ist, sind diese zumeist in der Lunge zu finden [24], sehr selten werden Metastasen im Auge und im zentralen Nervensystem beschrieben [25; 26].

Männliche Kleinkinder sind vom Hepatoblastom häufiger betroffen, außerdem lässt sich eine höhere Prävalenz in der weißen Bevölkerung feststellen [27]. Beklagt ein betroffenes Kind ungewollten Gewichtsverlust, Anorexie, Erbrechen oder Bauchschmerzen, ist von einem fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung auszugehen [28].

#### **1.1.4 Diagnostik**

Labordiagnostisch steht neben der Messung von Routineparametern die Bestimmung des Alpha-Fetoproteins (AFP) als Tumormarker im Vordergrund. AFP gilt als Gegenstück des Serumalbumins des fetalen Stoffwechsels und erreicht 8 bis 12 Monate nach der Geburt ein normal niedriges Niveau [29]. Bei 80 bis 90% der Patienten mit Hepatoblastom jedoch ist AFP exzessiv erhöht, was die Bestimmung von AFP bei dem Verdacht auf eine Raumforderung der Leber unverzichtbar macht [30].

Bereits die Höhe des AFPs kann Aussagen über die Prognose und den Verlauf der Erkrankung liefern. Allgemein tumorverdächtig sind Werte  $>500$  ng/ml. Besonders hohe ( $>1.000.000$  ng/ml), sowie besonders niedrige ( $<100$  ng/ml) Werte sind zudem mit niedrigeren Überlebenschancen der Patienten assoziiert [31; 32]. Die Messung von AFP ist ebenso relevant für die Beurteilung von therapeutischen Erfolgen, sowie für das frühzeitige Entdecken eines Tumorrezidivs [33].

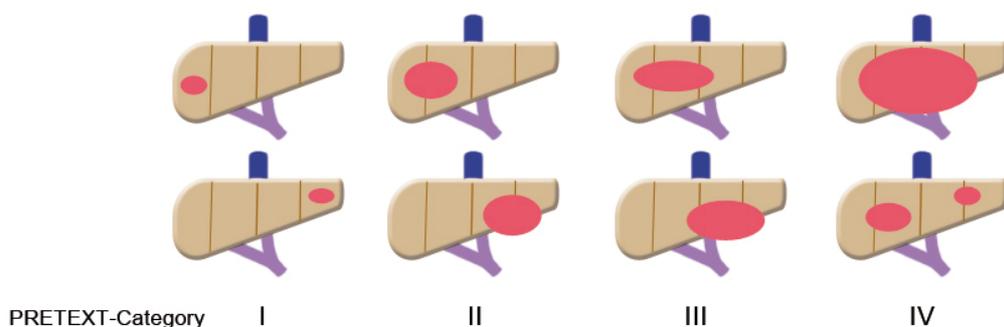
Hepatoblastome werden zumeist sonographisch festgestellt. Weiterführende Bildgebung dient vor allem dem Zweck, die Ausdehnung des Tumors zu bestimmen, mögliche Invasionen in umliegende Organe und Gefäße festzustellen und Metastasen zu finden.

#### **1.1.5 Staging**

Zur Klassifizierung des Hepatoblastoms werden verschiedene Verfahren verwendet, von denen sich zwei im Verlauf der Jahre durchgesetzt haben. Das *Pretreatment Extent of Disease* (PRETEXT)-System, welches von der International Children's Liver Tumor Strategy Group (SIOPEL) im Jahre 1990 entwickelt wurde, beschreibt die Tumorausdehnung vor jeglicher Intervention, um Anhaltspunkte für die

Effizienz einer neoadjuvanten Chemotherapie und die chirurgische Resektabilität zu liefern, und berücksichtigt in seinen Stadien die intra- oder extrahepatische Streuung und Gefäßinvasionen [34]. Das System orientiert sich an den Verzweigungen der Portalvene und teilt die Leber in 4 Quadranten. Der Tumor wird anhand seiner Ausdehnung in die Lebersegmente den vier Stadien zugeteilt. Dies reicht dann von dem Befall eines Quadranten (Stadium 1) bis zum Befall aller vier Quadranten (Stadium 4) (**Abbildung 1-1**). Bei extrahepatischem Befall wird mit einem Buchstaben verdeutlicht, wohin der Tumor infiltrierte: V steht für Ausdehnung in die Vena hepatica, P für Ausdehnung in die Portalvene, E für extrahepatische Tumorausweitung und M für Fernmetastasen. Diese Einteilung liefert einen hohen prognostischen Wert für das Überleben des Patienten sowie für die Dauer seines tumorfreien Intervalls und hat dadurch einen gleichen Stellenwert wie die für Erwachsenentumoren sonst übliche TNM-Klassifikation erlangt [35].

Im Gegensatz zum PRETEXT-Staging, welches die Tumorausdehnung vor einer chirurgischen Intervention beschreibt, befasst sich das Stagingverfahren der US-amerikanischen Children's Oncology Group (COG) mit der Tumorausdehnung nach einer chirurgischen Resektion. Im Stadium 1 konnte der Tumor komplett reseziert werden, im Stadium 2 ist mikroskopisch noch ein Resttumor nachweisbar, im Stadium 3 fand eine inkomplette Resektion mit dem Überbleiben eines makroskopischen Tumors oder eine Lymphknoteninfiltration statt und im Stadium 4 hat der Tumor bereits Fernmetastasen ausgebildet [36]. Prinzipiell können beide Einteilungsverfahren ergänzend benutzt werden; nachgewiesen ist, dass beide mit dem Überleben des Patienten korrelieren [37].



**Abbildung 1-1** Das PRETEXT-Staging der SIOPEL Gruppe aus dem Jahre 1990. Die Stadien beschreiben das Ausmaß der Infiltration des Tumors in die vier Quadranten der Leber. Abbildung modifiziert nach Schnater et al. [38].

### **1.1.6 Therapie**

Die einzige potenzielle Möglichkeit ein Hepatoblastom zu heilen (Restitutio ad integrum) ist die komplette chirurgische Resektion. Diese hat, insbesondere durch die Verbesserung der chemotherapeutischen Maßnahmen in den letzten 3 Jahrzehnten dafür gesorgt, dass die 5-Jahres-Überlebensrate eines Kindes mit Hepatoblastom auf 75% gestiegen ist [38; 39], während sie vor 30 Jahren noch bei ca. 30% lag [9].

Für die Therapie des Hepatoblastoms wird die chirurgische Resektion meist mit einer prä- und postoperativen Chemotherapie kombiniert, da das Hepatoblastom normalerweise gut auf Zytostatika anspricht. Verwendet werden dafür Substanzen wie Vincristin, Doxorubicin, Cyclophosphamid, 5'-Fluorouracil und Cisplatin [40; 41]. Ein großes Problem in der Behandlung des Hepatoblastoms stellt die rasche Resistenzentwicklung gegen die Chemotherapeutika dar. Besonders bei ausgedehnten, gar metastasierten Tumoren reicht die sonst erfolgreiche Chemotherapie nicht aus, um eine komplette Resektabilität des Tumors vor einer Resistenzentwicklung zu erreichen [42].

Es müssen daher Wege gefunden werden auch den übrigen 25% der Kinder mit Hepatoblastomen, die als Hochrisiko-Patienten gelten, da ihre Tumoren extrahepatische Infiltrationen, Gefäßinvasionen oder Fernmetastasen aufweisen und sie mit hoher Wahrscheinlichkeit an den Folgen der Erkrankung sterben werden, neue Therapieverfahren anzubieten und ihre Überlebenschancen dadurch langfristig zu verbessern.

## **1.2 Hepatozelluläres Karzinom**

Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) ist die zweithäufigste maligne Neoplasie der Leber im Kindesalter und tritt im Gegensatz zum Hepatoblastom meistens erst zwischen dem 12. und 15. Lebensjahr auf. Im Erwachsenenalter stellt das HCC den häufigsten malignen Lebertumor dar und ist in Industrienationen vorwiegend auf eine chronische Hepatitis, Leberzirrhose und Alkoholkonsum zurückzuführen [43]. Auch im Kindesalter entwickeln sich schätzungsweise ein Drittel der HCCs auf dem Boden einer hepatischen Erkrankung wie der hereditären Tyrosinämie und dem Alagille-Syndrom [17; 44].

In Entwicklungsländern ist das HCC bei Kindern häufig auf eine perinatal akquirierte Hepatitis B oder C zurückzuführen [45], bei denen der Einbau der viralen DNA zur malignen Transformation der Leberzellen führt. In Mitteleuropa hingegen stellen die chronisch-entzündlichen und stoffwechselbedingten Erkrankungen die Hauptursache dar.

Das HCC wächst häufig von Beginn an multifokal, infiltriert in Gefäße und Umgebung, metastasiert schnell in Lunge und Knochen und weist im Vergleich zum Hepatoblastom eine deutlich schlechtere Prognose auf [46]. Klinisch äußert sich der Tumor in einer ausgeprägten Hepatomegalie, die teilweise mit Bauchschmerzen einhergeht [47]. Labordiagnostisch spielt auch beim HCC das AFP eine entscheidende Rolle als Tumormarker; so findet man eine mittelgradige Erhöhung des AFPs in mindestens 50% aller Tumoren [48].

Allgemein spricht das HCC aufgrund einer sich schnell entwickelnden Chemotherapieresistenz schlecht auf Chemotherapie an, weshalb eine komplette chirurgische Resektion stets angestrebt wird und auch die einzige Heilungschance darstellt. Die Überlebensraten der Patienten sind deshalb so schlecht, weil sich zum Zeitpunkt der Diagnose der Tumor meist schon ausgedehnt hat und eine komplette Resektion nicht mehr möglich ist [17]. So wird bei nicht resektablen Tumoren häufig eine Lebertransplantation in Betracht gezogen [49].

### **1.3 Einführung zu Biomarkern**

Die Etablierung von Biomarkern für verschiedenste Erkrankungen war in den letzten Jahren Bestandteil zahlreicher Forschungsprojekte. Biomarker sind definiert als charakteristische biologische Merkmale, die auf Veränderungen im Körper, oft krankhafte Prozesse, hinweisen können. Dabei handelt es sich häufig um Moleküle, Zellen, Hormone oder Enzyme [50]. Im Allgemeinen sollen sie die Schwere oder das Vorhandensein einer Erkrankung beurteilen, zur frühen Diagnose einer Erkrankung beitragen, Therapieeffekte messen, sowie individuelle Risiken prognostizieren [51]. Sogar zur Entwicklung neuer Therapieansätze werden Biomarker verwendet. Doch wesentlich sind die Aussagen über die Prognose. Verschlechtert oder verbessert sich die Prognose bei Vorhandensein eines Markers und wie ist aufgrund dessen die 5-Jahresüberlebensrate zu beurteilen?

Ein einfacher, prominenter und weit verbreiteter Biomarker ist beispielsweise das Messen der Körpertemperatur bei dem Verdacht auf Fieber. Das Vorhandensein einer erhöhten Körpertemperatur sowie deren Höhe lässt Aussagen über die Schwere und das Ausmaß treffen.

Bei den krankheitsassoziierten Biomarkern ist das Messen der CCP-Antikörper gegen das cyclische citrullinierte Peptid im Zusammenhang mit der Rheumatoiden Arthritis ein Beispiel für einen bewährten, molekularen Biomarker. Mit hoher Sensitivität und Spezifität ist das Vorhandensein dieser Antikörper mit dem Auftreten der Erkrankung assoziiert. Der Marker kann sogar für die Frühdiagnostik verwendet werden und liefert somit die Möglichkeit den Krankheitsbeginn und den Verlauf mit frühzeitiger Therapie abzumildern [52; 53].

In der Tumorforschung spielt die Etablierung von Biomarkern eine enorme Rolle. Vorhersagen über die Aggressivität, den Verlauf und die Prognose einer Krebserkrankung sind sehr begehrt. Auch für die Wahl der Therapie und die Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten kann ein Biomarker daher wegweisend sein. Ein prominentes Beispiel für einen Biomarker einer Tumorerkrankung ist das *KRAS* Gen im kolorektalen Karzinom. Weist ein Patient eine *KRAS*-Mutation auf, ergeben sich neben den prognostischen Aussagen über die Art des Tumors auch therapeutische Konsequenzen, da *KRAS*-positive Tumoren nicht gut auf die gängige Therapie mit EGFR-Inhibitoren ansprechen und somit eine abweichende Therapie angestrebt werden muss [54; 55].

Betrachtet man nun wieder die pädiatrischen Lebertumoren, gibt es im Falle des HCC, wie bereits beschrieben, einen gut anwendbaren Biomarker - das AFP. Für das Hepatoblastom steht die Etablierung eines einheitlich anwendbaren Biomarkers noch aus, weshalb im folgenden Kapitel auf die bisherigen Ansätze detaillierter eingegangen wird.

#### **1.4 Aktueller Stand der Hepatoblastom-Forschung**

In den letzten Jahren sind kontinuierlich ausgereifere und spezifischere Therapien des Hepatoblastoms entwickelt worden. Deshalb sollte man einem Patienten genau jene Therapie zukommen lassen, die er benötigt. Es gilt möglichst zuverlässig und rasch zu bestimmen, welches Erkrankungsprofil ein Patient aufweist,

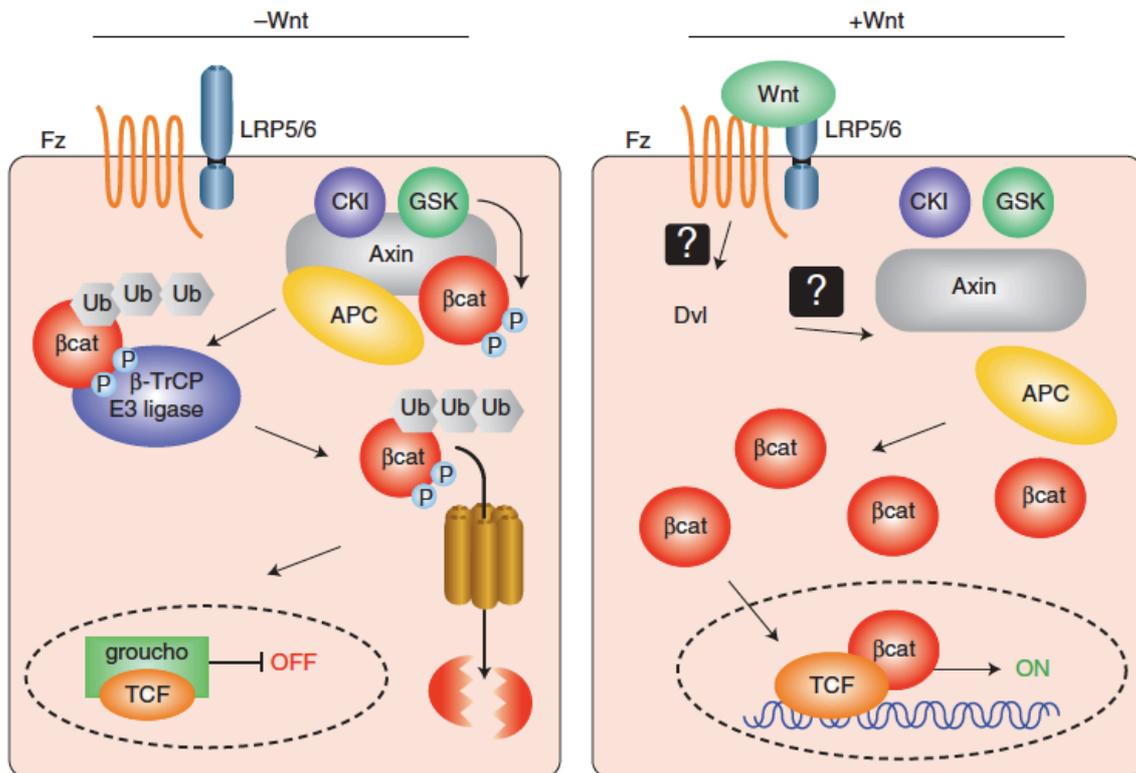
in welchem Stadium der Erkrankung er sich befindet und wie aggressiv sein Tumor einzuschätzen ist.

Verschiedene epigenetische und genetische Marker wurden mit diesem Ziel in den letzten Jahren getestet und es konnten Assoziationen zwischen dem Auftreten einiger dieser Marker und der Einteilung, der Prognostik und dem Verlauf der Erkrankung festgestellt werden.

### 1.4.1 $\beta$ -Catenin im Wnt-Signalweg und dessen Einfluss auf die Tumorentstehung

Das Molekül  $\beta$ -Catenin ist, wie bereits beschrieben, ein Mediator des Wnt-Signalwegs und direkt involviert in Genexpression und Zelladhäsion. In der Leber ist dieser Signalweg verantwortlich für embryonale und metabolische Entwicklung, sowie Hepatoblastendifferenzierung [56]. Eine Deregulation dieses Signalwegs führt demnach zu einer abweichenden Entwicklung der Leber und im Falle des Hepatoblastoms zur Tumorgenese [57]. In der Tat weisen 50 bis 90% aller Hepatoblastome eine Mutation im *CTNNB1* Gen auf, welches für  $\beta$ -Catenin kodiert [58].

Aber auch weitere Mechanismen sorgen im Hepatoblastom für eine Fehlsteuerung des Wnt-Signalwegs. Eine Mutation des *APC* Gens mit resultierender  $\beta$ -Catenin Herunterregulation (siehe Ätiologie und Pathogenese), sowie Mutationen der Negativregulatoren *AXIN1* und *AXIN2* können die Aktivität des Signalwegs beeinflussen [59]. Mutiertes  $\beta$ -Catenin kann nicht abgebaut werden, was zur Akkumulation von freiem  $\beta$ -Catenin im Zytoplasma führt. Dieses akkumulierte  $\beta$ -Catenin transloziert in den Zellkern, wo es an Proteine der TCF-Familie (*T-cell factor*) bindet und dadurch onkogene Zielgene wie *MYC* und *Cyclin D1* aktiviert, die wiederum in der Regulierung von Zellwachstum und Apoptose eine Rolle spielen [60; 61]. Deregulierungen von *MYC* führen beispielsweise zu unkontrolliertem Zellwachstum und verminderter Apoptose und liefern somit einen entscheidenden Beitrag in der Entstehung verschiedenster Tumore [62]. Die nachfolgende **Abbildung 1-2** liefert eine schematische Darstellung des kanonischen Wnt-Signalwegs.



**Abbildung 1-2** Der kanonische Wnt-Signalweg. Links sieht man den regulären Verlauf des Signalwegs mit Abbau des phosphorylierten und ubiquitinylierten β-Catenins durch einen Komplex aus Axin, APC, GSK und CKI. Ist dieser Abbau durch Veränderung von APC, Axin oder β-Catenin selbst gehemmt (rechte Seite), akkumuliert β-Catenin im Zytoplasma und im Zellkern und aktiviert dort über TCF-Transkriptionsfaktoren den Wnt-Signalweg. Dieser führt zu gesteigerter Zellproliferation und verminderter Apoptose. Abbildung nach Cadigan et al. [61].

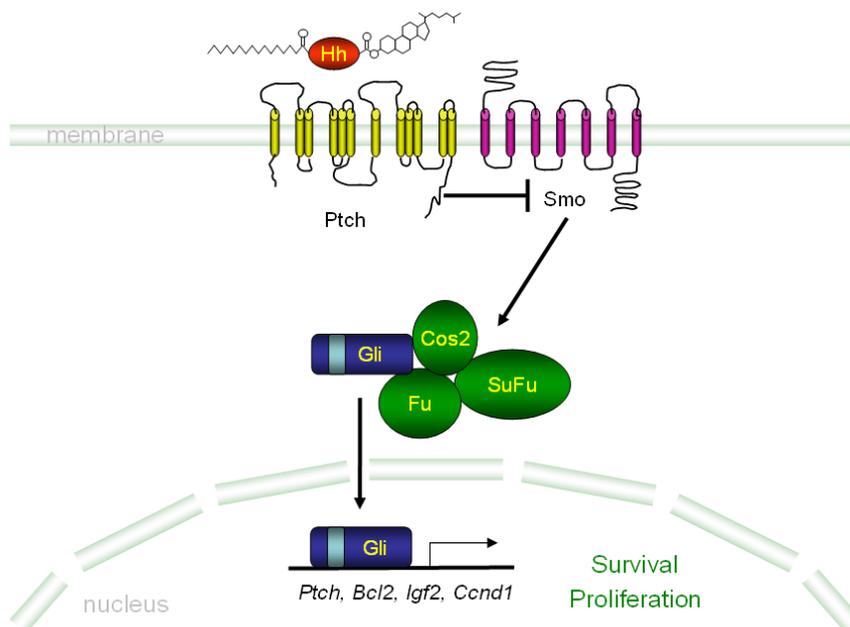
#### 1.4.2 Die Rolle der Hedgehog-Kaskade in der Hepatoblastomogenese

Die Hedgehog-Kaskade ist ein weiterer Signaltransduktionsweg, der an der Entstehung von Hepatoblastomen beteiligt ist. Benannt nach dem Signalprotein Hedgehog [63], spielt er eine große Rolle in der Embryonalentwicklung von Wirbeltieren. Funktioniert die Signaltransduktion nicht, treten meist massive Fehlbildungen auf [64], während eine Überaktivierung die Entwicklung von Tumoren begünstigen kann [65].

In der Leber nimmt die Hh-Signalkaskade Einfluss auf das Überleben von hepatischen Vorläuferzellen aus dem ventralen Endoderm während der Embryonalentwicklung [66] und reguliert die Differenzierung von Gallengangsepithel und -stroma während der Regeneration von Leberzellen im Erwachsenen durch die Bereitstellung von Vorläuferzellen [67-69]. Durch die Bindung von Hh an sein

Rezeptormolekül Patched (PTCH) wird der Signalweg aktiviert. Die Hemmung des Transmembranproteins Smoothened wird durch diese Bindung aufgehoben und dadurch eine Signalkaskade ausgelöst, die über Transkriptionsfaktoren der Gli-Gruppe vermittelt zur Expression verschiedener Zielgene führt [70; 71]. Diese sind unter anderem das antiapoptotische Gen *BCL2* und das pro-proliferatorische Gen *IGF2* [72; 73].

Die Expression von *PTCH* als Zielgen führt über negative Rückkopplung zu einer Unterdrückung des Signalwegs, ebenso wie die Bindung von Hh an das Hh-interacting protein (HHIP) [74]. In **Abbildung 1-3** sieht man eine schematische Darstellung dieser Kaskade. Zwei Drittel der Hepatoblastome zeigen hohe Level des Hh-Proteins, sowie der beteiligten Zielgene *GLI1*, *BCL2* und *PTCH* [65; 75], weshalb diesem Signalweg eine Schlüsselrolle in der Entstehung von Hepatoblastomen zukommt. Auch *FOXM1* gehört zu den Zielgenen, die durch die Hedgehog-Kaskade vermehrt exprimiert werden. Dabei handelt es sich um ein humanes Protoonkogen und als Transkriptionsfaktor um einen Regulator des Zellzyklus. Abnormale Hochregulation des Gens ist ursächlich in der Onkogenese von Basalzellkarzinomen der Haut sowie zahlreichen soliden Tumoren, wie Lebertumoren [76-78].



**Abbildung 1-3** Schematische Darstellung der Hedgehog-Signalkaskade. Erkennbar ist die Bindung des Liganden Hh an den Rezeptor PTCH, die Inaktivierung von Smoothened (Smo) und der dadurch ausgelösten Aktivierung der Gli-Transkriptionsfaktoren und der Expression von Zielgenen. Abbildung nach Kappler & von Schweinitz [79].

### 1.4.3 Der IGF2-Signalweg beeinflusst das Wachstumsverhalten von Hepatoblastomen

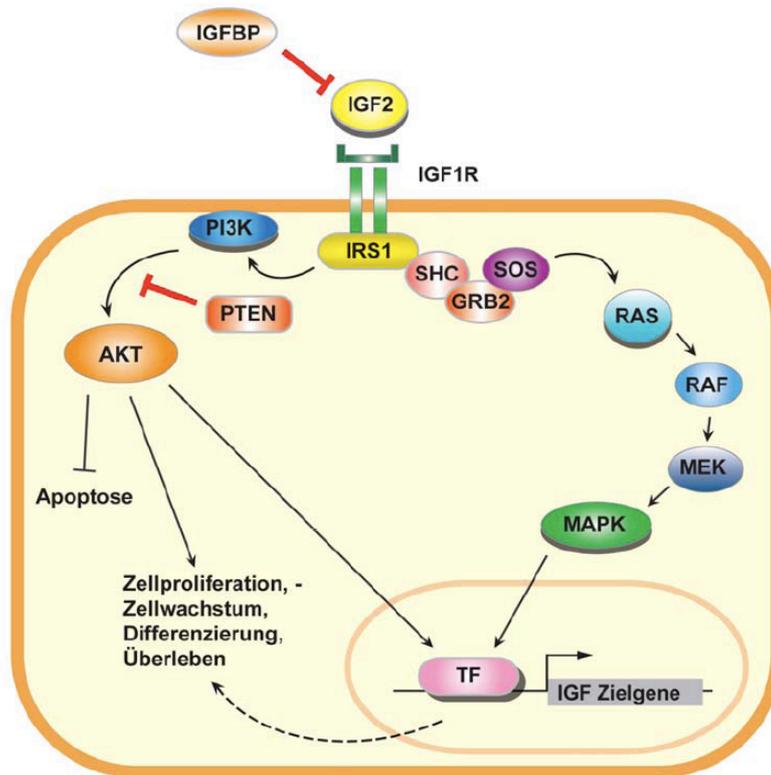
Die Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktoren IGF1 und IGF2 gehören zu den Proteinen, die strukturell dem Hormon Insulin stark ähneln. Sie werden als Peptide von der Leber sezerniert, zirkulieren dann im Blut und haben als Wachstumsfaktoren Einfluss auf Organe und den Stoffwechsel. Während man davon ausgeht, dass IGF1 hauptsächlich anabolisch auf das Kindswachstum wirkt, wirkt IGF2 auf das Größenwachstum im Fetus [80; 81].

In einer Vielzahl von Tumoren sind IGF1, IGF2 und ihre Rezeptoren hochreguliert [82]. Solide Tumoren des Kindesalters, wie das Rhabdomyosarkom, das Nephroblastom und das Hepatoblastom fallen darunter [83]. Im Hepatoblastom ist es vor allem eine Hochregulation des fetalen Wachstumsfaktors IGF2, der genetisch oder epigenetisch so verändert ist, dass es zu einer übermäßigen Zellwachstumsstimulation kommt [84; 85].

IGF2 wirkt über eine Bindung an den IGF-Rezeptor und aktiviert über IRS1 (Insulin receptor substrate 1) und die PI3-Kinase die Serin-/Threoninkinase AKT. Diese wirkt induzierend auf Zellproliferation und Zellwachstum und regt Transkriptionsfaktoren zur weiteren Transkription von IGF-Zielgenen an. Außerdem inhibiert AKT Apoptose. Über IRS1 und weitere aktivierende Proteine kommt es zusätzlich zu einer Initiation der RAS/RAF/MEK-Signalkaskade mit Aktivierung der MAP-Kinase, die wiederum auch zur weiteren Transkription von Zielgenen im Zellkern anregt (siehe **Abbildung 1-4**) [86].

Negativ reguliert wird der IGF-Signalweg unter anderem durch das IGF-binding protein 3 (IGFBP3), das auch von der Leber produziert wird und durch Wachstumsunterdrückung und Initiation von Apoptose antagonistisch wirkt [87]. Unterdrückt man also den IGF-Signalweg durch ein Protein wie IGFBP3 wächst das Hepatoblastom deutlich weniger aggressiv [88].

Das AU-reiche Bindungsprotein TIA1 wirkt am distalen Ende des *IGFBP3*-Gens und bewirkt dessen Herrunterregulierung. Außerdem ist es mit der Regulation von Apoptose und alternativem Spleißen des Fas-Rezeptors, eines Apoptose-induzierenden Rezeptors, assoziiert [89].



**Abbildung 1-4** Der IGF2-Signalweg. Die Aktivierung erfolgt über Bindung von IGF2 an den Rezeptor IGF1R. Dadurch wird über IRS1 und PI3K die Serin-/Threoninkinase AKT aktiviert, welche die Zellproliferation induziert, die Apoptose inhibiert und Transkriptionsfaktoren zur weiteren Produktion von IGF-Zielgenen anregt. Über die parallel verlaufende Aktivierung der RAS-Signalkaskade erfolgt eine Aktivierung der MAP-Kinase, die ebenfalls auf Transkriptionsfaktoren induzierend wirkt. Abbildung modifiziert von Ivonne Gruner nach Gennigens et al. [86].

#### 1.4.4 Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen durch DNA-Hypermethylierung

Neben der klassischen Mutation eines Tumorsuppressorgens, die zu dessen Inaktivierung führt, kann auch epigenetisch die Hypermethylierung der Promotorregion des Gens die Aktivität des Tumorsuppressors hemmen [90]. Unter Epigenetik versteht man die Regulation der Expression bei Differenzierungsprozessen ohne eine Veränderung der DNA-Sequenz [91].

Wird also die Aktivität eines Tumorsuppressorgens durch Hypermethylierung verringert, fallen dessen unterdrückende Wirkungen auf die Tumorgenese weg und der Tumor kann besser wachsen. Obwohl es bezogen auf das Hepatoblastom noch keine abschließenden epigenetischen Erkenntnisse gibt, berichten die in den nachfolgenden Abschnitten genannten Studien von der Hypermethylierung einzelner Gene, deren Inaktivierungen eine Tumorentstehung begünstigen.

Die Hypermethylierung des Gens *secreted frizzled-related protein 1 (SFRP1)* beispielsweise, das für einen Modulator des Wnt-Signalwegs kodiert, der physiologisch die intrazelluläre  $\beta$ -Catenin Konzentrationen reduziert, trägt durch die Unterdrückung dieser Funktion und einer Deregulation des Signalwegs zu der Entstehung von Hepatoblastomen bei [92]. Gleiches trifft auf die Hypermethylierung des bereits erwähnten *HHIP*-Gens aus dem Hedgehog-Signalweg zu. Entfällt das negative Feedback von *HHIP*, begünstigt das die unkontrollierte Proliferation des Tumors [75].

Ist der Promoter des *IGFBP3*-Gens hypermethyliert, das wie berichtet negativ regulierend auf den IGF-Signalweg wirkt, zeigen sich gehäuft Hepatoblastome mit Gefäßinvasionen und Metastasenbildung, also klinisch ungünstige Tumore [88]. Somit könnte *IGFBP3* als Marker für diese Tumoren dienen.

Hypermethylierungen des Tumorsuppressorgens *Ras association domain family member 1 A (RASSF1A)* spielen bekanntermaßen eine große Rolle in der Entstehung zahlreicher Tumoren [93]. In Neuroblastomen beispielsweise findet eine epigenetische Ruhigstellung von *RASSF1A* statt [94]. Hepatoblastome zeigen häufig Hypermethylierungen dieses Tumorsuppressorgens [22; 95]. Studien zeigen, dass die Hypermethylierung von *RASSF1A* signifikant mit einer höheren Rezidivrate, einem späteren Einsetzen der Erkrankung und mit verminderten Überlebenschancen korreliert [22; 96]. Insofern eignet sich *RASSF1A* als prognostisch aussagekräftiger und zugleich einfach feststellbarer Biomarker für das Hepatoblastom.

#### **1.4.5 Die 16-Gen-Signatur zur Einteilung des Hepatoblastoms**

Einen ganz wesentlichen Beitrag zur Einteilung des Hepatoblastoms lieferte die Arbeitsgruppe um Stefano Cairo und Marie-Annick Buendia aus dem Institut Pasteur in Paris im Jahr 2008. Mit ihrer Veröffentlichung „Hepatic Stem-like Phenotype and Interplay of Wnt/ $\beta$ -Catenin and Myc Signaling in Aggressive Childhood Liver Cancer“ und dem Entdecken von zwei Subklassen des Hepatoblastoms wurde es erstmalig möglich, anhand des Genprofils eines Tumors seine Aggressivität zu beurteilen.

Mithilfe von Microarray-Analysen identifizierten sie zwei Untergruppen des Hepatoblastoms, die jeweils unterschiedlichen Phasen der Leberentwicklung entsprechen und daher deutlich voneinander differente Eigenschaften aufweisen.

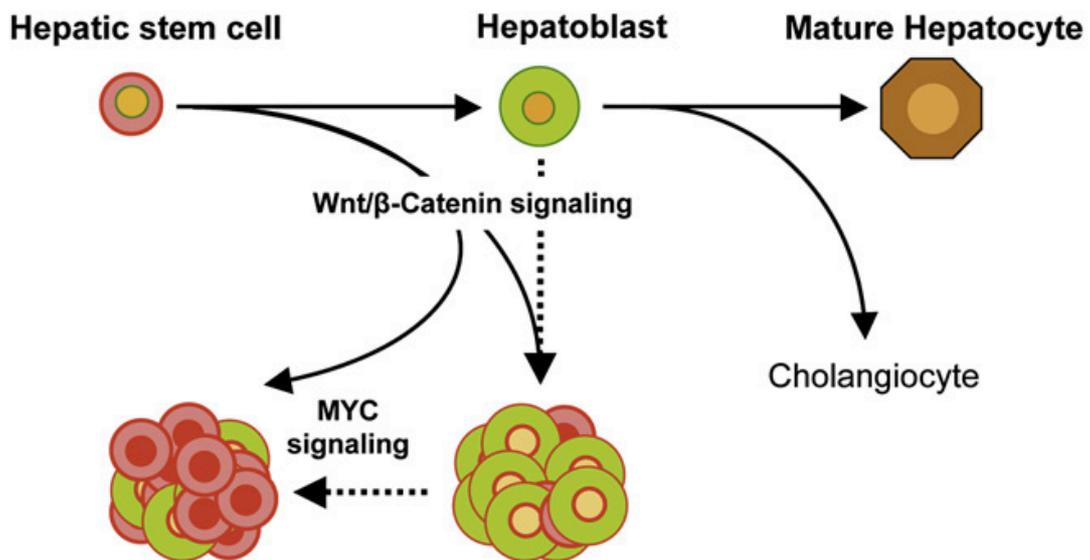
Beschrieben wurde eine 16-Gen-Signatur, bestehend aus 8 Genen der einen Subgruppe und 8 Genen der anderen, mit der es möglich ist, Tumore anhand ihrer Genexpression eindeutig einer Subgruppe zuzuweisen [97].

Die Untergruppen werden als C1 und C2 bezeichnet. C1-Tumoren spiegeln den eher fetalen Subtyp des Hepatoblastoms wieder, während C2-Tumoren dem unreiferen, embryonalen Typ entsprechen, der sich durch eine hohe Proliferation der beschriebenen Gene auszeichnet und außerdem mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium, Gefäßinvasionen, extrahepatischen Metastasen und einer generell schlechteren Prognose einhergeht.

Darüber hinaus beschrieben die Autoren Korrelationen zwischen einzelnen molekularen Pathomechanismen und den Subgruppen. Beispielweise trat eine gesteigerte Expression des Oncogenes *MYCN* sowie der Verlust der Membranverankerung des  $\beta$ -Catenin Moleküls häufiger in C2-Tumoren als in C1-Tumoren auf, was Hinweise auf den Einfluss dieser Mechanismen in der Tumorgenese gibt. Cairo und Kollegen wiesen nach, dass eine zuvor in Studien beschriebene Anreicherung von  $\beta$ -Catenin-verwandten Genen im HCC [98; 99] auch im Hepatoblastom im Vergleich zur Normalleber betrachtet werden kann. Er stellte somit einen Zusammenhang in der Pathogenese beider Tumoren her. Außerdem untersuchte er, ob genetische Auffälligkeiten in der Pathogenese des HBs eine Rolle spielen und fand heraus, dass Zugewinne auf den Chromosomen 8 und 2 signifikant häufiger in der C2-Subgruppe zu finden sind als in C1.

Die Marker für hepatische Vorläuferzellen *AFP*, *Ep-CAM* und *KRT19*, sowie die Proliferationsmarker *Ki67*, *MYCN* und *Survivin* wurden ebenfalls in den Tumoren der C2-Gruppe deutlich stärker exprimiert, als in den C1-Tumoren. Außerdem gab es spezifische Kopienzahlveränderungen auf den Chromosomen 2p und 8q, die ausschließlich in C2-Tumoren zu finden waren. Dagegen waren Marker für ausgereifte Hepatozyten wie *ALDH2*, *ALAS1* und *UGT2B4* deutlich weniger in den C2- als in den C1-Tumoren exprimiert, was die Charakterisierung der C2-Tumoren als die unreiferen und schlechter differenzierteren Tumoren unterstützt (siehe **Abbildung 1-5**).

Da die 16-Gen-Signatur einen wesentlichen Teil dieser Arbeit darstellt, sollen die Gene der C1- und C2-Gruppe in den folgenden Abschnitten kurz erläutert werden.



C2-type HB	C1-type HB	Features
24/31 (77%)	46/54 (85%)	• Wnt pathway-related mutations
Proliferation and antiapoptotic genes	Liver perivenous genes	• Overexpressed β-catenin targets
AFP +++ Ep-CAM +++ KRT19 +	AFP + Ep-CAM + KRT19 -	• Hepatic progenitor markers
Early fetal	Late fetal/postnatal	• Liver developmental stage
High	Low	• Proliferation rate
Cell cycle, mitotic checkpoint, Myc signaling	Hepatic perivenous metabolism	• Gene signatures (GO, KEGG and GSEA)
High	Low	• Chromosomal instability
+2p, +8q	-	• Specific chromosomal changes
Embryonal, Crowded fetal, Macrotrabecular	Fetal, pure fetal	• Histological main component
Advanced	Early	• Tumor stage
Unfavorable	Favorable	• Disease outcome

**Abbildung 1-5** Erklärungsmodell zur Entstehung des Hepatoblastoms und seinen zwei Untergruppen mit Auflistung der Charaktereigenschaften der beiden Subklassen C1 und C2. Durch eine Fehlregulation des Wnt-Signalwegs kommt es zur Neoplasie der Leber. C2-Tumoren entstehen weiter durch gesteigerte Expression des MYC-Onkogens. Adaptiert nach Cairo et al. [97].

### 1.4.5.1 Die C1-Gene

Das Gen *Growth Hormone Receptor (GHR)* ist auf Chromosom 5 lokalisiert und aktiviert den JAK2/STAT5-Signalweg [100]. Als Growth Hormone (ältere Bezeichnung Somatotropin) wirkt es vorwiegend über die Insulin-like Growth Factors (IGF1 und IGF2), welche hauptsächlich in der Leber gebildet werden, auf Knochen- und Organwachstum [101]. Während ein Mangel an GH zu Minderwuchs führt, führt ein Überschuss an GH zu Riesenwuchs, Akromegalie und übermäßigem Organwachstum an Herz, Leber, Niere und Schilddrüse [102].

Das *Amyloid P Component Serum Gen (APCS)* ist auf Chromosom 1 lokalisiert und kodiert Proteine, die wie das C-reaktive Protein zu den Proteinen der Immunabwehr gehören. Es bindet an apoptotische Zellen und interagiert mit DNA und Histonen. Außerdem entfernt es Nukleinsäuren, die aus geschädigten Zellen freigesetzt wurden [103].

*ALDH2* steht für *Aldehyd-Dehydrogenase 2*, ein auf Chromosom 12 lokalisiertes Gen, das die Aldehyd-Dehydrogenase 2, das zweite Enzym des Alkoholabbaus, kodiert. Im Gegensatz zur ALDH1 ist die ALDH2 in der mitochondrialen Matrix von Leberzellen zu finden und nicht im Zytosol [104]. In Kombination mit vermehrtem Alkoholgenuss gilt der in Ostasien verbreitete Polymorphismus Glu504Lys des Enzyms als Risikofaktor für die Entstehung von Plattenepithelkarzinomen des Magens [105].

Das *Complement Component 1s Subcomponent (C1S)* Gen liegt ebenfalls auf Chromosom 12, kodiert für eine Serin-Protease und ist gemeinsam mit C1q und C1r Teil der ersten Komponente des Komplementsystems, das zum angeborenen Immunsystem des Menschen gehört [106]. Defekte von C1s führen zu einer schweren Immundefizienz und sind mit dem Auftreten von Systemischem Lupus Erythematodes und Glomerulonephritis assoziiert [107].

*Aquaporin 9 (AQP9)*, auf Chromosom 15 lokalisiert, gehört zur Familie der wasserselektiven Membrankanäle, den Aquaporinen und ist neben Wasser für Urea und Glycerol durchlässig. Es wird diskutiert, ob Aquaporin 9 Teil einer speziellen Leukozytenfunktion ist und damit an Immunantworten und bakterizider Wirkung beteiligt ist [108].

Cytochrom P450 2E1 (kurz CYP2E1), ein Bestandteil des Cytochrom P450-Oxidase Systems, ist ein Enzym, welches vom gleichnamigen Gen auf Chromosom 10 kodiert wird. Als Monooxygenase ist CYP2E1 in die Verstoffwechslung vieler körperfremder Stoffe und Medikamente, sowie die Synthese von Cholesterin, Steroiden und anderen Fetten involviert. Lokalisiert im endoplasmatischen Retikulum wird es durch Ethanol, Fasten und eine diabetische Stoffwechsellage induziert. Durch die vielen Substrate, die CYP2E1 verstoffwechseln kann, wird ihm eine Rolle in der Entstehung von Diabetes, Leberzirrhose und Krebs zugeschrieben [109; 110]. CYP2E1 potenziert außerdem das Auftreten von alkohol-induzierten Darmleckagen, hepatischer Apoptose und Steatohepatitis im Rahmen eines Alkoholexzesses [111].

Das Apolipoprotein C4 (APOC4) wird von dem gleichnamigen Gen auf Chromosom 19 kodiert und gehört zur Apolipoprotein C-Familie, die mit VLDL assoziiert sind. Es wird hauptsächlich in der Leber exprimiert [112].

Das Gen *4-Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase (HPD)* ist auf Chromosom 12 lokalisiert. Das Enzym ist vorwiegend in der Leber, aber auch der Niere, vorhanden und ist an der Spaltung von Tyrosin, einem häufigen Nahrungsbestandteil, beteiligt [113]. Mutationen in dem Gen sind mit dem Krankheitsbild der Alkaptonurie assoziiert und können zur Typ-3-Tyrosinämie führen, bei der die Zellfunktion besonders im Nervensystem beeinträchtigt ist. Symptome sind intellektuelle Beeinträchtigung, das Auftreten von Krämpfen, sowie Koordinations- und Balanceprobleme [114].

#### 1.4.5.2 Die C2-Gene

Das Gen *Notchless* [115] befindet sich auf Chromosom 17 und kodiert ein Protein, dass an die zytoplasmatische Domäne des Rezeptors Notch bindet und somit als direkter Regulator des Notch-Signaltransduktionsweges wirkt [116]. Dieser weit verbreitete Signalweg ermöglicht Zellen auf äußere Signale zu reagieren.

Das ribosomale Protein L10A (RPL10A), dessen kodierendes Gen auf Chromosom 6 sitzt, gehört zu der 60S-Untereinheit der Ribosomen und ist im Zytoplasma lokalisiert. Die Expression des Gens wird im Thymus durch das immunsupprimierende Medikament Cyclosporin A gehemmt. Studien zeigen, dass das Protein während der Entwicklung von neuronalen Vorläuferzellen herunterreguliert ist [115; 117].

E2F5 steht für E2F Transkriptionsfaktor 5 und ist ein Protein, das von dem gleichnamigen Gen auf Chromosom 8 kodiert wird und zur Familie der E2F-Transkriptionsfaktoren gehört. Er spielt eine große Rolle in der Regulation des Zellzyklus, der Aktivität der Tumorsuppressorproteine p130 und p107 und ist außerdem Ziel von Transformationen durch DNA-Tumoviren [118]. Die Differenzierung von epidermalen Keratinozyten wird unter anderem durch E2F5 reguliert [119]. Neue Studien zeigen, dass E2F5 in primären HCCs hochexprimiert ist und ein Knockdown des Gens zu einer Inhibierung des HCC-Wachstums führt, wodurch E2F5 onkogen wirken würde [120].

Das Gen *BUB1* (*budding uninhibited by benzimidazoles 1*) ist auf Chromosom 2 lokalisiert und kodiert für die Serin-/Threoninproteinkinase BUB1, die als Checkpoint in der Mitosephase des Zellzyklus beteiligt ist. Das Enzym phosphoryliert einen Teil des Kontrollpunkt-Komplexes und aktiviert dadurch die Ausbildung des Spindelapparates [121]. Mutationen in dem Gen führen durch eine Störung des Checkpoints zu genetischer Instabilität und Aneuploidie [122]. Reduzierte Genaktivität von *BUB1* ist assoziiert mit dem Auftreten zahlreicher Krebsarten, darunter Kolon-, Magen- und Brustkarzinome, sowie Melanome [123]. Studien zeigen, dass die Höhe der *BUB1*-Expression Hinweise auf die Lokalisation sowie die Aggressivität eines Tumors liefert. Niedrige Expressionswerte sind mit dem Auftreten von Lymphomen und Lungentumoren assoziiert, während hohe Werte mit Sarkomen und Lebertumoren assoziiert sind [124].

Das Gen *Disc Large Homolog 7* (*DLG7*), auch bekannt als Hepatoma up-regulated protein (HURP), liegt auf Chromosom 14 und dient als potenzieller Regulator des Zellzyklus [125]. Das mitotische Phosphoprotein sorgt unter anderem für die Stabilisierung der Mikrotubuli. Die Expression von *DLG7* ist vermehrt in Stammzellen zu finden [126]. Zudem konnte besonders in hepatozellulären Karzinomen eine erhöhte Expression von *DLG7* festgestellt werden [127].

Das Immunglobulin Superfamily Member 1 Protein (IGSF1) wird von dem gleichnamigen Gen auf dem X-Chromosom kodiert und hat als Immunglobulin eine Reihe von Aufgaben, darunter das Wiedererkennen von Zellen und die Regulation von Zellverhalten [128].

Über das Alpha-Fetoprotein (AFP), dessen Gen auf Chromosom 4 lokalisiert ist, wurde bereits an vorangegangener Stelle in dieser Arbeit berichtet. Es ist ein

wesentliches Plasmaprotein, das vom Dottersack produziert wird und eine entscheidende Rolle in der fetalen Leberentwicklung spielt [129]. Auch bei einer Reihe von Keimzelltumoren ist AFP, dann in Kombination mit  $\beta$ -HCG, erhöht [130].

Die Dual Specificity Phosphatase 9 (DUSP9), kodiert von dem gleichnamigen Gen auf dem X-Chromosom, gehört zu einer Gruppe von Phosphatasen, die ihre Zielkinasen durch Dephosphorylierung inaktivieren. Dadurch wird beispielsweise die MAP-Kinase, zu deren Aufgaben die Zellproliferation und –differenzierung gehört, negativ reguliert. Die MAP-Kinase, die von DUSP9 reguliert wird, ist ausschließlich in der Plazenta, der Niere und der fetalen Leber zu finden [2; 131].

Allgemein lässt sich feststellen, dass es sich bei den Genen der C1-Gruppe, wie *ALDH2*, *APC2* und *APOC4*, vermehrt um Marker des ausgereiften Hepatozyten handelt. Im Unterschied dazu handelt es sich bei den Genen der C2-Gruppe um Regulatoren des Zellzyklus, wie etwa *DLG7* und *BUB1*, sowie hepatischen Vorläuferzellen wie *AFP*.

## 2 Zielstellung der Arbeit

Die meisten Hepatoblastome werden vor Erreichen des dritten Lebensjahres diagnostiziert. Die aussichtsreiche, evidenzbasierte Therapie besteht in der chirurgischen Resektion der gesamten Tumormasse, ergänzt durch adjuvante oder neoadjuvante Chemotherapie. Die Prognose der einzelnen Patienten hängt stark vom Tumorstadium und der Tumorinvasivität bei Diagnosestellung ab. Hinsichtlich der Prognose lassen sich derzeit jedoch keine zuverlässigen Aussagen zum Zeitpunkt der Diagnosestellung machen. Die bisherige Suche nach prognostischen Biomarkern hat zwar einzelne Aspekte der Progression von Hepatoblastomen aufgedeckt, die Ergebnisse haben aber nicht zu einer flächendeckenden Standardisierung der Hepatoblastom-Risikoabschätzung geführt.

Ziel dieser Arbeit war es, durch die Beantwortung folgender Fragen die Therapie und Diagnostik des Hepatoblastoms zu standardisieren und zu verbessern. Lassen sich die bisher identifizierten Biomarker auf das Münchner Kollektiv von 40 Hepatoblastompatienten anwenden? Besteht die Möglichkeit, die Marker weiter zu verbessern, um deren Aussagefähigkeit zu steigern? Gibt es über die bekannten Marker hinaus weitere Parameter, welche eine Prognose der Erkrankung zulassen?

Hierzu sollte zunächst die 16-Gen-Signatur an hauseigenen Tumoren der Kinderchirurgischen Klinik und Poliklinik der LMU München überprüft und die Expression dieser Gene an den Tumorpräparaten gemessen werden. Anschließend sollten möglichst zwei eindeutige Gruppen anhand ihres Genprofils ermittelt und gruppiert werden.

Weiter sollte gemessen werden, ob sich die 16-Gen-Signatur auch auf eine andere Neoplasie der Leber anwenden lässt, dem kindlichen HCC. Dazu sollte die Genexpression an geeigneten Tumorpräparaten bestimmt werden. Humane Zelllinien von HBs und HCCs sollten ebenfalls auf die 16-Gene getestet werden, um zu eruieren, wie sich die Genexpression frei von umgebendem Stroma und Normalgewebe verhält.

Ergänzend sollte festgestellt werden, ob sich diese Zuordnung, die sich nach dem Genprofil der 16-Gen-Signatur ergab, mit dem klinischen Verlauf der Patienten deckt.

In einem zweiten Teil dieser Arbeit sollten alle zur Verfügung stehenden Marker auf die Frage hin untersucht werden, welcher dieser Marker sich am ehesten für Aussagen über den Status, den Verlauf und die Prognose der Erkrankung anbietet. Insgesamt sollte also eine Evaluation prognostischer Biomarker für das Hepatoblastom durchgeführt werden, um generelle Hinweise auf deren Eignung in der Praxis zu geben.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Verwendete Materialien

##### **Zelllinien**

Die verwendeten eukaryotischen Zelllinien sind in der nachstehenden **Tabelle 1** aufgeführt. Es wird zu jeder Zelllinie die Bezeichnung, der Ursprung, die Bezugsstelle sowie das Kultivierungsmedium aufgelistet.

**Tabelle 1** Verwendete eukaryontische Zelllinien mit Bezeichnung, Ursprung, Bezug und Kultivierungsmedium.

<b>Bezeichnung</b>	<b>Ursprung</b>	<b>Bezug</b>	<b>Kultivierungsmedium</b>
HepT1	Humanes Hepatoblastom mit vorwiegend embryonaler Differenzierung	Pietsch et al., 1996	RPMI + 10% FBS + 1% PS
HUH6	Humanes Hepatoblastom mit mesenchymalen Anteilen	JCRB, Osaka, Japan	DMEM + 10% FBS + 1% PS
HUH7	Humanes hepatozelluläres Karzinom	JCRB, Osaka, Japan	RPMI + 10% FBS + 1% PS
HepT3	Humanes Hepatoblastom mit epithelialer Differenzierung	Hartmann et al., 2000	RPMI + 10% FBS + 1% PS
HepG2	Humanes Hepatoblastom	Lopez-Terrada et al., 2009	RPMI + 10% FBS + 1% PS
HUH6 (Paris)	Humanes Hepatoblastom, Sublinie von HUH6	Institut Pasteur, Paris, FR	RPMI + 10% FBS + 1% PS
HUH6 (München)	Humanes Hepatoblastom, Sublinie von HUH6	Kinderchirurgie LMU, München	RPMI + 10% FBS + 1% PS

### **Kulturmedien**

#### **RPMI-1640 Medium (engl. Roswell Park Memorial Institute Medium):**

Flüssiges RPMI-1640 Medium (1x) + GlutaMAX™ I (Invitrogen, Karlsruhe) wurde mit 10% fötalem Rinderserum (FBS, Invitrogen, Karlsruhe) und 1% Penicillin/Streptomycin (Invitrogen, Karlsruhe) versetzt.

#### **DMEM Medium (engl. Dulbecco's Modified Eagle Medium):**

Flüssiges DMEM-Medium (1x) mit 4,5 g/l Glukose und L-Glutamin (Invitrogen, Karlsruhe) wurde mit 10% FBS (Invitrogen, Karlsruhe) und 1% Penicillin/Streptomycin (Invitrogen, Karlsruhe) versetzt.

#### **Einfriermedium:**

Das Einfriermedium setzte sich aus

- 50 ml FBS,
- 40 ml DMEM Medium (ohne FBS, mit 1% Penicillin/Streptomycin)
- 12,5 ml Dimethylsulfoxid (DSMO)

zusammen.

### **Enzyme**

iTaq™ SYBR® Green Supermix with ROX	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Ribonuclease H (RNase H)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
SuperScript® II Reverse Transcriptase	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Trypsin-EDTA (1x)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe

### **Größenstandards**

Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
-------------------------------	------------------------------

### **Primer**

Auflistung aller verwendeter humaner Expressionsprimer für die quantitative *real-time* PCR (siehe **Tabelle 2**):

**Tabelle 2** Verwendete Primer-Sequenzen.

Gen	Forward Primer (5'-3')	Reverse Primer (5'-3')	Lokalisation	Länge (bp)
GHR	TATCCTTAGCAGAGCACCCCTGG	GCTCAGGTGAACGGCACTTG	Ex 3/4	101
APCS	CTCCTGGAAGCCTTTGCTCA	TTCTCCAGCGGTGTGATCAAG	Ex 1/2	101
ALDH2	AGATGTGCAGGATGGCATGAC	TGGCTCTCCCAACAACCTCC	Ex 10/11	101
C1S	TCATCCGCTACACTTGTGAGGA	CAGCACCTCATTACCCAGC	Ex 13/14	101
AQP9	GCTCGAGACCTGAGTCCCAGA	GGGCCCACTACAGGAATCCA	Ex 5/6	101
CYP2E1	GTTTCATCACCCCTCGTGCCCT	GAGTTGGCACTACGACTGTGCC	Ex 9/10	101
APOC4	GCTGCTGGAGACAGTGGTGAA	AGGTCCCTCAGGTGGTCGTC	Ex 2/3	101
HPD	GAGAAGCTGAAGACGGCCAA	TGCAGGAGGTAGCCTTTCTCG	Ex 14/15	101
NLE	GAAGGTGTGGGATGTGAAGGC	CCACTCTCTGGCCATCTGGAC	Ex 11/12	101
RPL10A	TATCCCCACATGGACATCG	ACTCTGAGGCCAAAAACGCAT	Ex 4/5	101
E2F5	AGGCACCTTCTGGTACACAAGT	GCAGCACATGGATAGGTCCTGA	Ex 5/6	111
BUB1	CCAGGGAGATCTGAATGATGCT	CCATCAACTGGGTCCCAATG	Ex 20/21	101
DLG7	TGTTGATGCTGGATTTT	CCAAGTCTTTGAGAAGG	Ex 14/15	91
IGSF1	GCCTAGTGATCCCCTGGAGC	CAACAACCACCACGATTAGGCT	Ex 24/25	101
AFP	TGTGCTGGATTGTCTGCAGG	GCAGCATTCTGTTATTTGTTTGAC	Ex 7/8	91
DUSP9	TGCAGAAGCTGCGAGAGGAA	AGCAAGGCTGGTCTCACACAG	Ex 2/3	101
TBP	GCCCGAAACGCCGAATAT	CCGTGGTTCGTGGCTCTCT	Ex 4/5	72

Die Sequenzen der Vorwärts-Primer (forward primer), sowie die der Rückwärts-Primer (reverse primer), sind in 5'-3'-Richtung angegeben. Alle Sequenzen wurden Exon-überspannend ausgewählt und die Amplikonlänge ist in Basenpaaren (bp) angegeben.

**Reagenzien**

6x DNA Loading Dye	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Agarose	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Chloroform	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
dNTPs (100 mM)	Roche Diagnostics GmbH, Penzberg
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (D-PBS) (1x), without CaCl <sub>2</sub> , MgCl <sub>2</sub>	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt
Ethidiumbromid, 10 mg/ml	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ethylendiamintetracyanat (EDTA)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Fetal Bovine Serum (FBS)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Isopropanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Random-Hexamere	Roche Diagnostics, Mannheim
TRI Reagent <sup>®</sup> RNA Isolation Reagent	Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, OH, USA
UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

**Puffer**

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

**Kits**

RNase-Free DNase Set	QIAGEN GmbH, Hilden
RNeasy Mini Kit	QIAGEN GmbH, Hilden

### **Verbrauchsmaterialien**

5er Reihe 0,2 ml PCR Gefäße	Eppendorf AG, Hamburg
BD Falcon™ Round-Bottom	
14 ml Tubes	BD, Heidelberg
Biosphere® Filterspitzen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
EasyFlasks™ Zellkulturflaschen	Nunc GmbH & Co. KG, Langenselbold
Nalgene® Kryoröhrchen	Schubert & Weiss GmbH, München
Plastik-Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2ml)	Eppendorf AG, Hamburg
Standard 96 Well PCR Plates	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Costar® Stripette® Serological Pipets	Corning GmbH, Wiesbaden
Zellschaber Greiner	Bio-One GmbH, Frickenhausen

### **3.2 Geräte**

Absaugsystem EcoVac	Schütt Labortechnik, Göttingen
Biofuge fresco	Heraeus GmbH, Hanau
Biofuge pico	Heraeus GmbH, Hanau
BioPhotometer	Eppendorf AG, Hamburg
Centrifuge 5702	Eppendorf AG, Hamburg
Centrifuge J2-21	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Centrifuge LMC-3000	Kisker-Biotech, Steinfurt
CO <sub>2</sub> -Inkubator MCO-20AIC	Sanyo, Tokio, Japan
Feinwaage Te1245	Sartorius AG, Göttingen
Mastercycler ep gradient S	Eppendorf AG, Hamburg
Mastercycler personal	Eppendorf AG, Hamburg
Mikroskop Axiovert 40 CFL	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena
Mikrowelle	Panasonic, Hamburg

---

Pipetten (10µl, 100µl, 1000µl)	Eppendorf AG, Hamburg
Pipette Accu-Jet	Brand GmbH, Wertheim
PowerPac Basic™	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Sicherheitswerkbank Hera Safe	Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau
Stickstofftank ARPEGE 140/170	Air Liquide, Kirchen
Thermomixer Comfort	Eppendorf AG, Hamburg
Thermomixer Compact	Eppendorf AG, Hamburg
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, NY, USA
Waage Vic-1501	Acculab, Edgewood, NY, USA
Wasserbad GFL 1083	GFL, Wien, Österreich

### 3.3 Software

Cluster 3.0 for Mac OS X	Michiel de Hoon, Seiya Imoto, Satoru Miyano University of Tokyo, Humane Genome Center, October 2002  Originally written by Michael Eisen, Stanford University, 1998-99
Java TreeView Version 1.1.6r2	Created by Alok ( <a href="http://jtreeview.sourceforge.net">http://jtreeview.sourceforge.net</a> )
Graph Pad® Prism 6	Graph Pad Software Inc., Kalifornien, USA

### **3.4 Zellbiologische Methoden**

#### ***Allgemeine Zellkulturbedingungen***

Alle Zelllinien wurden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in Zellkulturflaschen entsprechender Größe im Brutschrank kultiviert. Bei Erreichen einer Konfluenz von 80-90 % wurden die Zellen anhand ihres Wachstumsverhaltens gesplittet und passagiert. Das Kultivierungsmedium, sowie der D-PBS Puffer, wurden vor jeder Benutzung im Wasserbad auf 37 °C erwärmt.

#### ***Auftauen von Zellen***

Kryokonservierte Zellen wurden bei Raumtemperatur aufgetaut und möglichst rasch in vorbereitete 15 ml Falcons mit 9 ml Medium gefüllt. Dieses Falcon wurde für 5 Minuten bei 12.000 rpm zentrifugiert, der Überstand abpipettiert, das Zellpellet in 1 ml frischem Medium resuspendiert und in eine kleine Zellkulturflasche (25 cm<sup>2</sup>) mit 6 ml Medium überführt. Über Nacht wurde die Zellkulturflasche im Brutschrank kultiviert und am nächsten Tag das Medium gewechselt, um flüssige, abgestorbene Zellen zu entfernen.

#### ***Kultivierung der Zellen***

Zum Passagieren der Zellen wurde das alte Medium abgesaugt und die Zellen mit D-PBS, ohne zweiwertige Magnesium- und Chlorid-Ionen, gewaschen. Dann wurde Trypsin, welches Zelladhäsionsproteine angreift, auf die Zellen gegeben und die Flasche für 3 Minuten in den Brutschrank gestellt. Nach den 3 Minuten wurde relativ zügig neues FBS-haltiges Medium auf die Zellen gegeben, um den Trypsinierungsprozess abzuschwächen. Die gelösten Zellen wurden dann in einen Falcon überführt und für 5 Minuten bei 12.000 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit 1 ml neuem Medium resuspendiert und auf vorbereitete Flaschen im sinnvollen Splittverhältnis verteilt.

### ***Kryokonservierung der Zellen***

Eukaryotische Zellen wurden zur Kryokonservierung, also zum Einfrieren in den Stickstofftank, wie beim Passagieren abtrypsiniert (siehe Kultivierung der Zellen) und das Zellpellet in einer angemessenen Menge Einfriermedium resuspendiert, in Kryoröhrchen aliquotiert und für mindestens 24 Stunden im -80 °C-Schrank gelagert, bevor sie in den Stickstofftank überführt wurden.

## **3.5 Molekularbiologische Methoden**

### **3.5.1 RNA-Isolierung**

#### ***Zellen in Kultur***

Zur Isolierung von mRNA aus adhärenenten Zellen wurde je 2 ml Tri Reagent<sup>®</sup> direkt auf die Zellen gegeben und das Lysat mehrmals durchpipettiert. Das Lysat wurde dann auf jeweils 2 ml-Tubes verteilt.

Für die Phasentrennung wurden die Ansätze für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und dann jeweils 0,4 ml Chloroform dazugegeben. Nach 15 Sekunden Vortexen wurden die Ansätze erneut für 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Phasentrennung erfolgte dann für 15 Minuten bei 12.000 rpm in der auf 4°C-gekühlten Zentrifuge. Daraufhin zeigten sich im Reaktionsgefäß drei voneinander getrennte Phasen, von denen die obere Phase in neue 2 ml-Tubes überführt wurde.

Zur Fällung der RNA wurde jeweils 1 Volumen Isopropanol in das neue Tube gegeben und vermischt. Danach wurde für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und für weitere 15 Minuten bei 12.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und 1,5 ml gekühltes 70 %iges Ethanol auf das Pellet gegeben und vermischt. Eine weitere 5-minütige Zentrifugation bei 7.500 rpm und 4°C folgte. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet luftgetrocknet, so dass möglichst wenig Ethanolreste verblieben. Im letzten Schritt wurde das Pellet für 15 Minuten bei 55°C in 50 µl UltraPure<sup>™</sup> destilliertem Wasser gelöst. Die Konzentration der RNA wurde mittels Photometrie gemessen und die gelöste RNA im -80°C-Kühlschrank gelagert.

### **RNA-Isolierung aus Gewebe**

Für die Homogenisierung von Gewebe wurde je 2 ml Tri Reagent<sup>®</sup> pro Probe in 14 ml-Tubes vorgelegt. Der Homogenisator wurde mit UltraPure<sup>™</sup> destilliertem Wasser und Tri Reagent<sup>®</sup> gewaschen und das Gewebe grob mit einer sterilen Skalpellklinge in einer Petrischale zerkleinert. Anschließend wurde das Gewebe in Tri Reagent<sup>®</sup> gegeben und homogenisiert und die Lysate auf jeweils zwei 2 ml-Tubes verteilt. Die nachfolgenden Schritte verliefen identisch zu denen der RNA-Isolierung aus adhärennten Zellen.

#### **3.5.2 DNase-Verdau und RNA Aufreinigung**

Der DNase-Verdau und die Aufreinigung der RNA wurde mit dem *RNeasy mini Kit* und dem *RNase-Free DNase Set* durchgeführt. Für die Bindung der RNA an eine Silicium-Gel Membran wurde nach Angaben des Herstellers das *RNeasy mini Kit* verwendet. Durch 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 für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach mehreren Waschschritten wurde die RNA mit RNase-freiem UltraPure<sup>™</sup> destilliertem Wasser eluiert und bei -80 °C gelagert.

#### **3.5.3 cDNA-Synthese**

Für die Synthese von cDNA wurde die *SuperScript<sup>™</sup> II Reverse Transkriptase* mit ihren zugehörigen Komponenten *5x First Strand Buffer* und *DTT* verwendet. Es wurde je 2 µg DNase-verdaute und aufgereinigte Total-RNA eingesetzt und in einem Reaktionsgefäß mit UltraPure<sup>™</sup> destilliertem Wasser auf 7 µl aufgefüllt. Im nächsten Schritt erfolgten die Zugabe von 5 µl Random Hexamere (20 ng/µl) und eine Inkubation für 10 Minuten bei 70°C. Während der Inkubationszeit wurde die Zugabe von 4 µl 5x 1st strand buffer, 2 µl 0.1 M DTT und 1 µl 10 mM dNTPs vorbereitet und anschließend hinzu gegeben. Der Ansatz wurde dann für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, bevor er für weitere 2 Minuten bei 42°C inkubiert wurde.

---

Daraufhin erfolgte die rasche Zugabe von 1 µl *SuperScript™ II Reverse Transkriptase* und ein Inkubationsschritt von 1 Stunde bei 42°C.

Nach dem Inkubationsschritt erfolgte eine weitere Inkubation bei 70°C für 10 Minuten und die Zugabe von 1 µl RNase H, Roche. Zuletzt wurde dieser Ansatz für 20 Minuten bei 37°C inkubiert und zum Schluss mit 80 µl UltraPure™ destilliertem Wasser aufgefüllt.

### 3.5.4 Quantitative *real-time* PCR

Für die Untersuchung der Expression verschiedener Gene wurde die quantitative *real-time* PCR eingesetzt. Dabei wurden für die Reaktion 40 ng cDNA, 1 µM Primer (aus **Tabelle 2**) und 1x *iTaq SYBR Green Supermix with ROX* verwendet. Als Gerät stand mir der *Mastercycler ep gradient* mit der dazugehörigen Software *realplex* zur Verfügung.

Das PCR-Programm bestand aus mehreren Schritten: Initial erfolgte ein 2-minütiger Denaturierungsschritt bei 94°C, es folgten 40 Zyklen von je 15 Sekunden Denaturierung bei 95°C, 15 Sekunden Annealing bei 55°C und 20 Sekunden Extension bei 68°C. Alle PCR-Reaktionen liefen bei einer Annealing-Temperatur von 55°C ab, bis auf das Gen *CYP2E1* (63°C). Um eine Aussage über die Spezifität der Primer treffen zu können, wurde zum Schluss eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt.

Während der qRT-PCR lagert sich ein Fluoreszenzfarbstoff (SYBR Green) in das entstehende Produkt ein, wodurch die Fluoreszenz im Verlauf des Prozesses 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* nach folgender Formel formiert:  $\Delta Ct = 2^{-(\Delta Ct_{\text{Gen}} - \Delta Ct_{\text{TBP}})}$  [132]. Ein Wert unter eins zeigt an, dass das Gen im Vergleich zum

Haushaltsgen weniger exprimiert ist, ein Wert über eins dagegen zeigt eine Überexpression an.

### 3.6 Statistische Analysen

#### **Cluster-Analysen**

Das Clustern der Tumoren wurde mithilfe des Cluster 3.0 Programmes der Universitäten von Tokyo und Stanford durchgeführt. Verwendet wurden die *TBP*-normierten Werte aus den qRT-PCRs. Um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, wurden folgende Einstellungen bei jeder Analyse übernommen: Es wurde kein Filter ausgewählt, das heißt alle Werte wurden in die Auswertung integriert. Die Werte wurden um den Faktor 2 logarithmiert, um den Mittelwert zentriert und normalisiert. Normalisierung bedeutet, dass alle Werte einer Reihe mit einem Faktor S multipliziert werden, der dafür sorgt, dass die Summe aller Quadrate dieser Werte 1 entspricht. Dadurch haben alle Werte gleich starke Vektoren.

Die Clusteranalyse der Tumoren erfolgte mittels zentrierter Korrelation nach Pearson um den Mittelwert (*centered correlation*). Der Korrelationskoeffizient nach Pearson wird für die Werte x und y nach folgender Formel berechnet:

$$r = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \left( \frac{x_i - \bar{x}}{\sigma_x} \right) \left( \frac{y_i - \bar{y}}{\sigma_y} \right) \quad [133].$$

Er liefert ein dimensionsloses Maß für einen linearen Zusammenhang zwischen zwei Merkmalen, in unserem Fall Expressionswerte eines Genes zweier unterschiedlicher Präparate. Als Clusterverfahren, dem Algorithmus der die Vielzahl an Korrelationen ordnet, wurde ein hierarchisches, das *Single Linkage*-Verfahren, verwendet. Hierarchische Cluster organisieren die Gene anhand ihrer Ähnlichkeit in einer Baumstruktur. In diesem speziellen Verfahren wird für die Distanz zwischen zwei Werten x und y das Minimum aller paarweisen Distanzen zwischen x und y gewählt und dementsprechend geordnet.

Die Darstellung der Baumstruktur erfolgte mit dem Programm Java TreeView. Das Programm stellt den Baum dar und liefert anhand der Höhe der ermittelten Werte aus dem Programm Cluster innerhalb eines Genes unterschiedliche Farbintensitäten, die eine weitere Einteilung des Tumors nach Gemeinsamkeiten und

Unterschieden zu anderen Tumoren möglich macht. Demnach wurden ähnliche Farbintensitäten beieinander gruppiert, Abweichungen weiter entfernt. So konnte jeder Tumor anhand seiner Expressionswerte im Vergleich zu den anderen Tumoren eingeordnet werden.

### **Korrelationsanalysen**

Die Korrelation klinischer Parameter, sowie die Darstellung der Kaplan-Meier-Überlebenskurven, erfolgten mit dem Statistikprogramm GraphPad Prism 6<sup>®</sup>. Für die Berechnung der p-Werte, also der statistischen Signifikanz, wurde der Exact Test nach Fisher (Quick Calcs GraphPad<sup>®</sup>) verwendet. Dieser Kontingenztest ist zweiseitig und für die Berechnung von Signifikanzen zwischen zwei Gruppen unterschiedlicher Größe empfohlen.

Für die Berechnung der p-Werte bei Auswertungen der Genexpression wurde der Zweistichproben-t-test, auch *unpaired t-test*, verwendet. Hierbei wird die Differenz der Mittelwerte beider Gruppen durch die Standardabweichung beider Mittelwerte geteilt. Bei normalverteilten Werten wird von der gleichen Standardabweichung zwischen den beiden Gruppen ausgegangen:  $t = (\text{Mittelwert von Stichprobe 1} - \text{Mittelwert von Stichprobe 2}) / \text{Standardfehler der Differenzen beider Mittelwerte}$ . Als statistisch signifikant gelten p-Werte  $< 0,05$ .

### **Weitere Programme**

Weitere Grafiken, Tabellen und Darstellungen wurden mithilfe der gängigen Programme von Microsoft Office bearbeitet. Für das Einfügen von Zitaten und das Erstellen des Literaturverzeichnisses wurde das Programm EndNote<sup>®</sup> X4.0.2 von Thomson Reuters verwendet.

Die Suche nach Literatur erfolgte mit der Datenbank PubMed<sup>®</sup> (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>), die freundlicherweise von der U.S. National Library of Medicine zur Verfügung gestellt wird.

Die Recherche der Gene wurde durch die Datenbanken des National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) sowie WikiGenes (<https://www.wikigenes.org/>) von R. Hoffmann ermöglicht.

## 4 Resultate

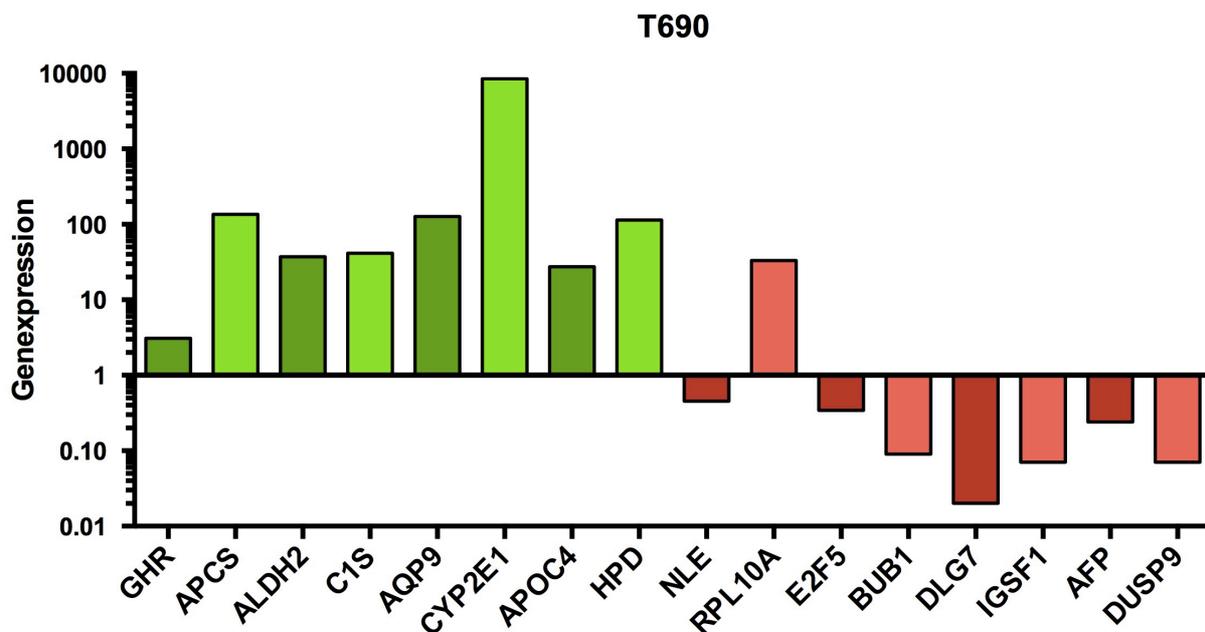
### 4.1 Einteilung der Hepatoblastome in zwei Gruppen anhand ihrer Gen-Signatur

#### 4.1.1 Ermittlung der Genprofile beider Gruppen mittels qRT-PCR

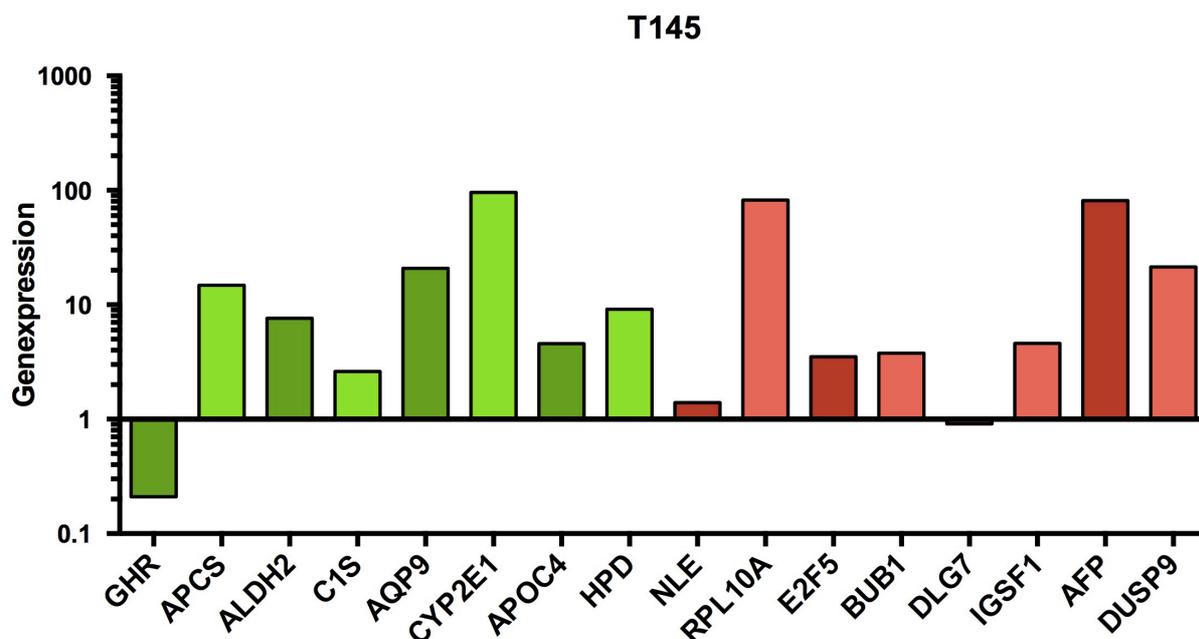
Mittels qRT-PCR wurde die Expression der 16 Gene an 40 Hepatoblastompräparaten der Kinderchirurgischen Klinik und Poliklinik der Universität München gemessen.

Es zeigte sich, dass die 8 Gene *GHR*, *APCS*, *ALDH2*, *C1S*, *AQP9*, *CYP2E1*, *APOC4* und *HPD*, die laut Cairo/Buendia ausschlaggebend für eine Zugehörigkeit zu der Gruppe der C1-Tumoren sind, auch in vielen der hier untersuchten Tumoren hohe Expressionswerte aufweisen. **Abbildung 4-1** zeigt einen Vertreter dieser Tumoren, der somit der C1-Gruppe zugeordnet werden kann.

Einzig das Gen *RPL10A* von der Gruppe der C2-Gene ist auch in allen Tumoren der Gruppe C1 hoch exprimiert. Da sich dies aber in jedem Tumor unabhängig von seiner Gruppenzugehörigkeit zeigt, scheint die Höhe der Expression ausschlaggebend für die Zugehörigkeit zu der Untergruppe zu sein.



**Abbildung 4-1** Genprofil eines „klassischen“ C1-Tumors (hier Tumor T690). Charakteristisch sind die hoch-exprimierten C1-Gene, dargestellt in grün, und die niedrig-exprimierten C2-Gene, dargestellt in rot.



**Abbildung 4-2** Genprofil eines "klassischen" C2-Tumors (hier Tumor T145). Charakteristisch ist die hohe Expression von C2-Genen, dargestellt in rot. Die Expression der C1-Genen, dargestellt in grün, fällt im Vergleich zu den C1-Tumoren niedriger aus.

Das Profil der C2-Tumoren unterscheidet sich von dem der C1-Tumore deutlich. Das Bild, das diese Tumoren liefern, ist jedoch ein deutlich heterogeneres, da durchweg auch C1-Gene in diesen Tumoren exprimiert werden. **Abbildung 4-2** zeigt einen Vertreter der C2-Gruppe.

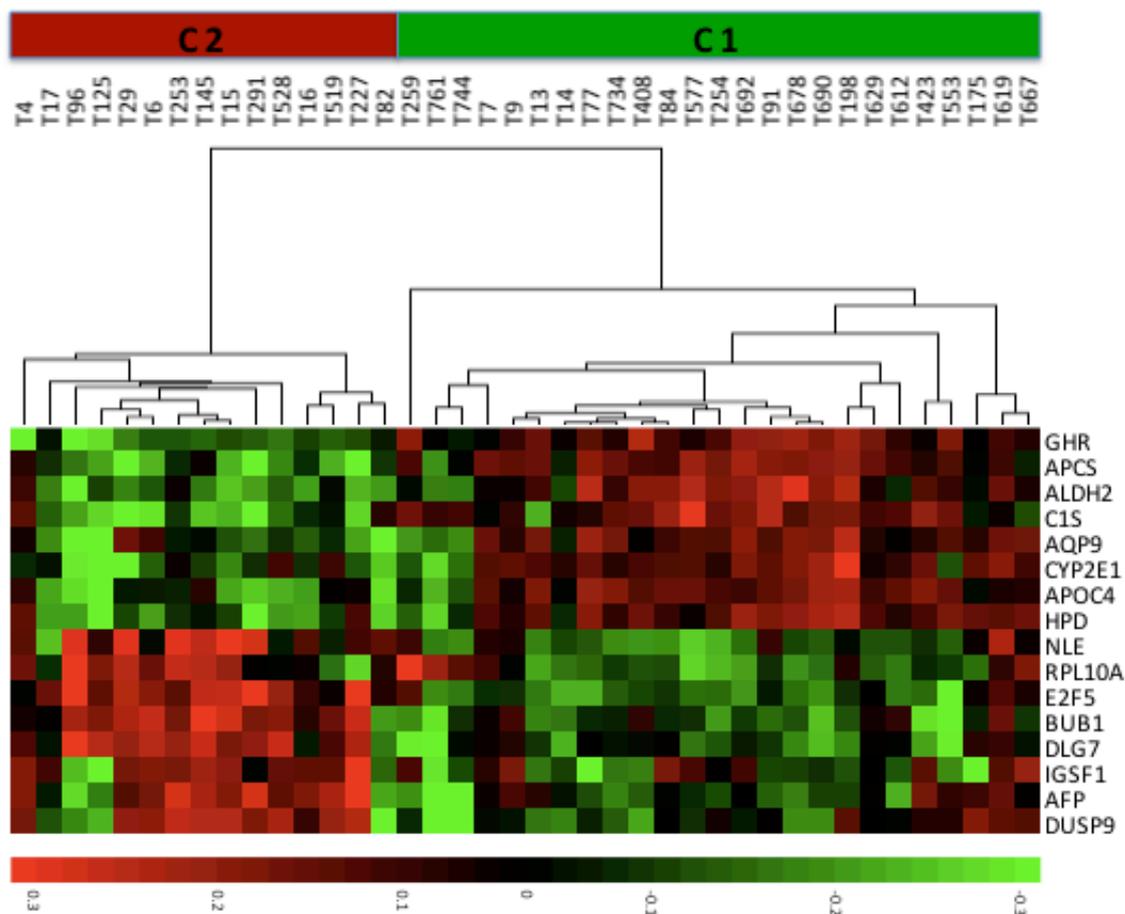
Im Vergleich zu den C1-Tumoren fällt auf, dass die Höhe der Expression der C1-Gene jedoch deutlich niedriger ausfällt; vorhanden ist sie gleichwohl. Zu erklären ist dieses Phänomen damit, dass es sich bei den C1-Genen, wie beschrieben, um lebertypische Gene handelt und ein Tumorpräparat neben dem neoplastisch veränderten Gewebe immer auch ursprüngliches, von Tumor nicht durchsetztes Gewebe aufweist.

#### 4.1.2 Die Clusteranalyse der Tumoren führt zur eindeutigen Zuordnung

Als geeignete Darstellungsform für die Menge an Daten, die sich aus den gemessenen Werten von 16 Genen an 40 Tumorpräparaten ergab, wurde das oben bereits erwähnte Clusteranalyseverfahren der Stanford University ausgewählt. Hiermit ließen sich die Tumoren, wie in **Abbildung 4-3** gezeigt, eingruppiert.

Das Clusterprogramm analysiert die Expressionsmuster und stellt jeweils Tumoren ähnlichen Musters nahe beieinander. Dadurch ergibt sich ein Analysebaum aus zwei großen Gruppen und vielen Untergruppen.

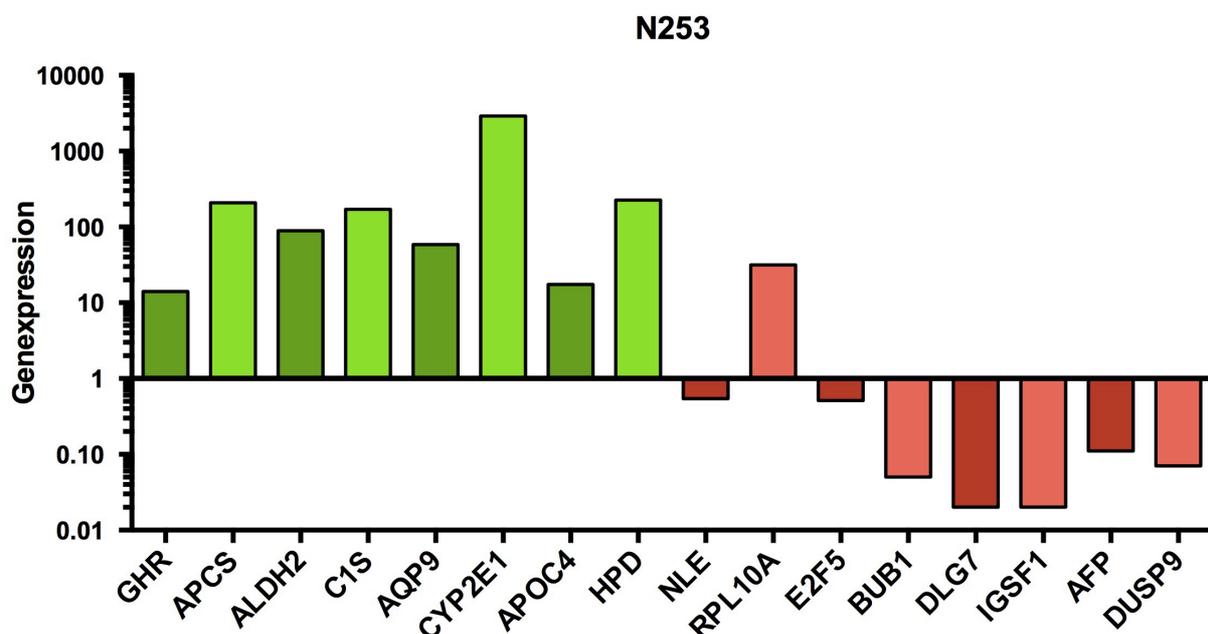
Aus **Abbildung 4-3** ist erkennbar, dass es Gene gibt, deren Expressionen zu intensiveren Farben neigen als andere Gene. Besonders auffällig ist dieses Phänomen für die C2-Gene *IGSF1*, *AFP* und *DUSP9*, die im Vergleich zu den anderen C2-Genen zu deutlicheren Expressionsmustern neigen. Bei den meisten Tumoren der C2-Gruppe sind diese Gene hoch exprimiert und daher hellrot im Cluster dargestellt, wohingegen drei Tumore kaum Expression dieser Gene zeigen und man sie im Cluster durch ihre hellgrüne Farbe erkennt. Da sich dieses Phänomen nur bei den drei Tumoren zeigt (T96, T125 und T82), legt sich die Vermutung nahe, dass es sich bei diesen vielleicht um eine eigene Untergruppe der C2-Tumoren mit niedrigem AFP handeln könnte.



**Abbildung 4-3** Clusteranalyse der 40 Hepatoblastome mit Unterteilung der Tumore in die C1- und C2-Untergruppen. In der Darstellung steht die grüne Farbe für niedrige Expressionswerte, die schwarze für mittlere und die rote für hohe, wobei die Intensität der Farben die Expressionsstärke widerspiegelt.

#### 4.1.3 Genprofil eines Normalleberpräparates

Um eine Vorstellung davon zu bekommen, wie sich die Expression der 16 Gene in einem Normalleberpräparat verhält, wurde diese an zwei Präparaten mittels qRT-PCR gemessen. **Abbildung 4-4** zeigt das Profil. Die Ähnlichkeit zu dem Profil der C1-Tumoren ist evident. Mit Ausnahme des stets erhöhten *RPL10A*-Gens zeigt sich keine Expression von C2-Genen.



**Abbildung 4-4** Genprofil eines Normalleberpräparates (hier N253). Die C1-Gene sind hoch exprimiert, die C2-Gene, bis auf das durchweg exprimierte *RPL10A*, zeigen eine geringe Expression.

#### 4.1.4 Die Höhe der Genexpression ist relevant für die Klassifizierung des Tumors

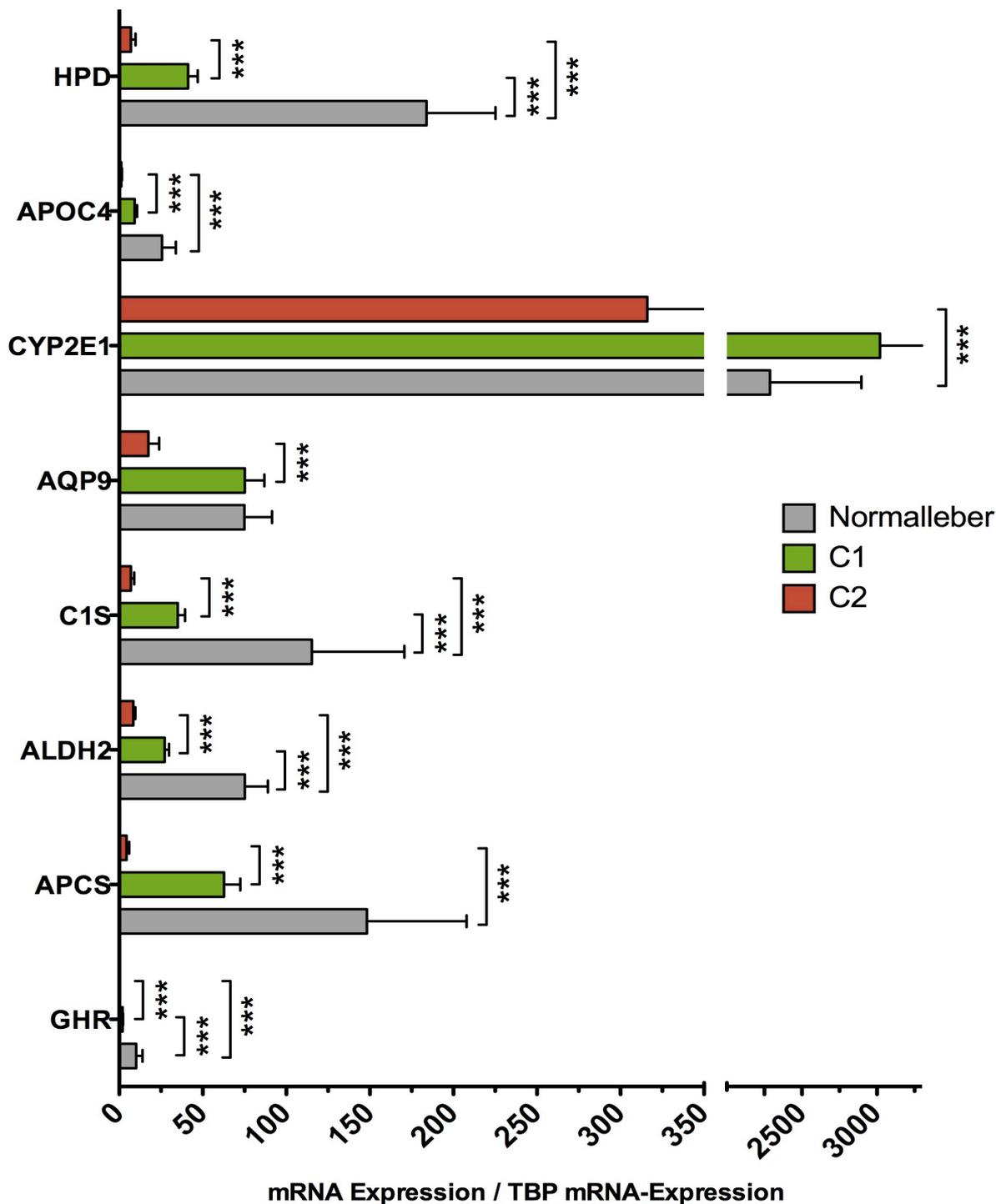
Vergleicht man die Mittelwerte der Expression aller 16 Gene in den Tumoren der Gruppen C1 und C2 miteinander, so zeigt sich für die meisten Gene (außer *CYP2E1* und *IGSF1*) ein signifikanter Unterschied. Auch der Vergleich der Tumorpräparate zu den beiden Normalleberpräparaten liefert signifikante Ergebnisse. **Abbildung 4-5** zeigt die Mittelwerte mit Standardabweichungen aller Tumoren und Normalleberpräparaten für die C1-Gene, **Abbildung 4-6** die der C2-Gene.

Die Abbildungen zeigen, dass die Höhe der Expression entscheidend für die Zuordnung des Tumors ist. Ein Tumor kann demnach alle 16-Gene exprimieren und trotzdem eindeutig einer der beiden Gruppen zugeordnet werden.

Auffallend ist auch, dass im Vergleich zu den Normalleberpräparaten die Expressionswerte der C1-Gene in beiden Gruppen, also C1 und C2, bis auf eine Ausnahme niedriger sind. In Tumoren werden diese Gene also scheinbar runterreguliert.

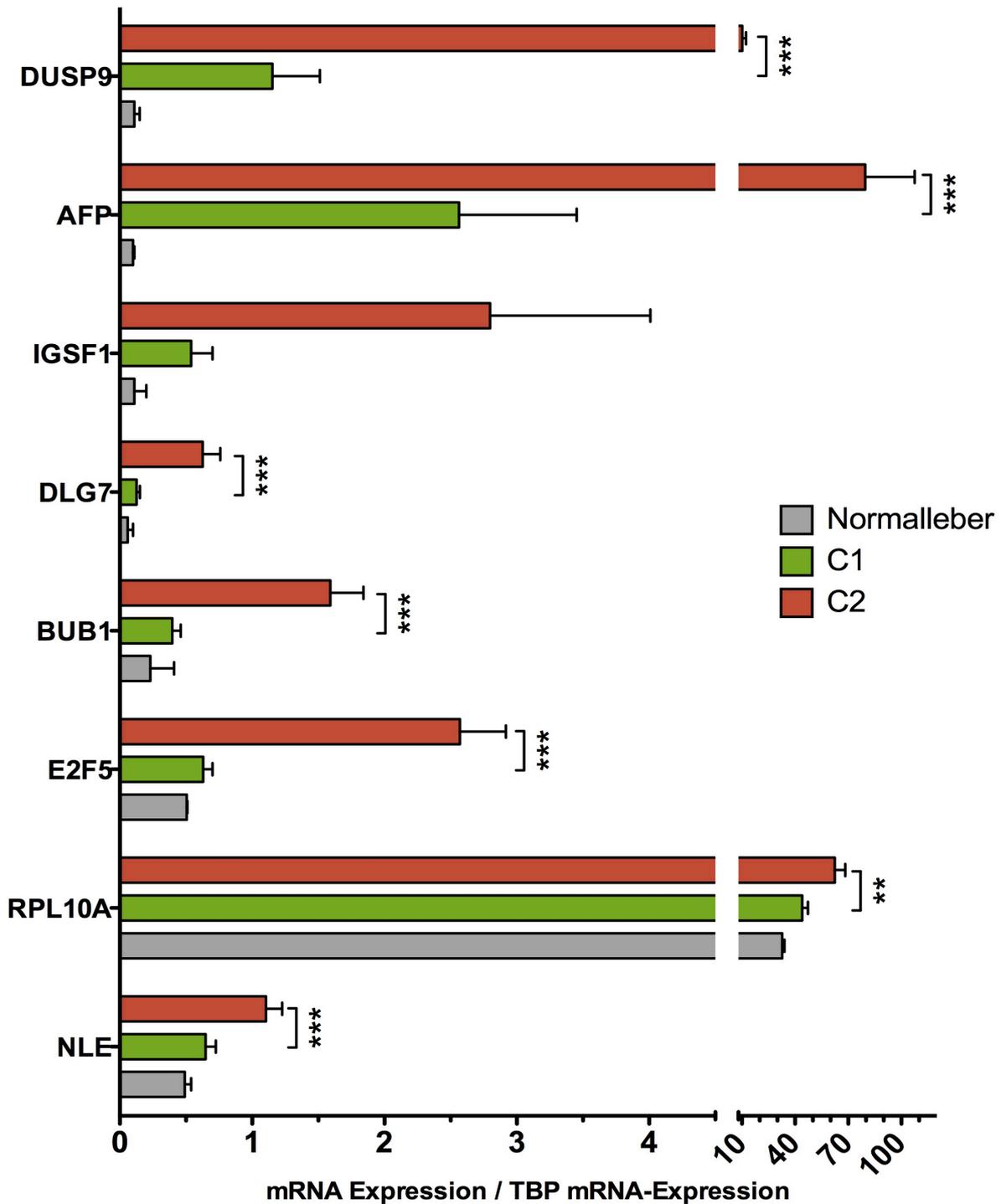
Das Gegenteil ist bei den C2-Tumoren der Fall. Während die Gene in den Normalleberpräparaten kaum exprimiert sind, sind sie deutlich höher in den Tumoren, besonders ausgeprägt in den Tumoren der C2-Gruppe, exprimiert. Nicht-neoplastisch verändertes Gewebe weist diese Gene demnach in nur ganz geringem Maße auf, in Tumoren sind sie hochreguliert. Für viele Gene kann daher anhand der Höhe der Expression darauf geschlossen werden, ob es sich bei dem Präparat um einen Tumor- oder ein Normalleberpräparat handelt.

### mRNA-Expression der C1-Signatur-Gene



**Abbildung 4-5** Die Grafik zeigt die Mittelwerte mit Standardabweichung der Expression der C1-Gene in allen Tumoren und Normalleberpräparaten (n=2). Die roten Balken repräsentieren die Werte der C1-Gruppe, die grünen die der C2-Gruppe und in grau sind die Normalleberpräparate dargestellt. Die Sterne geben nach gängigen Richtlinien das Signifikanzniveau an, beginnend mit einem \* entsprechend  $p \leq 0,05$ , \*\* entsprechend  $p \leq 0,01$  und \*\*\* entsprechend  $p \leq 0,001$ .

### mRNA-Expression der C2-Signatur-Gene

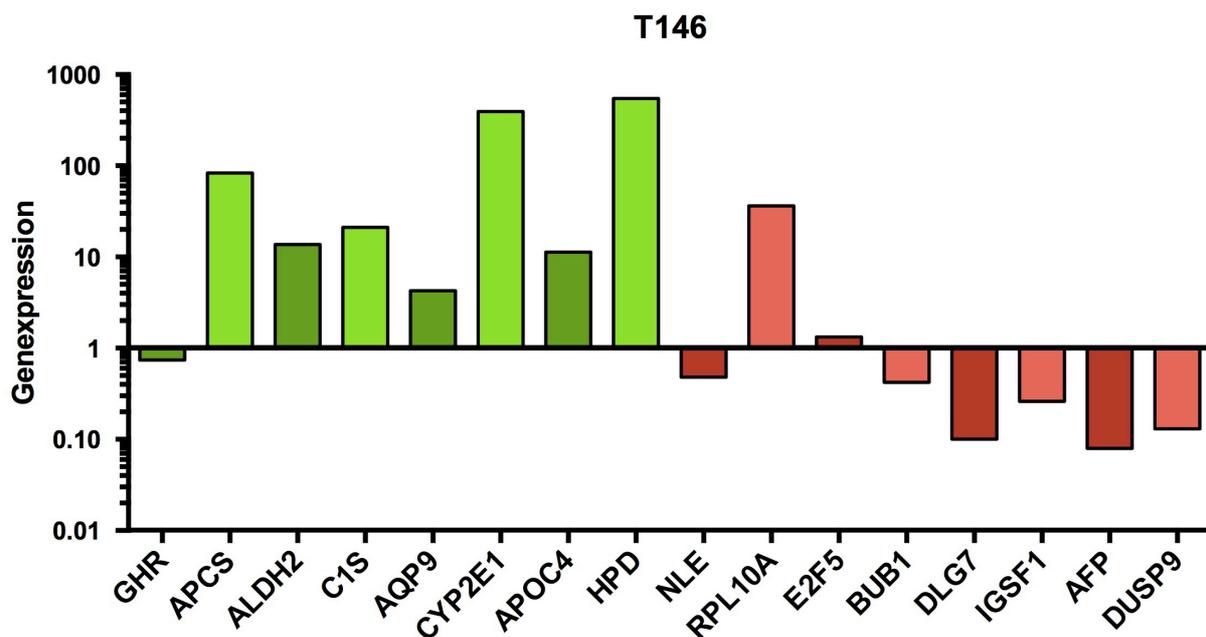


**Abbildung 4-6** Die Grafik zeigt die Mittelwerte mit Standardabweichung der Expression der C2-Gene in allen Tumoren und Normalleberpräparaten (n=2). Die roten Balken repräsentieren die Werte der C1-Gruppe, die grünen die der C2-Gruppe und in grau sind die Normalleberpräparate dargestellt. Die Sterne geben nach gängigen Richtlinien das Signifikanzniveau an, beginnend mit einem \* entsprechend  $p \leq 0,05$ , \*\* entsprechend  $p \leq 0,01$  und \*\*\* entsprechend  $p \leq 0,001$ .

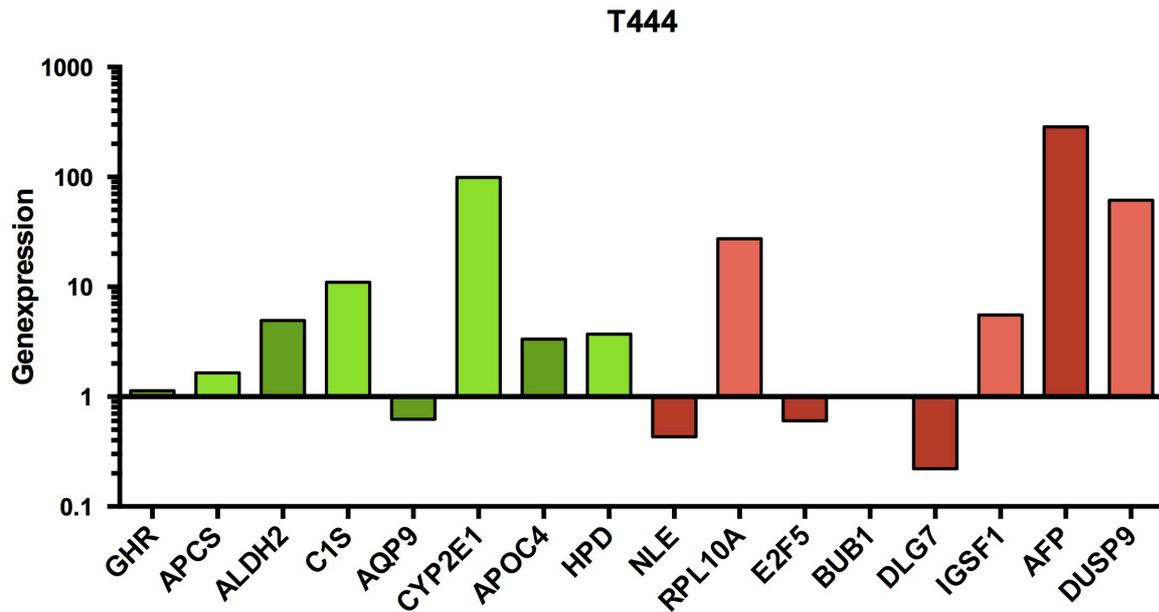
#### 4.1.5 Genprofil eines kindlichen hepatozellulären Karzinoms (HCC)

Zur Untersuchung der Hypothese, ob sich die 16-Gen-Signatur auch auf kindliche HCCs anwenden lässt, wurde an 9 kindlichen HCC-Tumorpräparaten mittels qRT-PCR die Expression der 16 Gene gemessen.

Während sich das Genprofil von dem Großteil dieser HCCs kaum von denen der C1-Tumoren und der Normalleberpräparate unterscheiden ließ (siehe **Abbildung 4-7**), zeigte sich in einem Präparat ein C2-ähnliches Profil (siehe **Abbildung 4-8**). Hier erkennt man die hohe Expression der C2-Gene *AFP* und *DUSP9*, was in den anderen HCC-Präparaten nicht zu finden war. Histologisch handelt es sich bei diesem Tumor um ein hoch differenziertes HCC, das einzige dieser Art unter den 9 Tumoren. Die anderen weisen eine fibrolamelläre oder mäßig differenzierte Histologie auf.



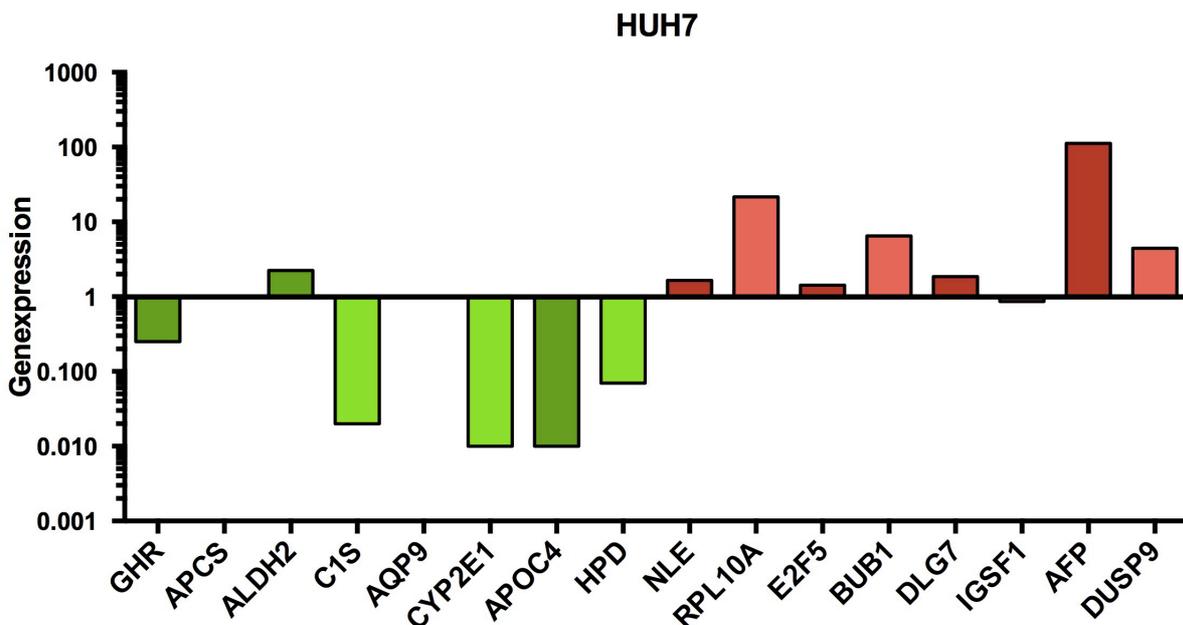
**Abbildung 4-7** Genprofil eines HCCs (hier Tumor T146) mit hauptsächlich hoch-exprimierten C1-Genen.



**Abbildung 4-8** Genprofil eines HCCs (hier Tumor T444) mit niedrig-exprimierten C1- und teilweise hoch-exprimierten C2-Genen.

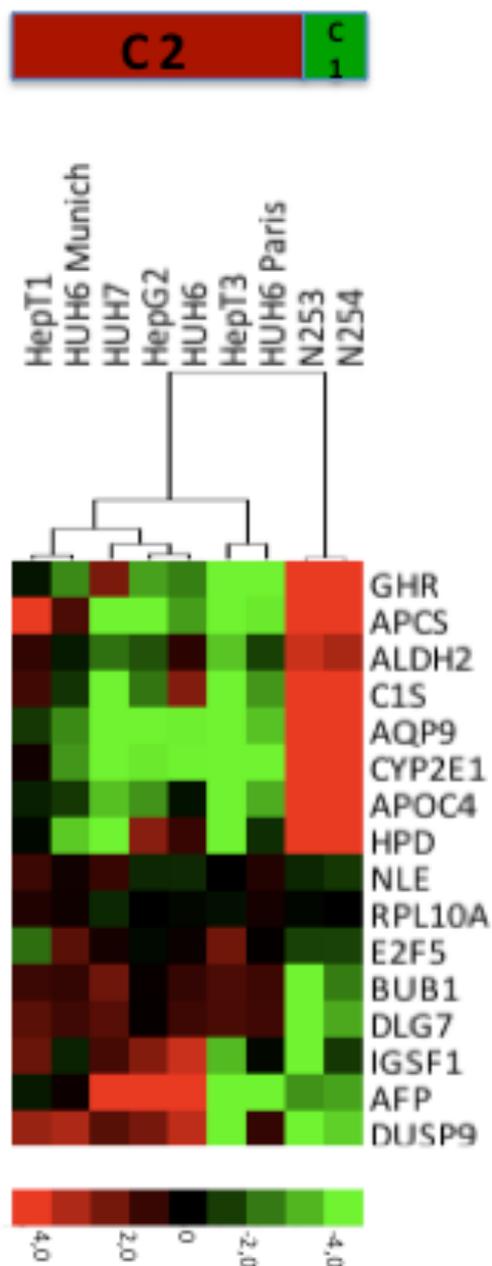
#### 4.1.6 Genprofil von Hepatoblastom- und HCC-Zelllinien

Nachdem sämtliche Tumorpräparate auf ihre Vereinbarkeit mit der 16-Gen-Signatur getestet waren, wurde zuletzt die Expression der 16-Gene an etablierten humanen Lebertumor-Zelllinien gemessen (siehe **Abbildung 4-9**).



**Abbildung 4-9** Beispiel einer hauptsächlich C2-Gene exprimierenden Lebertumor-Zelllinie (hier HUH7). Die C2-Gene sind dargestellt in rot. Die Expression der C1-Gene, dargestellt in grün, fällt hingegen niedrig aus.

Hierbei zeigten sich ausschließlich Expressionsmuster der C2-Gruppe. Für eine Einschätzung, inwieweit sich die Zelllinien von Normalleberpräparaten unterscheiden, wurden die Ergebnisse zusätzlich einer Clusteranalyse unterzogen (siehe **Abbildung 4-10**). Aus dieser ging hervor, dass alle Lebertumor-Zelllinien im Vergleich zum Normalgewebe, das eindeutig eine C1-Signatur trägt, einem C2-Genexpressionsmuster folgen.



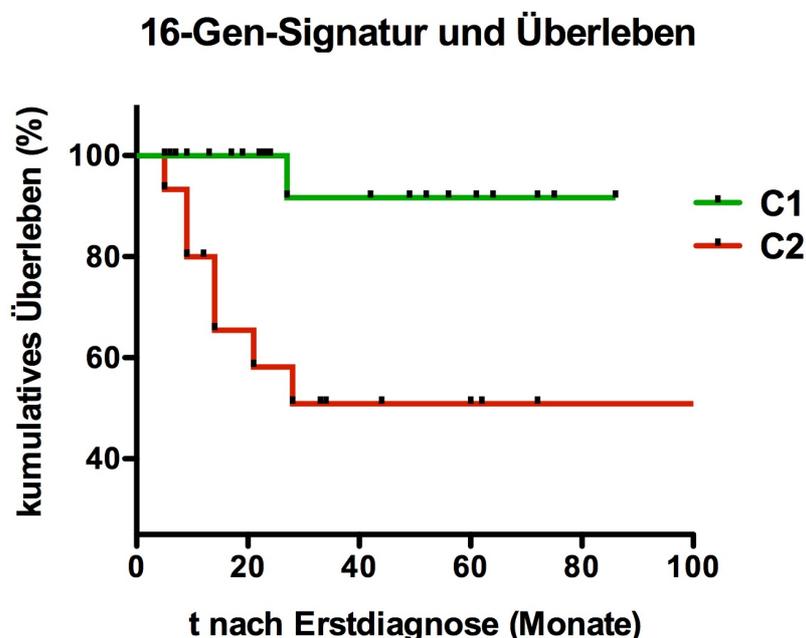
**Abbildung 4-10** Clusteranalyse der humanen Lebertumor-Zelllinien und Normalleberpräparaten. In der Darstellung steht die grüne Farbe für niedrige Expressionswerte, die schwarze für mittlere und die rote für hohe, wobei die Intensität der Farben die Expressionsstärke widerspiegelt.

## 4.2 Korrelation der 16-Gen-Signatur mit klinischen Parametern

### 4.2.1 Das Patientenüberleben korreliert signifikant mit ihrer Gruppenzugehörigkeit

Zu jedem von der Kinderchirurgischen Klinik der Universität München asservierten Tumorpräparat wurden und werden im Rahmen der Studie HB-99 sowie des Lebertumorregisters klinische Daten der Patienten gesammelt und archiviert. Leider sind nicht zu jedem Präparat alle klinischen Daten des Patienten ausreichend vorhanden, weshalb die Korrelationen immer mit der Anzahl an Tumoren durchgeführt wurden, deren Daten ausreichend vorhanden waren.

Bei der Korrelationsanalyse der klinischen Parameter dieser Patienten mit der 16-Gen-Signatur ergaben sich teilweise signifikante Ergebnisse. Es scheint somit Parameter zu geben, die mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit bevorzugt in einer der beiden Gruppen auftreten. Somit lässt sich ein Zusammenhang zwischen ihnen und der 16-Gen-Signatur herstellen. Betrachtet man beispielsweise das Überleben der Hepatoblastom-Patienten stratifiziert nach Zugehörigkeit zur C1- oder C2-Gruppe, so zeigt sich die in **Abbildung 4-11** gezeigte Kaplan-Meier-Überlebenskurve:



**Abbildung 4-11** Die 16-Gen-Signatur in Zusammenhang mit dem Überleben. Die Überlebenskurve zeigt das kumulative Überleben der C1-Tumoren im Vergleich zu den C2-Tumoren entlang der Zeitachse. Man sieht, dass im Verlauf der Zeit (t) deutlich mehr Todesfälle innerhalb der C2-Gruppe auftraten. Es besteht bezüglich des Überlebens ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen. P-Wert = 0.0022.

---

Von den insgesamt 8 Todesfällen aller 40 Hepatoblastom-Patienten, deren klinische Parameter dieser Untersuchung vorlagen, waren bis zum Datenstichtag am 04.09.2013 7 Patienten gemäß ihres Genprofils der C2-Gruppe zuzuordnen. Nur 1 Patient der C1-Gruppe starb. Dieser signifikante Unterschied zwischen den beiden Kurven zeigt, dass ein schlechteres Überleben mit einer höheren Expression von C2-Genen korreliert und umgekehrt für die C1-Gene ein besseres Überleben assoziiert werden kann.

#### **4.2.2 Korrelation weiterer klinischer Marker mit der 16-Gen-Signatur**

Doch nicht nur der Vergleich des Gesamtüberlebens zwischen C1- und C2-Patienten führt zu signifikanten Ergebnissen. Auch klinische Parameter wie die Risikogruppe des Patienten bei Diagnose, der histopathologische Subtyp, die Bildung von Metastasen, sowie die Infiltrierung des Tumors in die untere Hohlvene korrelierten signifikant mit der Expression von C2-Genen.

Die nachfolgende **Tabelle 3** veranschaulicht die Korrelationsergebnisse aller hier betrachteten klinischen Parameter mit der 16-Gen-Signatur.

## Resultate

**Tabelle 3** Klinische Daten von 40 Hepatoblastom-Patienten in Korrelation mit der 16-Gen-Signatur.

		16-Gen-Signatur			p-Wert	Signifikanzniveau
		N	N <sub>C1</sub>	N <sub>C2</sub>		
<b>Geschlecht</b>					1,000	n.s.
	Männlich	21	13	8		
	Weiblich	19	12	7		
<b>Alter zum Zeitpunkt der Diagnose</b>					0,7356	n.s.
	<25 Monate	26	17	9		
	>25 Monate	14	8	6		
<b>Überleben</b>					0,0022	**
	verstorben	8	1	7		
	Überlebt	32	24	8		
<b>Subtyp</b>					0,7301	n.s.
	Epithelial	27	16	11		
	Mischtyp	13	9	4		
<b>Histopathologie</b>					0,0090	**
	Embryonal	11	3	8		
	Fetal	29	22	7		
<b>Stadium</b>					0,0211	*
	Standard-Risiko	21	17	4		
	Hoch-Risiko	19	8	11		
<b>PRETEXT</b>					0,6857	n.s.
	1-3	31	20	11		
	4	8	4	4		
<b>Vena Cava / Vena hepatica-Infiltration</b>					0,0370	*
	Ja	8	2	6		
	Nein	31	22	9		
<b>Portalvenen-Infiltration</b>					1,000	n.s.
	Ja	3	2	1		
	Nein	36	22	14		
<b>Extrahepatische Expansion</b>					0,1346	n.s.
	Ja	2	0	2		
	Nein	38	25	13		
<b>Metastasen</b>					0,0235	*
	Ja	17	7	10		
	Nein	23	18	5		
<b>Metastasen Resektion</b>					0,4568	n.s.
	Ja	10	5	5		
	Nein	30	20	10		
<b>AFP (Serum) zum Diagnosezeitpunkt</b>					0,1294	n.s.
	Niedrig	2	0	2		
	Hoch	36	24	12		
<b>Chemotherapie</b>					1,000	n.s.
	Ja	37	22	15		
	Nein	3	2	1		
<b>Ansprechen auf Chemotherapie (AFP Abfall)</b>					0,5367	n.s.
	Ja	27	18	9		
	Nein	3	1	2		
<b>Resektionsstatus</b>					1,000	n.s.
	R0	32	20	12		
	R1	7	4	3		
<b>Multifokalität</b>					0,7110	n.s.
	Ja	9	5	4		
	Nein	30	19	11		
<b>Beta-Catenin Mutation</b>					0,6857	n.s.
	Ja	31	20	11		
	Nein	8	4	4		

N = Anzahl der Patienten; N<sub>C1/C2</sub> = Anzahl der Patienten innerhalb einer Gruppe; P-Wert mithilfe von „Fisher's exact test“

### 4.2.3 Epigenetische Modifizierung der Gene *RASSF1A* und *SFRP1*

Zu jedem Tumorpräparat stand aus studienbegleitenden Forschungsprojekten der Methylierungsstatus der Gene *RASSF1A*, *SFRP1*, *IGFBP3* und *HHIP* zur Verfügung. Korreliert man das Vorhandensein einer Promotermethylierung der epigenetischen Marker mit der 16-Gen-Signatur, zeigt sich bei zwei Markern eine signifikante Assoziation (siehe **Tabelle 4**). Die Marker *RASSF1A* und *SFRP1* treten signifikant häufiger in der C2-Gruppe, als in der C1-Gruppe auf.

Besonders bei dem Marker *RASSF1A* zeigt sich eine sehr hohe Assoziation mit der 16-Gen-Signatur. Innerhalb der C1-Gruppe gibt es keinen Tumor, in dem *RASSF1A* nachgewiesen werden konnte.

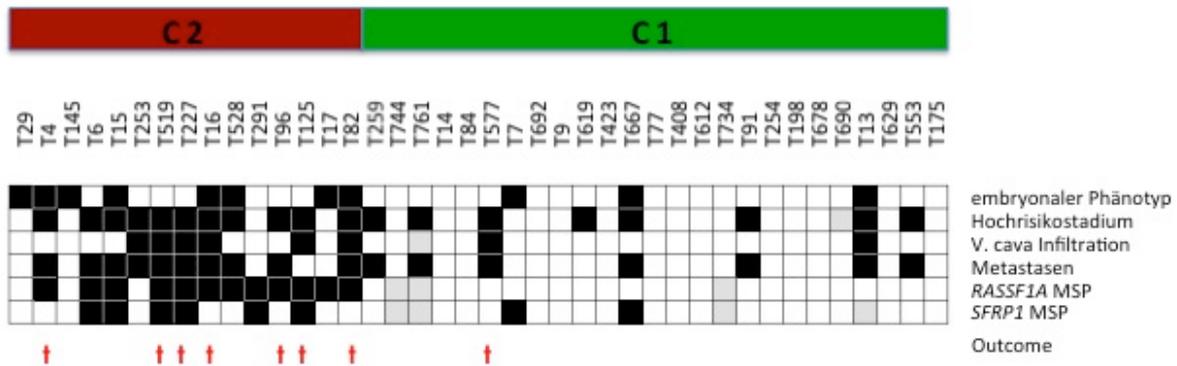
**Tabelle 4** Korrelation epigenetischer Marker mit der 16-Gen-Signatur.

	16-Gen-Signatur			p-Wert	Signifikanzniveau
	N	N <sub>C1</sub>	N <sub>C2</sub>		
<b>RASSF1A MSP</b>				<0,0001	****
Ja	13	0	13		
Nein	27	23	4		
<b>SFRP1 MSP</b>				0,0262	*
Ja	9	2	7		
Nein	30	20	10		
<b>IGFBP3 MSP</b>				1,000	n.s.
Ja	13	7	6		
Nein	27	16	11		
<b>HHIP MSP</b>				0,7298	n.s.
Ja	11	7	4		
Nein	29	16	13		

N = Anzahl der Patienten; N<sub>C1/C2</sub> = Anzahl der Patienten innerhalb einer Gruppe; P-Wert mithilfe von „Fisher's exact test“

#### 4.2.4 Zusammenfassung der Korrelationen der 16-Gen-Signatur

Aus der sich anschließenden Grafik (**Abbildung 4-12**) geht hervor, welche klinischen Parameter aus unserem Tumorkollektiv mit der 16-Gen-Signatur korreliert werden können.

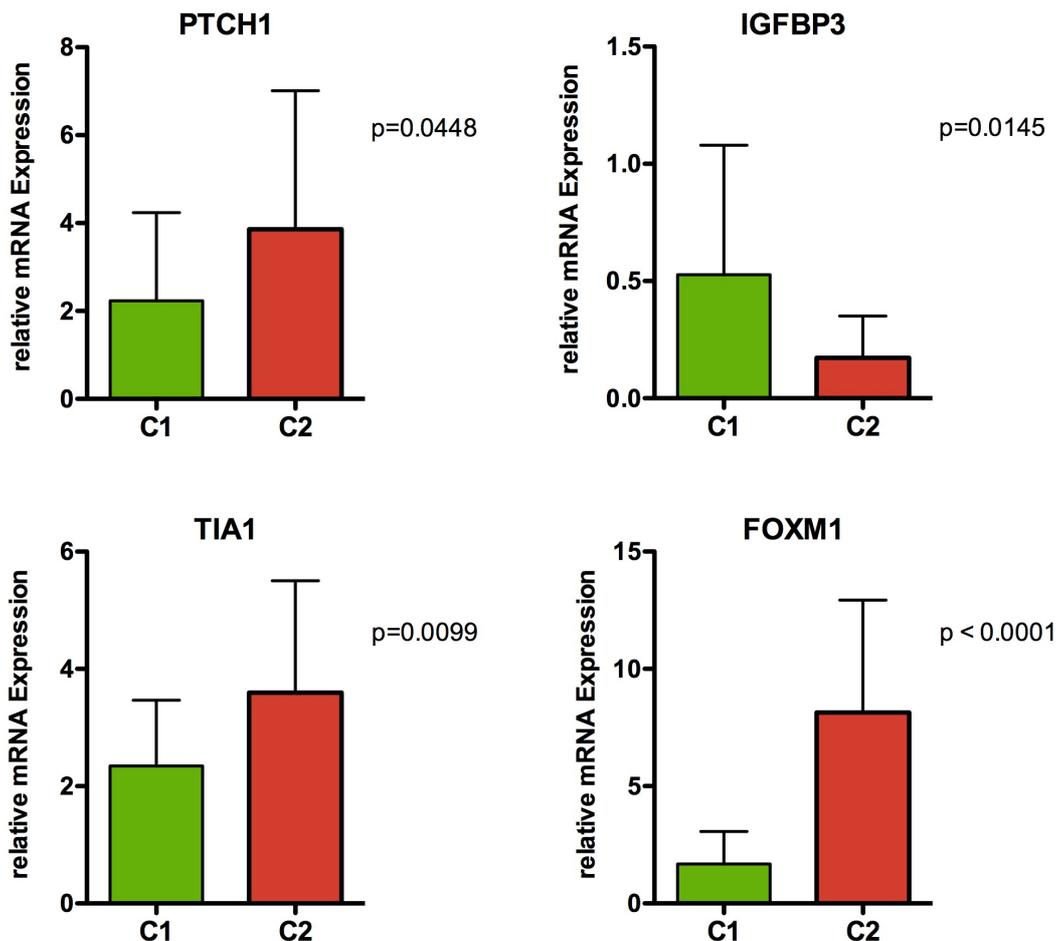


**Abbildung 4-12** Signifikante Korrelationen klinischer Parameter mit der 16-Gen-Signatur. Schwarzes Feld = Vorhandensein des Parameters, weißes Feld = Fehlen des Parameters, graues Feld = keine Daten vorhanden.

#### 4.3 Gene aus anderen Signalwegen korrelieren mit C1 und C2

Um eine präferenzielle Expression einiger im Rahmen studienbegleitender Forschungsprojekte erhobener Gene *PTCH1*, *IGFBP3*, *TIA1* und *FOXM1* in den Subgruppen C1 und C2 zu untersuchen, wurden die Expressionswerte miteinander verglichen. Die Gene spielen, wie bereits erläutert, in Signalwegen, die an der Tumorgenese von Hepatoblastomen beteiligt sind, eine große Rolle. Es zeigte sich für alle vier Gene eine signifikant unterschiedliche Expression in den beiden Gruppen (siehe **Abbildung 4-13**).

Wie bereits beschrieben, handelt es sich bei *PTCH1* um ein Zielgen des Hedgehog-Signalwegs, das in Hepatoblastomen konsekutiv erhöht ist [75]. Korreliert man die Expression des Genes mit der 16-Gen-Signatur, zeigt sich eine signifikant höhere mRNA Expression in der C2-Gruppe. Ähnlich verhält es sich bei dem Gen *TIA1*, einem Regulator des IGF2-Signalwegs. Besonders hervor sticht das hoch signifikante Ergebnis des Genes *FOXM1*, das in der C1-Gruppe kaum, dafür aber in der C2-Gruppe enorm exprimiert ist. Bei *FOXM1* handelt es sich wie bei *PTCH1* um ein Zielgen des Hedgehog-Signalwegs.



**Abbildung 4-13** Gene aus anderen Signalwegen, deren Expressionen sich signifikant zwischen den C1/C2-Subgruppen unterscheiden.

Während diese drei Gene unter den Tumoren der C2-Gruppe vermehrt exprimiert sind, ist *IGFBP3*, ein Negativregulator des IGF-Signalweges, bei den Tumoren der C1-Gruppe vermehrt exprimiert. Dies führt zu einer Hemmung des Signalweges mit konsekutiver Inhibition des Tumorwachstums.

Korreliert man die Expressionswerte der vier oben genannten Gene zu den klinischen Parametern unserer Patienten ergeben sich keine für diese Arbeit relevanten Ergebnisse (siehe **Tabelle 5**). Auf die Methylierung von *IGFBP3* und die Verwendung als epigenetischer Marker wird im weiteren Verlauf des Textes eingegangen.

## Resultate

**Tabelle 5** Klinische Daten von 40 HB-Patienten in Korrelation mit der Expression von *FOXM1*, *PTCH1* und *TIA1*

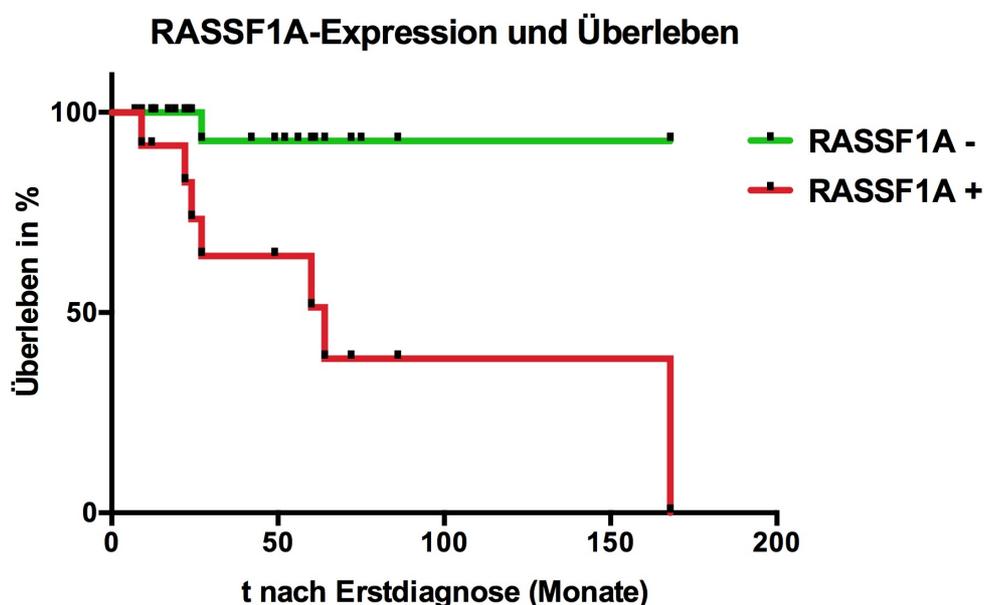
FOXM1, PTCH1 und TIA1				
	N	FOXM1	PTCH1	TIA1
<b>Geschlecht</b>				
	M 21 / F 19	0,8874	0,7487	0,4374
<b>Alter zum Diagnosezeitpunkt</b>				
	>22 Mo. 14 / <22Mo. 26	0,3242	<b>0,0461*</b>	0,8367
<b>Überleben</b>				
	leben 32 / verstorben 8	0,0929	0,9169	0,1187
<b>Subtyp</b>				
	epithelial 27 / Mischtyp 13	0,7954	0,2318	0,9643
<b>Histopathologie</b>				
	embryonal 11 / fetal 29	0,3411	0,7686	0,1917
<b>Stadium</b>				
	SR 21 / HR 19	0,3754	0,0701	0,8015
<b>PRETEXT</b>				
	I-III 31 / IV 8	0,8123	0,5917	<b>0,0328*</b>
<b>V. cava-Infiltration</b>				
	ja 8 / nein 31	0,2551	0,3757	0,2432
<b>Portalvenen-Infiltration</b>				
	ja 3 / nein 36	0,4738	0,2733	0,3678
<b>Extrahepatische Expansion</b>				
	ja 2 / nein 38	0,6213	0,4929	0,7716
<b>Metastasen</b>				
	ja 17 / nein 23	0,4054	0,3502	0,8634
<b>Metastasen-Resektion</b>				
	ja 10 / nein 30	0,4866	0,5699	0,9671
<b>AFP zum Diagnosezeitpunkt</b>				
	ja 2 / nein 37	0,3004	<b>0,0193*</b>	0,3526
<b>Chemotherapie</b>				
	ja 37 / nein 3	0,7952	0,7134	0,8315
<b>Chemotherapie Ansprechen</b>				
	ja 27 / nein 3	<b>0,0227*</b>	0,5094	0,1088
<b>Resektionsstatus</b>				
	R0 32 / R1 7	0,4372	0,7824	0,7312
<b>Multifokalität</b>				
	ja 9 / nein 30	0,9461	0,7965	0,0939
<b>Beta-Catenin Mutation</b>				
	ja 31 / nein 8	0,9865	0,1524	0,3948

In den Spalten werden die p-Werte der t-Teste der einzelnen Gene dargestellt. N = Anzahl der Patienten. Signifikante Ergebnisse sind mit einem \* gekennzeichnet.

#### 4.4 Klinische Parameter korrelieren mit epigenetischen Markern

##### 4.4.1 *RASSF1A* als präziser prognostischer Marker für das Outcome

Wie erwähnt zeigt sich die Hypermethylierung der Promoterregion des Tumorsuppressorgens *RASSF1A* besonders in den Tumoren der C2-Gruppe, also den prognostisch ungünstigeren HB-Tumoren. Aber auch bei Außerachtlassung der 16-Gen-Signatur ergaben sich aus den klinischen Parametern und dem Methylierungsstatus eines Tumors einige signifikante Korrelationen. Beispielsweise korreliert das Überleben enorm mit der Methylierung von *RASSF1A* (**Abbildung 4-14**).



**Abbildung 4-14** Der Biomarker *RASSF1A* in Zusammenhang mit dem Überleben. Die Überlebenskurve zeigt das kumulative Überleben von *RASSF1A*-positiven Tumoren gegenüber *RASSF1A*-negativen Tumoren entlang der Zeitachse. 7 der 8 Todesfälle fanden bei *RASSF1A*-positiven Tumoren statt. Der p-Wert entspricht 0.0005.

Die nachstehende **Tabelle 6** liefert einen Überblick über die Ergebnisse der Korrelationen von klinischen Parametern und des *RASSF1A*-Methylierungsstatus des Tumors.

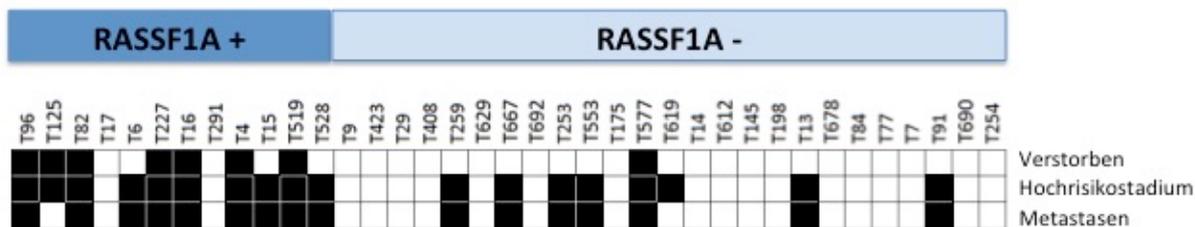
## Resultate

**Tabelle 6** Klinische Daten von 37 HB-Patienten in Korrelation mit ihrem *RASSF1A*-Methylierungsstatus.

		RASSF1A			p-Wert	Signifikanzniveau
		N	N+	N-		
<b>Geschlecht</b>	Männlich	22	8	14	0,7369	n.s.
	Weiblich	18	5	13		
<b>Alter zum Zeitpunkt der Diagnose</b>					0,1464	n.s.
	<25 Monate	25	6	19		
	>25 Monate	12	6	6		
<b>Überleben</b>	verstorben	8	7	1	0,0005	***
	Überlebt	29	5	24		
<b>Subtyp</b>	Epithelial	25	9	16	0,7110	n.s.
	Mischtyp	12	3	9		
<b>Histopathologie</b>					0,1216	n.s.
	Embryonal	11	6	5		
	Fetal	26	6	20		
<b>Stadium</b>					0,0051	**
	Standard-Risiko	19	2	17		
	Hoch-Risiko	18	10	8		
<b>PRETEXT</b>					1,000	n.s.
	1-3	29	9	20		
	4	8	3	5		
<b>Vena Cava / Vena hepatica-Infiltration</b>					0,0829	n.s.
	Ja	8	5	3		
	Nein	29	7	22		
<b>Portalvenen-Infiltration</b>					1,000	n.s.
	Ja	3	1	2		
	Nein	34	10	24		
<b>Extrahepatische Expansion</b>					0,0991	n.s.
	Ja	2	2	0		
	Nein	35	10	25		
<b>Metastasen</b>					0,0124	*
	Ja	16	9	7		
	Nein	21	3	18		
<b>Metastasen Resektion</b>					0,1161	n.s.
	Ja	9	5	4		
	Nein	28	7	21		
<b>AFP (Serum) zum Diagnosezeitpunkt</b>					0,1048	n.s.
	Niedrig	2	2	0		
	Hoch	34	10	24		
<b>Chemotherapie</b>					0,5367	n.s.
	Ja	34	12	22		
	Nein	3	0	3		
<b>Ansprechen auf Chemotherapie (AFP Abfall)</b>					1,000	n.s.
	Ja	25	8	17		
	Nein	3	1	2		
<b>Resektionsstatus</b>					0,6594	n.s.
	R0	30	9	21		
	R1	7	3	4		
<b>Multifokalität</b>					1,000	n.s.
	Ja	9	3	6		
	Nein	28	9	19		
<b>Beta-Catenin Mutation</b>					0,6594	n.s.
	Ja	30	9	21		
	Nein	7	3	4		

N = Anzahl der Patienten; N+ = Anzahl der *RASSF1A*-positiven Patienten; N- = Anzahl der *RASSF1A*-negativen Patienten; P-Wert mithilfe von „Fisher's exact test“

Zusammenfassend sind folgende 3 Parameter in der klinischen Korrelation mit *RASSF1A* signifikant (**Abbildung 4-15**).



**Abbildung 4-15** Zusammenfassung aller signifikanten Korrelationen von *RASSF1A* mit klinischen Parametern.

#### 4.4.2 Hypermethylierung von *IGFBP3* korreliert mit invasivem Tumorwachstum

Die Hypermethylierung von *IGFBP3*, eines Negativregulators des IGF-Signalwegs, korreliert zwar nicht mit dem Überleben der Patienten, jedoch mit dem höchsten PRETEXT-Stadium 4, Vena cava-Infiltrationen und dem Zustand nach Metastasen-Resektion. Also spricht das Vorhandensein einer *IGFBP3*-Methylierung in einem Hepatoblastom für einen prognostisch ungünstigeren Tumor. In der nachfolgenden **Tabelle 7** werden die Ergebnisse der Korrelationen aufgeführt.

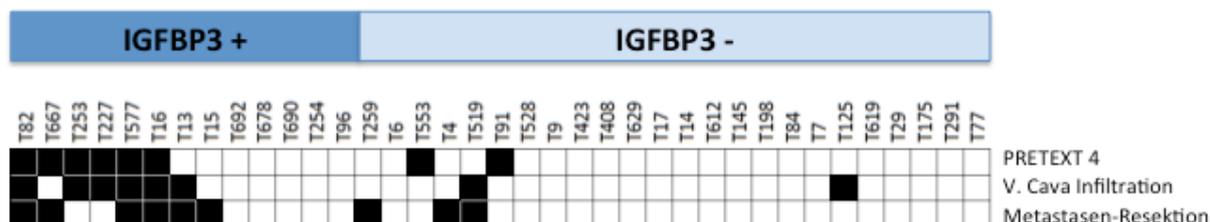
## Resultate

**Tabelle 7** Klinische Daten von 37 HB-Patienten in Korrelation mit ihrem *IGFBP3*-Methylierungsstatus.

		IGFBP3			p-Wert	Signifikanzniveau
		N	N+	N-		
<b>Geschlecht</b>					1,000	n.s.
	Männlich	20	6	14		
	Weiblich	17	6	11		
<b>Alter zum Zeitpunkt der Diagnose</b>					1,000	n.s.
	<25 Monate	25	8	17		
	>25 Monate	12	4	8		
<b>Überleben</b>					0,3945	n.s.
	verstorben	8	4	4		
	Überlebt	29	8	21		
<b>Subtyp</b>					1,000	n.s.
	Epithelial	25	8	17		
	Mischtyp	12	4	8		
<b>Histopathologie</b>					0,4434	n.s.
	Embryonal	11	5	6		
	Fetal	26	7	19		
<b>Stadium</b>					0,1704	n.s.
	Standard-Risiko	19	4	15		
	Hoch-Risiko	18	8	10		
<b>PRETEXT</b>					0,0077	**
	1-3	29	6	23		
	4	8	6	2		
<b>Vena Cava / Vena hepatica-Infiltration</b>					0,0077	**
	Ja	8	6	2		
	Nein	29	6	23		
<b>Portalvenen-Infiltration</b>					0,2407	n.s.
	Ja	3	2	1		
	Nein	34	10	24		
<b>Extrahepatische Expansion</b>					1,000	n.s.
	Ja	2	1	1		
	Nein	35	11	24		
<b>Metastasen</b>					0,0768	n.s.
	Ja	16	8	8		
	Nein	21	4	17		
<b>Metastasen Resektion</b>					0,0355	*
	Ja	9	6	3		
	Nein	28	6	22		
<b>AFP (Serum) zum Diagnosezeitpunkt</b>					0,5367	n.s.
	Niedrig	2	0	2		
	Hoch	34	12	22		
<b>Chemotherapie</b>					0,5367	n.s.
	Ja	34	12	22		
	Nein	3	0	3		
<b>Ansprechen auf Chemotherapie (AFP Abfall)</b>					0,5604	n.s.
	Ja	25	10	15		
	Nein	3	2	1		
<b>Resektionsstatus</b>					0,1827	n.s.
	R0	30	8	22		
	R1	7	4	3		
<b>Multifokalität</b>					0,1161	n.s.
	Ja	9	5	4		
	Nein	28	7	21		
<b>Beta-Catenin Mutation</b>					0,3891	n.s.
	Ja	30	11	19		
	Nein	7	1	6		

N = Anzahl der Patienten; N+ = Anzahl der *IGFBP3*-positiven Patienten; N- = Anzahl der *IGFBP3*-negativen Patienten; P-Wert mithilfe von „Fisher's exact test“

Insgesamt sind also folgende 3 Parameter mit der Methylierung von *IGFBP3* signifikant (siehe **Abbildung 4-16**).



**Abbildung 4-16** Zusammenfassung aller signifikanten Korrelationen von *IGFBP3* mit klinischen Parametern.

#### 4.4.3 Hypermethylierung von *SFRP1* korreliert mit dem R1-Resektionsstatus

*SFRP1*, das als Modulator des Wnt-Signalwegs gilt, zeigte in vielen der C2-Tumoren Hypermethylierungen auf. Von 9 Tumoren, die insgesamt Methylierungen aufwiesen, waren 7 in der Gruppe der C2-Tumoren zu finden. Doch abgesehen von der 16-Gen-Signatur korreliert die Methylierung von *SFRP1* auch mit dem Resektionsstatus der Tumoren. In Tumoren, in denen der Tumor nicht vollständig reseziert werden konnte, weswegen der Pathologe ihn R1 klassifizierte, traten gehäuft Methylierungen von *SFRP1* auf. Somit ist auch dieser ein Marker für einen ungünstigeren Verlauf. **Tabelle 8** veranschaulicht die Ergebnisse der klinischen Korrelationen.

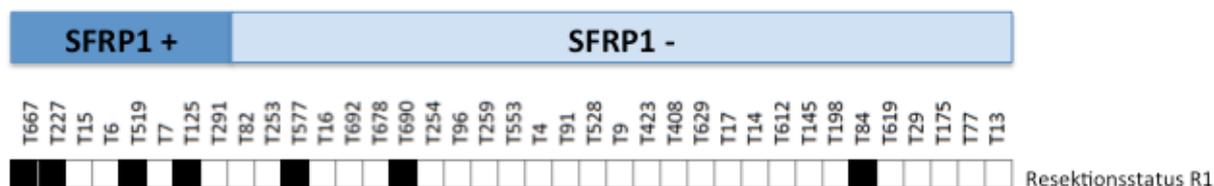
## Resultate

**Tabelle 8** Klinische Daten von 36 HB-Patienten in Korrelation mit ihrem *SFRP1*-Methylierungsstatus.

		SFRP1			p-Wert	Signifikanzniveau
		N	N+	N-		
<b>Geschlecht</b>					0,7086	n.s.
	Männlich	20	5	15		
	Weiblich	16	3	13		
<b>Alter zum Zeitpunkt der Diagnose</b>					0,6781	n.s.
	<25 Monate	25	5	20		
	>25 Monate	11	3	8		
<b>Überleben</b>					0,3384	n.s.
	verstorben	8	3	5		
	Überlebt	28	5	23		
<b>Subtyp</b>					0,6910	n.s.
	Epithelial	24	6	18		
	Mischtyp	12	2	10		
<b>Histopathologie</b>					0,6576	n.s.
	Embryonal	10	3	7		
	Fetal	26	5	21		
<b>Stadium</b>					0,1138	n.s.
	Standard-Risiko	19	2	17		
	Hoch-Risiko	17	6	11		
<b>PRETEXT</b>					1,000	n.s.
	1-3	28	6	22		
	4	8	2	6		
<b>Vena Cava / Vena hepatica-Infiltration</b>					0,1675	n.s.
	Ja	7	3	4		
	Nein	29	5	24		
<b>Portalvenen-Infiltration</b>					1,000	n.s.
	Ja	3	0	3		
	Nein	33	8	25		
<b>Extrahepatische Expansion</b>					0,4000	n.s.
	Ja	2	1	1		
	Nein	34	7	27		
<b>Metastasen</b>					0,2358	n.s.
	Ja	15	5	10		
	Nein	21	3	18		
<b>Metastasen Resektion</b>					0,3384	n.s.
	Ja	8	3	5		
	Nein	28	5	23		
<b>AFP (Serum) zum Diagnosezeitpunkt</b>					0,4000	n.s.
	Niedrig	2	1	1		
	Hoch	34	7	27		
<b>Chemotherapie</b>					1,000	n.s.
	Ja	33	8	25		
	Nein	3	0	3		
<b>Ansprechen auf Chemotherapie (AFP Abfall)</b>					0,5453	n.s.
	Ja	24	5	19		
	Nein	3	1	2		
<b>Resektionsstatus</b>					0,0301	*
	R0	29	4	25		
	R1	7	4	3		
<b>Multifokalität</b>					1,000	n.s.
	Ja	9	2	7		
	Nein	27	6	21		
<b>Beta-Catenin Mutation</b>					1,000	n.s.
	Ja	29	7	22		
	Nein	7	1	6		

N = Anzahl der Patienten; N+ = Anzahl der *SFRP1*-positiven Patienten; N- = Anzahl der *SFRP1*-negativen Patienten; P-Wert mithilfe von „Fisher's exact test“

Somit ist, wie in **Abbildung 4-17** dargestellt, einzig der Resektionsstatus des Tumors mit einem positiven Methylierungsstatus zu korrelieren.



**Abbildung 4-17** Zusammenfassung aller signifikanten Korrelationen von *SFRP1* mit klinischen Parametern.

#### 4.4.4 Die Methylierung von *HHIP* korreliert nicht mit klinischen Daten

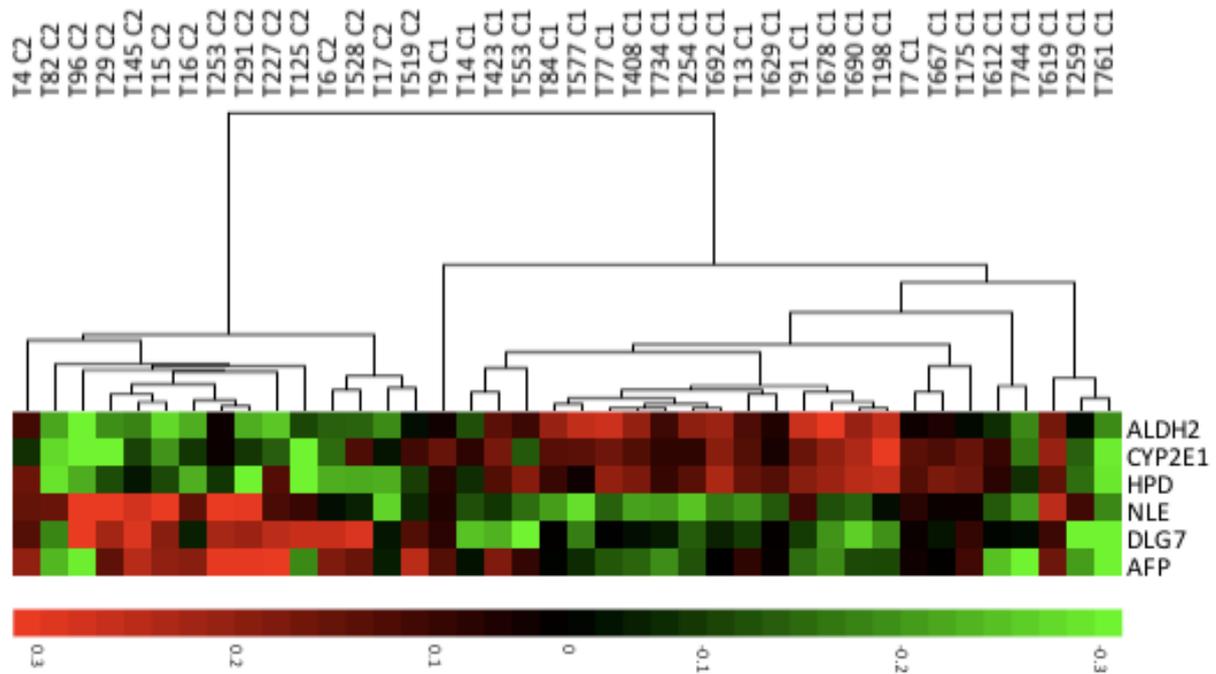
Die Promoterregion des Gens *HHIP* ist in 9 von unseren 37 HB-Tumorpräparaten hypermethyliert und somit inaktiv. Regulär sorgt *HHIP* für eine negative Rückkopplung des Hh-Signalwegs und dadurch zur Inhibition.

Obwohl für den Hh-Signalweg eine bereits belegte Assoziation zur Hepatoblastomgenese besteht, ergeben sich für unsere Präparate keinerlei Korrelationen zwischen dem Auftreten einer Methylierung und einem klinischen Ereignis.

#### 4.5 Reduzierung der 16-Gen-Signatur auf sechs Gene

Nachdem die 16-Gen-Signatur eine eindeutige Einteilung der Tumoren vornehmen konnte, stellte sich die Frage, ob man diese auf eine überschaubarere Menge an Genen reduzieren könnte und ob diese neue Signatur die gleiche Einteilung der Tumoren liefern würde.

In den hier untersuchten Tumoren lieferte die Auswahl einer 6-Gen-Signatur bestehend aus *ALDH2*, *CYP2E1*, *HPD*, *NLE*, *DLG7* und *AFP* die exakt gleiche Einteilung für die Tumoren wie die komplette 16-Gen-Signatur (siehe **Abbildung 4-18**).



**Abbildung 4-18** Einteilung der Tumoren (n=40) mit einer 6-Gen-Signatur. Die Tumoren ändern ihre vorherige Gruppeneinteilung durch die 16-Gen-Signatur auch nach einer Reduktion der Anzahl der Gene nicht.

Die Auswahl der 6 Gene erfolgte durch Weglassen immer weiterer Gene, nachdem das Weglassen eines einzelnen Genes mit der Ausnahme von *CYP2E1* zu keiner Veränderung der Einteilung führte. Sobald ein Gen für eine abweichende Zuordnung eines Tumors sorgte, wurde dieses Gen in die reduzierte Signatur integriert. Dadurch ergab sich zunächst eine 5-Gen-Signatur, bestehend aus *CYP2E1*, *HPD*, *NLE*, *DLG7* und *AFP*. Ergänzt wurde diese Signatur um das Gen *ALDH2*, einem Hepatozytenmarker für ausgereifte Zellen, das zwar nicht essenziell für die Zuteilung war, aber als ein starkes C1-Gen identifiziert werden kann und für ein Gleichgewicht der Gruppen in der reduzierten Signatur sorgt.

Betrachtet man die Gene, aus denen sich die 6-Gen-Signatur zusammensetzt, fällt auf, dass sich die Mittelwerte aller Messungen dieser 6 Gene zwischen den beiden Gruppen C1 und C2 signifikant unterschieden (siehe **Abbildung 4-5** und **Abbildung 4-6**; p-Wert für *ALDH2* <0,0001, *HPD* <0,0001, *NLE* 0,0018, *DLG7* <0,0001 und *AFP* 0,0008). Einzig das Gen *CYP2E1* (p-Wert =0,1018) führt bei einer vergleichenden Analyse zu keinem signifikanten Ergebnis, da die Expressionswerte von enormen Ausreißern beeinflusst werden. Trotzdem ist auch dieses Gen essenziell für das Funktionieren der Signatur. Das alleinige Weglassen des Gens aus

der 16-Gen-Signatur führte beispielsweise bereits zu dem Übertritt von jeweils 4 Tumoren in die andere Subgruppe und sorgte dadurch für eine stark abweichende Einteilung. Die nachfolgende **Tabelle 9** zeigt, wie sich die Signatur nach Weglassen eines der 6 Gene verhält und verdeutlicht, weshalb diese 6 Gene für eine Zuordnung entscheidend sind.

**Tabelle 9** Veränderung der Zuordnung durch weitere Reduktion der 6-Gen-Signatur.

<b>Weitere Reduktion der 6-Gen-Signatur</b>			
<b>Gen</b>	Anzahl richtiger Zuordnungen	Veränderte Zuordnungen	
		C1→C2	C2→C1
<b>ALDH2</b>	40/40	0	0
<b>CYP2E1</b>	39/40	1	0
<b>HPD</b>	37/40	2	1
<b>NLE</b>	38/40	2	0
<b>DLG7</b>	34/40	6	0
<b>AFP</b>	39/40	1	0

Durch Reduktion der Signatur um weitere Gene, dargestellt in der Spalte links, verändert sich die Anzahl richtiger Zuordnungen zu den Subgruppen. Die rechten Spalten zeigen an, ob ein vorbeschriebener C1-Tumor zu einem C2-Tumor wurde oder umgekehrt.

#### 4.6 Zusammenfassende Beurteilung der Resultate

Die 16-Gen-Signatur ermöglicht die Einteilung der untersuchten Hepatoblastompräparate in zwei Gruppen. Diese Gruppen unterscheiden sich anhand ihres Genprofils eindeutig voneinander. Die Höhe der Expression ist zudem wichtiger als das Vorhandensein einer Expression, denn sie unterscheidet sich bei 14 von 16 Genen signifikant.

Normalleberpräparate ordnen sich gemäß ihres Genprofil in die Gruppe der C1-Tumoren ein, die Expression dieser Gene ist im Vergleich zu den Tumoren jedoch deutlich höher. Dahingegen liefern humane Zelllinien eher das Genprofil von C2-Tumoren, während C1-Gene kaum exprimiert sind. Kindliche HCCs zeigen kein eindeutiges Genprofil und erschweren eine Gruppeneinteilung.

In den Korrelationen der 16-Gen-Signatur mit klinischen Parametern zeigen sich signifikante Ergebnisse bezogen auf das Überleben, den Risikostatus, die Vena

Cava-Infiltration und die Ausbildung von Metastasen. All diese Parameter sorgen für eine ungünstigere Prognose des Patienten. Doch auch die epigenetischen Marker *RASSF1A*, *IGFBP3* und *SFRP1* korrelieren mit klinischen Parametern. Insbesondere *RASSF1A* zeigt eine hohe Übereinstimmung mit dem Überleben der Patienten an.

Neben der 16-Gen-Signatur liefert auch eine 6-Gen-Signatur bestehend aus den Genen *ALDH2*, *CYP2E1*, *HPD*, *NLE*, *DLG7* und *AFP* die exakt gleiche Einteilung der Tumoren in die Subgruppen C1 und C2.

---

## 5 Diskussion

Das Hepatoblastom ist im Verlauf der letzten Jahrzehnte zu einer gut behandelbaren Tumorerkrankung geworden. Die Überlebensraten liegen allgemein bei über 70% [35].

Jedoch gibt es nach wie vor Hochrisikopatienten, deren Tumoren aggressives Wachstum, frühes Ausbilden von Metastasen und Infiltrationen in die umliegenden Gewebe und Gefäße aufweisen. Die Überlebenschancen dieser Hochrisikopatienten sind deutlich schlechter und liegen bei 46 bis 57% [134; 135]. In Studien konnten durch gezielte hochdosierte Chemotherapie und anschließende operative Resektion die Überlebenschancen dieser Patienten verbessert werden, weshalb es von enormer Wichtigkeit ist, diese Patienten herauszufiltern und ihnen eine angepasste Therapie zukommen zu lassen [136].

Ziel der Arbeit war die Evaluation bestehender Biomarker, sowie deren mögliche Verbesserung und die Erweiterung der Diagnostik um neue Biomarker. Folgende Fragen sollten durch diese Forschungsarbeit beantwortet werden: Lassen sich die bisher identifizierten Biomarker auf unser Kollektiv von 40 Patienten anwenden? Besteht die Möglichkeit, diese Marker weiter zu verbessern, um deren Aussagefähigkeit zu steigern?

Wir konnten zeigen, dass sich unser Kollektiv aus 40 Tumoren per Genexpressionsanalyse eindeutig in zwei Gruppen unterteilen ließ. Dies bestätigt zu gewissen Teilen die bereits bekannten Ergebnisse aus dem Pariser Kollektiv [97]. Die sogenannte 16-Gen-Signatur war in der Lage, die aggressivere Variante des Hepatoblastoms zu identifizieren. Durch eine Reduktion der Gensignatur auf 6 Gene konnten wir weiterhin eine ebenso exakte Einteilung zwischen C1- und C2-Tumoren erreichen.

Unter denen zum Vergleich untersuchten Biomarkern zeigte sich *RASSF1A* als enorm präziser prognostischer Marker für das Überleben. Schwächer dahingegen zeigten sich die Biomarker *IGFBP3* und *SFRP1*, bei denen sich nur einzelne Korrelationen der klinischen Daten mit dem Methylierungsstatus finden ließen.

### 5.1 Unterschiede und Gemeinsamkeiten im klinischen Verlauf der Patienten

Krankheitsverläufe sind stets individuell und von einer Vielzahl Faktoren abhängig. So ist es bei einer Krebserkrankung entscheidend, wann der Patient das erste Mal einen Arzt konsultiert, wie weit die Erkrankung zu diesem Zeitpunkt fortgeschritten ist und ob mit einer Therapie unverzüglich begonnen werden kann.

Die in dieser Arbeit verwendeten klinischen Daten der 40 Hepatoblastom-Patienten weisen viele individuelle Aspekte auf und unterscheiden sich dadurch voneinander. Doch gleichzeitig ist manches im Verlauf ähnlich, wenn man zum Beispiel betrachtet, wie alt der Patient bei der Diagnose war, in welchem Stadium er sich befand und ob er ein Rezidiv entwickelte oder nicht – viele dieser Parameter scheinen miteinander zu korrespondieren.

Bezogen auf das Alter der Patienten zum Diagnosezeitpunkt fällt auf, dass in der Gruppe der Patienten unter 25 Monaten, dem statistisch häufigsten Erkrankungsalter für HBs [137], nur 3 von 26 Patienten ein Rezidiv entwickelten und daran verstarben, wohingegen es 5 von 14 in der Gruppe der Patienten über 25 Monaten waren. Die 8 Patienten, die an dem Fortschreiten ihrer Erkrankung letztendlich verstarben, stellten sich alle mit einem ausgeprägten Befund vor, einem PRETEXT Stadium 3 oder 4. Diese Stadien beinhalten den Befall von 3 oder 4 Leberquadranten durch einen großen oder multifokalen Tumor [38]. 7 dieser 8 Patienten hatten bereits Metastasen oder bekamen diese im Verlauf, bei 6 Patienten infiltrierte der Tumor außerdem die untere Hohlvene.

Von 9 Patienten mit einem multifokalen Tumor verstarben 4. In einer Studie von Saettini et al. wird vorgeschlagen, Multifokalität als prognostisch negativen Marker zu verwenden [138]. Für unser Kollektiv kann dies zwar nicht eindeutig bestätigt werden, aber eine Tendenz ist zu erkennen.

Dass Jungen häufiger vom HB betroffen sind, konnte für unser Kollektiv nicht signifikant bestätigt werden: 21 von 40 Patienten sind männlich, 19 weiblich. Auch dass die Höhe des AFP-Wertes bei Diagnose richtungsgebend für den Verlauf ist, trifft auf unsere 40 Patienten nicht ausschließlich zu. Man geht, wie bereits beschrieben, davon aus, dass AFP-Werte  $>1.000.000$  ng/ml und  $<100$  ng/ml mit einer schlechten Prognose assoziiert sind [30; 31]. 5 der 8 verstorbenen Patienten unseres Kollektivs hatten aber einen AFP-Wert außerhalb dieser beiden Extreme,

---

also inmitten aller anderen Patienten. Insgesamt wiesen 4 Patienten einen AFP-Wert >1.000.000 ng/ml auf und nur einer von ihnen verstarb. Zwei dieser Patienten hatten sogar ein PRETEXT Stadium 2, also ein eher niedriges Stadium. Im Gegensatz dazu scheinen AFP-Werte <100 ng/ml tatsächlich mit einer schlechten Prognose einherzugehen. Beide Patienten, deren AFP bei 5 ng/ml und 13 ng/ml lag, verstarben.

Die Beispiele zeigen, dass viele klinische Parameter bereits Hinweise auf den Verlauf der Erkrankung liefern können. Es gilt nun, die klinischen Parameter herauszufiltern, die für prognostische Interpretationen am geeignetsten sind. In der bisherig größten Auswertung von klinischen Daten von HB-Patienten kommen Czauderna et al. zu dem Schluss, dass das Vorhandensein von Metastasen, ein hohes PRETEXT-Stadium und ein niedriges AFP (< 100 ng/ml) die derzeit wichtigsten klinischen Parameter sind, um Hochrisikopatienten zu detektieren [139].

## **5.2 Die 16-Gen-Signatur als prognostischer Marker für das Hepatoblastom**

Wie bereits beschrieben, etablierte die Arbeitsgruppe um Stefano Cairo und Marie-Annick Buendia aus Paris die Signatur im Jahr 2008. Die 16-Gen-Signatur teilte ihre Tumorpräparate in zwei Gruppen, deren Histopathologie, Überlebensraten, Metastasenbildung und Stadium sich signifikant voneinander unterschieden. Auf die hier untersuchten Tumoren der Kinderchirurgischen Klinik der Universität München ist diese Signatur anwendbar. Während wir die Signatur und klinischen Parameter von 40 Hepatoblastom-Tumorpräparaten verwerteten, standen der Arbeitsgruppe aus Paris 102 Tumopräparate von insgesamt 85 Patienten zur Verfügung. Dreiviertel dieser Präparate wiesen eine  $\beta$ -Catenin Mutation auf, gleiches galt für unsere. Bei den klinischen Assoziationen zeigte Cairo signifikante Ergebnisse für das Überleben, die Histologie, Gefäßinvasionen und Metastasenbildung. Gleiche Ergebnisse wurden an unseren Präparaten gefunden. Zusätzlich korrelierte an unserem Kollektiv ein PRETEXT Stadium IV signifikant mit der C2-Subgruppe. Die Reproduzierbarkeit seiner Ergebnisse auf unser Tumorkollektiv verdeutlicht, wie aussagekräftig und übertragbar die 16-Gen-Signatur ist.

Vergleicht man die Expressionswerte der Tumoren aus unserem Kollektiv mit Normalleberpräparaten, zeigt sich eine Herunterregulation der C1-Gene in den

Tumoren, vor allem in den Tumoren der C2-Gruppe. Gegenteiliges findet bei den C2-Genen statt. Diese sind kaum in Normalleberpräparaten exprimiert, etwas mehr in den Tumoren der C1-Gruppe und deutlich stärker in den Tumoren der C2-Gruppe. Das Genprofil eines C1-Tumors unterscheidet sich im Allgemeinen kaum von dem eines Normalleberpräparats, nur die Höhe der Genexpressionen scheint hier zu differieren. Cairo wies an Mausmodellen nach, dass die C1-Tumoren dem Entwicklungsstand einer fetalen Leber entsprechen, indem er die Expression von etablierten Markern der fetalen Leber wie *IGF2* [140] und *DLK1* [141] in Hepatoblastom- und Normalleberpräparaten maß. Während die Normalleberpräparate diese Marker kaum exprimierten, exprimierten Hepatoblastome sie in einem gleichhohen Maße wie fetale Leberpräparate. Somit liegt es nahe, dass es sich bei den Tumoren der C1-Gruppe um Neoplasien handelt, die zu einem Zeitpunkt der fetalen Leberdifferenzierung entstehen.

Die C2-Tumoren sind in der Leberdifferenzierung noch früher anzutreffen. Ein Tumor der C2-Gruppe, also der Gruppe mit der schlechteren Prognose, exprimiert Gene, die in der gesunden Leber nur in geringem Maße anzutreffen sind und hepatischen Stamm- und Vorläuferzellen gleichkommen. Cairo geht davon aus, dass C2-Tumoren mit einem embryonalen Leberphänotyp assoziiert sind und daher kaum differenziertes Lebergewebe aufweisen, die C1-Gene also kaum exprimieren.

Auch in anderen embryonalen Tumoren wie dem Medulloblastom [142], einem Tumor des Kleinhirns, und dem Nephroblastom [143] sind Stammzellen für die Tumorprogression verantwortlich. Es ist länger bekannt, dass Tumorzellen aus den gleichen Zellen wie gesunde Zellen entstehen und sie sich, um zu proliferieren, die gleichen Signalwege und Reperaturmechanismen wie Stammzellen zu Nutze machen. Man spricht in diesem Zusammenhang deswegen von „Tumorstammzellen“ [144; 145]. Diese Theorie beschränkt sich aber keinesfalls auf embryonale Tumoren. Auch in epithelialen Tumoren, wie dem Mamma- und dem Prostatakarzinom, oder in hämatopoetischen Tumoren, wie Leukämien und Lymphomen, führt das Vorhandensein von Tumorstammzellen zu einem ungünstigeren Verlauf [146; 147]. Eine Microarray-Studie aus dem Jahr 2005 stellte eine 11-Gen-Signatur vor, die Tumoren unterschiedlichster Genese mit hoher Stammzellexpression detektierte und es zeigte sich eine Assoziation dieser Tumoren mit verstärkter Metastasierung und schlechterem Outcome gegenüber den Tumoren mit niedrigerer Expression [148] -

---

ähnlich den C2-Tumoren mit hoher Expression von Vorläuferzellen gegenüber den C1-Tumoren mit niedriger Expression, dafür aber besserem Outcome.

### **5.3 Anwendbarkeit der 16-Gen-Signatur auf HCCs und Zelllinien**

#### **5.3.1 Hepatozelluläre Karzinome weisen überwiegend ein C1-Profil auf**

Misst man die Expressionswerte der 16-Gene an HCCs, ergibt sich keine eindeutige Zuordnung der Tumoren zu einer der beiden Subgruppen. Es zeigte sich ein sehr heterogenes Bild mit vorwiegenden C1-Profilen. Das bedeutet nicht, dass es sich bei diesen Tumoren auch um niedrig-aggressive, gut differenzierte Tumoren wie bei den C1-Tumoren handelt. Im Gegenteil sind diese Tumoren hochaggressiv, infiltrieren frühzeitig in umliegende Gewebe und metastasieren schnell [17]. Dass die C1-Gene in diesen Tumoren exprimiert sind, liegt an der Tatsache, dass es sich um Marker handelt, die in jedem ausgereiften Leberpräparat zu finden sind. Das HCC entwickelt sich auf dem Boden eines ausgereiften, gut differenzierten Hepatozyten und entsteht im Vergleich zum HB erst deutlich später im Lebensalter, wenn die Leber bereits ausdifferenziert ist [44]. Diese Tumoren sind nicht embryonaler Genese, sondern meist Folge einer chronischen Entzündung [45]. Die 16-Gen-Signatur identifiziert diese Tumoren also fälschlicherweise als niedrigmaligne und kann daher nicht für diese verwendet werden.

Die Aggressivität von HCCs lässt sich vielmehr durch die Überexpression des *c-MYC*-Onkogenes [149], sowie dem Vorhandensein zahlreicher hepatischer Stamm- und Vorläuferzellen erklären [150; 151]. Als Biomarker ist das AFP im HCC von größter Bedeutung. Bisher konnte trotz zahlreicher Studien kein ähnlich prädiktiver Biomarker für HCCs identifiziert werden [152]. Er ist im Blut leicht messbar und liefert prognostische Aussagen über den Verlauf, das Anschlagen einer Therapie, sowie das Auftreten eines Rezidivs [153].

Auf molekularer Ebene ist keine vergleichbare Signatur, wie sie für das HB beschrieben ist, für das HCC bekannt. Die wichtigsten biochemischen Marker, denen neben dem AFP eine prognostische Relevanz eingeräumt wird, sind Vorläufermarker wie Cytokeratin 19 [154], Tumorsuppressor-Gene wie Glypican-3 [155] und Proteasen wie SCCA [156].

### 5.3.2 Zelllinien haben durchweg ein C2-Profil

Hepatoblastom- und HCC-Zelllinien zeigen in den hier durchgeführten Messungen durchweg ein C2-Profil. Für die Zelllinie HepT1 beispielsweise eine gelungene Zuordnung, da der Tumor als Hepatoblastom mit vorwiegend embryonaler Differenzierung beschrieben wird [157]. Für andere Zelllinien fehlen die klinischen Daten, um eine Überprüfung der Zuordnung vorzunehmen. Es ist aber aufgrund der Häufigkeitsverteilung der beiden Subgruppen anzunehmen, dass nicht alle den Zelllinien zugrundeliegenden Primärtumoren einem C2-Profil zugeordnet werden können. Außerdem folgen viele der von uns getesteten HCCs einem C1-Profil. Dass trotzdem alle HCC-Zelllinien der C2-Gruppe folgen, mag daran liegen, dass über die Jahre der Kultivierung in den Zelllinien wenig des differenzierten Lebergewebes übrig geblieben ist und sich Selektionsvorteile hinsichtlich proliferativer Zellpopulationen durchgesetzt haben [158].

### 5.4 Evaluation der 16-Gen-Signatur

Die Etablierung einer Gensignatur, die Hepatoblastome in zwei Gruppen unterschiedlicher Malignitätsgrade unterteilt, ist ein enormer Erfolg. Offen ist allerdings, ob und inwieweit künftig jedes HB-Tumorpräparat auf diese 16-Gene hin zu untersuchen ist, um damit prognostische Aussagen zu erlangen.

So erfordert das Messen der Expression von 16-Genen eine geraume Zeit. Es sind 16 PCR-Reaktionen durchzuführen, um zu einem Ergebnis zu gelangen. Zwar kann dieser Aufwand unter den Bedingungen einer spezialisierten und gut ausgestatteten Klinik geleistet werden, allerdings sind generell solche Biomarker zu bevorzugen, die nur ein einziges Gen oder einen einzigen Parameter messen [159].

Zudem erscheint die Auswahl der Gene der Signatur doch teilweise sehr zufällig. Während einige Gene Marker ausgereifter Hepatozyten darstellen, wie *ALDH2*, oder Marker hepatischer Vorläuferzellen, wie *AFP*, und damit einen klaren Bezug zu Leberzellen herstellen, scheinen beispielsweise die Gene *APCS*, *AQP9* und *HPD* keinen eindeutigen Bezug zur Leber aufzuweisen. Dazu kommt, dass das Gen *RPL10A* in jedem unserer Tumoren hohe Expressionswerte aufwies, unabhängig ob C1- oder C2-Tumor. Dieses Gen scheint zur Selektion der Tumoren daher nicht geeignet zu sein.

---

Cairo wählte die Signatur aus einem Pool zahlreicher Gene und entschied sich für jene, die insgesamt eine solide Grundlage für seine Ergebnisse lieferten. Wie gezeigt, vermag diese Auswahl nicht in allen Aspekten zu überzeugen. Gleichwohl funktioniert sie für das Hepatoblastom und es wurde damit ein bedeutender Fortschritt erreicht.

Jedoch lieferte für unser Tumorkollektiv auch eine reduzierte Signatur aus 6 Genen eine eindeutige Einteilung der Tumoren. Die Expression der Gene *ALDH2*, *CYP2E1*, *HPD*, *NLE*, *DLG7* und *AFP* war in den beiden Subgruppen C1 und C2 signifikant unterschiedlich, sie scheinen daher entscheidend für die Zugehörigkeit eines Tumors zur Subgruppe zu sein.

Man müsste in Studien weitere Tumorkollektive auf diese 6-Gen-Signatur hin untersuchen und überprüfen, ob sie auch für diese die richtige Einteilung liefert. Wäre das der Fall, könnte die hier angedeutete These, dass bereits 6 Gene zu einer Einteilung der Tumoren in die Subgruppen ausreichen, bestätigt werden. Das wiederum würde eine deutliche Verbesserung der Diagnosemöglichkeiten darstellen, nämlich nur 6 anstatt 16 Gene messen zu müssen.

### **5.5 *RASSF1A* liefert signifikante prognostische Aussagen für das Überleben**

Ist das Tumorsuppressorgen *RASSF1A* in einem Tumorpräparat hypermethyliert, korreliert dies hochsignifikant ( $p$ -Wert = 0,0005) mit dem Überleben des Patienten. Die Kaplan-Meier-Kurven zeigen eindrucksvoll, dass aus unserem Tumorkollektiv 7 der 8 verstorbenen Patienten *RASSF1A*-Methylierungen aufwiesen. Von den insgesamt 12 *RASSF1A*-positiven Patienten verstarben 7, also circa 60 % der Patienten. Das macht das Auftreten einer Methylierung von *RASSF1A* zu einem ungünstigen Prognosefaktor für Patienten mit Hepatoblastom, aber zu einem guten Biomarker für prognostische Aussagen hinsichtlich des Überlebens. Dies konnte bereits in vorangegangenen Studien belegt werden [22; 96]. Honda et al. beschrieben im Jahr 2008, dass in ihrem Tumorkollektiv aus 97 HB-Patienten signifikant häufiger Patienten verstarben, deren Tumoren die *RASSF1A* Methylierung aufwiesen.

Zählt man die Anzahl der signifikanten Korrelationen der *RASSF1A*-Methylierung mit klinischen Parametern aus unserem Tumorkollektiv, kommt man

neben der Korrelation mit dem Überleben zu Korrelationen des Stadiums und der Metastasenausbildung. Patienten mit einem *RASSF1A*-positiven Tumor befanden sich häufig unter den Hochrisikopatienten (p-Wert = 0,005) und denen, die Metastasen ausbildeten (p-Wert = 0,012). Im Vergleich dazu deckt die 16-Gen-Signatur mehr klinische Korrelationen ab. Die Einteilung der Tumoren zur C2-Gruppe ist nicht nur mit dem schlechteren Überleben dieser Patienten assoziiert (p-Wert = 0,002), sondern auch mit dem Auftreten eines embryonalen Phänotyps (p-Wert = 0,009), Hochrisikostadien (p-Wert = 0,021), der Infiltration in die Vena cava (p-Wert = 0,037) und Metastasenausbildung (p-Wert = 0,023). Dass die Histopathologie mit der 16-Gen-Signatur korreliert, kann durchaus ein interessanter Faktor sein. Untersucht man einen Teil des Tumors, beispielsweise durch eine Biopsie, kann man bereits anhand der Histopathologie Aussagen zu dem Verlauf der Tumorerkrankung treffen.

Ein großer Vorteil bei der Messung von *RASSF1A* ist, dass im Gegensatz zur 16-Gen-Signatur nur 1 Marker gemessen werden muss. Eine methylspezifische PCR (MSP) reicht aus, um den Methylierungsstatus des Tumorpräparates für *RASSF1A* zu bestimmen. Das kostet kaum Zeit und die Ergebnisse liegen schnell vor. Geht man davon aus, dass Methoden zirkulierende Tumorzellen aus dem Blut der Patienten zu extrahieren immer etablierter werden, wäre die Bestimmung eines einzelnen Markers aus der DNA der Zellen sehr elegant. Zirkulierende Tumorzellen (CTC = *circulating tumor cells*) sind vom Primärtumor ins Gefäßsystem ausgeschwemmte Zellen, die für die Metastasenausbildung des Tumors verantwortlich sind [160]. Sie sind identisch mit dem Primärtumor und sind im Vergleich zu einem Tumorbiopsat durch eine einfache Blutabnahme zu gewinnen [161]. Dies ist deutlich weniger invasiv und aufwendig. Für das metastasierte Mamma-Karzinom, kolorektale und Prostata-Karzinome hat sich die Messung dieser CTCs bereits etabliert, sie gelten als streng prognostische Faktoren für das Überleben [162-164].

Eine hypermethylierte Promoterregion von *RASSF1A* ist mittlerweile auch in anderen Tumoren mit einer schlechten Prognose assoziiert. Neben Brust-, Nieren- und Lungentumoren [165-167], etabliert sich *RASSF1A* auch als potenzieller Biomarker für das HCC [168]. Zhao et al. zeigen in einer groß-angelegten Metaanalyse, dass die Ergänzung der Diagnostik um die Messung des

---

Methylierungsstatus die Genauigkeit des AFPs erhöhen und Patienten mit HCC in einem früheren Stadium diagnostiziert werden könnten [169].

Während man Zeit und Mühen in der Messung von *RASSF1A* durch eine MSP sparen kann, ergeben sich in Bezug auf das HB durch eine Messung der 16-Gen-Signatur zusätzliche prognostische Aussagen für den Verlauf der Erkrankung. Da allerdings die Information, die *RASSF1A* liefert, den Patienten bereits ausreichend der Hochrisikogruppe zuordnet und von einem schlechteren Verlauf auszugehen ist, muss in der Praxis im Einzelfall entschieden werden, welche zusätzlichen Erkenntnisse sich durch die 16-Gen-Signatur gewinnen lassen und inwiefern diese notwendig sind - zumal *RASSF1A* als einzelnes Gen deutlich einfacher für therapeutische Ansätze zu verwenden ist.

### 5.6 Korrelation der Expression von *IGFBP3* und *SFRP1* mit dem klinischen Verlauf

Während sowohl die 16-Gen-Signatur als auch *RASSF1A* signifikant mit dem Überleben korrelieren, trifft dies auf drei weitere epigenetische Marker nicht zu. Eine Methylierung von *IGFBP3* ist jedoch mit dem höchsten PRETEXT-Stadium, Stadium 4 (p-Wert = 0,007), assoziiert. Dieses Stadium ist durch den Befall aller vier Leberquadranten gekennzeichnet. Auch Infiltrationen in die Vena cava (p-Wert = 0,007) und Metastasenresektionen (p-Wert = 0,035) treten bei *IGFBP3*-positiven Patienten häufiger auf. Die Expressionswerte von *IGFBP3* sind außerdem in Tumoren der C1-Gruppe signifikant höher als in denen der C2-Gruppe. Wie bereits beschrieben ist *IGFBP3* ein Negativregulator des IGF-Signalwegs. Wird er durch Methylierung inaktiv, ist das Tumorwachstum gefördert. Insgesamt schafft es *IGFBP3* zwar prognostisch ungünstige Tumoren zu detektieren, jedoch sind andere Biomarker, die Aussagen über das Überleben eines Patienten treffen, dem Gen vorzuziehen.

*IGFBP3* dient in einer Vielzahl anderer Tumoren bereits als etablierter Biomarker. So ist laut Wiley et al. bei Ovarialkarzinomen im Frühstadium eine Methylierung der Promotorregion von *IGFBP3* mit Tumorprogression und Tod assoziiert [170]. Auch in anderen Karzinomen, wie dem Magenkarzinom und dem kolorektalen Karzinom wird der Methylierungsstatus von *IGFBP3* bestimmt, da er mit schlechteren Prognosen und einem fulminanteren Verlauf einhergeht [171-173].

*SFRP1*, das für einen Modulator des Wnt-Signalwegs kodiert, ist als potenzieller Biomarker zu vernachlässigen. Klinisch korreliert eine Methylierung des *SFRP1*-Gens nur mit einem R1-Resektionsstatus des Patienten (p-Wert = 0,030). Diese Korrelation ist klinisch von geringer Bedeutung, da zwar eine R1-Resektion aufgrund einer unvollständigen Entfernung des Tumorgewebes generell mit dem vermehrten Auftreten von Rezidiven assoziiert ist, jedoch andere Parameter in Bezug auf prognostische Aussagen deutlich präziser sein können.

### 5.7 Weitere Biomarker des Hepatoblastoms

#### 5.7.1 Der Hedgehog-Signalweg beherbergt potenzielle Biomarker

Die Methylierung von *HHIP* lieferte, wie schon berichtet, keinerlei klinische Korrelationen. Dieser Marker eignet sich also nur für die Feststellung, dass der Hh-Signalweg pathologisch beeinflusst wurde, nicht aber für Prognostik über den klinischen Verlauf. Bei den Zielgenen des Signalwegs konnten dagegen Korrelationen gefunden werden. Die Expressionswerte von *PTCH* ( $p = 0,045$ ) und *FOXM1* ( $p < 0,0001$ ) sind in C2-Tumoren signifikant höher als in C1-Tumoren.

Betrachtet man *FOXM1*, ein humanes Protoonkogen, genauer, fällt auf, dass 6 der 8 verstorbenen Patienten hohe Expressionswerte aufwiesen. Für das HCC wurde in Studien bereits eine Assoziation zwischen dem Verlauf und *FOXM1* hergestellt, hohe Expressionswerte stehen hier mit dem Auftreten von Metastasen im Zusammenhang [174]. Die Unterdrückung von *FOXM1* durch gezielte Proteinkinaseinhibitoren ist derzeit Gegenstand therapeutischer Ansätze zur Verhinderung der Progression des HCCs [175] und es wäre natürlich interessant zu wissen, ob dies auch für das HB gilt. Daher sollte man die Expression von *FOXM1* an weiteren Hepatoblastomen messen und diesen potenziellen Biomarker auf jeden Fall weiteren Untersuchungen unterziehen.

Vergleicht man die Karzinogenese anderer embryonaler Tumoren mit dem des HBs, so spielt die Beeinflussung des Hh-Signalwegs oft eine Rolle [176]. Im Medulloblastom beispielsweise führt die Mutation von *PTCH1* zu einem Verlust der Tumorsuppressorfunktion des Gens und dadurch zu einer unkontrollierten Proliferation der Tumorzellen [177]. In Studien wird bereits die gezielte Inhibition des

---

Signalwegs durch Antagonisten getestet [178; 179]. Man sollte daher trotz weniger klinischer Korrelationen diese Biomarker nicht außer Acht lassen.

### 5.7.2 AFP – der wichtigste klinische Parameter für das Hepatoblastom

Dass erhöhte Alpha-Fetoprotein (AFP)-Level für ein tumoröses Geschehen der Leber sprechen, ist bekannt. Auch heute ist die Bestimmung dieses Tumormarkers einer der ersten diagnostischen Schritte bei einer unklaren Raumforderung in der Leber [30]. Abfallende Werte werden als Ansprechen auf eine Therapie interpretiert, ansteigende Werte sprechen für das Auftreten eines Progresses beziehungsweise eines Rezidivs [33]. Laut Van Tornout et al. kann die Höhe des Abfalles des Wertes nach erfolgter Therapie Aussagen darüber liefern, wie der weitere Verlauf der Erkrankung sein wird [180].

Als klinischer Parameter wird AFP nicht nur bei Verdacht auf Raumforderungen der Leber bestimmt. Auch bei der Risikostratifizierung von Keimzelltumoren, wie dem intrakraniellen Keimzelltumor, ist die Bestimmung von AFP zur Diagnose und Verlaufsbeurteilung etabliert [130; 181].

In Bezug auf das Hepatoblastom können, wie bereits beschrieben, weitere prognostische Aussagen mithilfe des AFPs getroffen werden - sind die Werte extrem erhöht oder erniedrigt spricht das für ein schlechteren Verlauf der Erkrankung. Für die erhöhten Werte kann das unser Patientenkollektiv nicht bestätigen, wohl aber für die erniedrigten. Beide Patienten mit sehr niedrigem AFP verstarben. Dies konnte auch in anderen Studien beobachtet werden: Nur einer von 4 Patienten mit niedrigem AFP der deutschen HB89 Studie konnte überleben [32]. Beide Patienten der amerikanischen *Children's Cancer Group* mit niedrigem AFP verstarben ebenfalls [180].

Bei Bestrebungen international anwendbare Risikomarker für das Hepatoblastom zu etablieren, gehört ein AFP-Wert unter 100 ng/ml dazu [182; 183]. In der bisherig größten Auswertung von klinischen Daten von HB-Patienten kommen Czauderna et al. zu dem Schluss, dass das Vorhandensein von Metastasen, ein hohes PRETEXT-Stadium und ein niedriges AFP (< 100 ng/ml) die derzeit wichtigsten klinischen Parameter sind, um Hochrisikopatienten zu detektieren [139].

Insgesamt ist das Bestimmen des AFP-Wertes zum Diagnosezeitpunkt nach wie vor unverzichtbar. Erstens um festzustellen, dass es sich um einen Tumor der Leber handelt, zweitens um einen Ausgangswert für einen Verlauf zu schaffen und drittens um die seltenen Fälle der besonders niedrigen AFP-Werte mit einer sehr schlechten Prognose herauszufiltern. Als alleiniger Prädiktor ist er jedoch nicht ausreichend. 34 unserer 40 HB-Patienten hätten alleine dem AFP-Wert nach zu urteilen eine gute Prognose haben müssen. Davon sind 5 verstorben. Das PRETEXT Stadium ist da deutlich zuverlässiger. 7 der 8 verstorbenen Patienten hatten ein PRETEXT Stadium 4. Es ist also durchaus vorstellbar, dass eine Kombination aus AFP, PRETEXT und weiteren klinischen Parametern ausreichend für eine zuverlässige Prognose ist.

### 5.8 Identifikation neuer Marker durch Exome Sequencing

Das Screening eines Genoms auf krankheitsbezogene Mutationen ist zurzeit Gegenstand zahlreicher Forschungsprojekte. Wie dargestellt zeigen zwei Drittel aller Hepatoblastome eine Mutation im  $\beta$ -Catenin Gen [20]. Ansonsten gibt es für das HB noch keine eindeutige genetische Komponente, die das Entstehen des Tumors erklärt.

Um die genetische Ursache des HB besser zu verstehen, führten Eichenmüller et al. ein sogenanntes Whole Exome Sequencing an 18 HBs und den dazugehörigen Normalleberpräparaten durch. Es zeigte sich, dass Hepatoblastome im Allgemeinen Tumoren mit einer sehr niedrigen Mutationsrate sind (durchschnittlich 3 Mutationen pro Tumor) [184]. Man geht davon aus, dass die Anzahl an durchgeführten Zellreplikationszyklen die Mutationsrate erhöht, weshalb Tumoren älterer Patienten mehr Mutationen aufweisen, als die jüngerer Patienten [185; 186].

Insgesamt gilt für das Hepatoblastom, wie für viele andere kindliche Tumoren auch, dass es im Gegensatz zu Tumoren des Erwachsenenalters kaum genetische Veränderungen gibt [187; 188].

Einzelne entdeckte Mutationen durch das Exome Sequencing liefern Korrelationen mit klinischen Parametern. Die Überexpression von *NQO1* beispielsweise ist mit einer Gefäßinvasion und dem Auftreten von Metastasen assoziiert [184]. Vergleicht man diese Ergebnisse mit den Korrelationen, die die 16-

Gen-Signatur oder *RASSF1A* liefern können, sind sie deutlich weniger aussagekräftig und von niedrigerer prognostischer Relevanz. Daher ist es nach wie vor wichtig, neben genetischen Mutationen andere Marker, wie die 16-Gen-Signatur (oder eine reduzierte 6-Gen-Signatur), *RASSF1A* oder bislang unbekannte Marker zu etablieren und für die Tumorprognostik zu verwenden.

## 6 Zusammenfassung

Die beiden häufigsten Neoplasien der Leber im Kindesalter sind das Hepatoblastom und das hepatozelluläre Karzinom (HCC). Trotz Fortschritten hinsichtlich Therapie und Prognose gilt es die Kinder zu identifizieren, deren Tumoren aufgrund eines aggressiven Wachstums und einer frühen Metastasierung mit einem schlechteren Überleben einhergehen. Um diese Patienten frühzeitig zu detektieren, braucht es Biomarker, die prognostisch wertvolle Aussagen über den Verlauf der Erkrankung liefern und möglichst flächendeckend eingesetzt werden können. Während es für das HCC bereits einen etablierten Biomarker, das AFP, gibt, steht die flächendeckende Etablierung eines zuverlässigen Biomarkers für das Hepatoblastom noch aus. Einen Ansatz sollte die 16-Gen-Signatur der Pariser Arbeitsgruppe um Stefano Cairo bieten: anhand der Expression von 16 Genen sollte man Hepatoblastome in zwei Subgruppen unterteilen können, die sich bezogen auf die Histopathologie und den klinischen Verlauf signifikant unterscheiden.

Diese Arbeit untersuchte daraufhin Primärgewebe von 40 Hepatoblastom-, 9 HCC- und 2 Normalleberpräparaten auf die Expression dieser 16 Gene mittels quantitativer *real-time* PCR und stellte die Ergebnisse in Zusammenhang mit dem klinischen Verlauf der Patienten. Zusätzlich wurden Ergebnisse vorangegangener Arbeiten, z.B. der Methylierungsstatus des Tumorsuppressorgens *RASSF1A*, auf ihre Anwendbarkeit als Biomarker in Bezug auf den klinischen Verlauf hin untersucht und mit der 16-Gen-Signatur verglichen.

Es zeigte sich, dass die 16-Gen-Signatur für unser Tumorkollektiv von 40 Hepatoblastomen verwendet werden kann: die Einteilung in C1- und C2-Tumore erlaubt signifikante Prognosen bezüglich des Überlebens und weiterer klinischer Parameter und stellt somit einen zuverlässigen Biomarker zur Einschätzung des klinischen Verlaufs dar. Doch auch die Methylierung des Gens *RASSF1A* eignete sich als Biomarker - die Aussagen hinsichtlich des Überlebens waren in unserem Tumorkollektiv äußerst präzise. Zudem identifizierten wir eine 6-Gen-Signatur, deren Einsatz in der Klinik gegenüber einer 16-Gen-Signatur von Vorteil sein könnte.

Es bedarf in Zukunft weiterer Studien, die diese Biomarker flächendeckend anwenden, um sie in der Klinik zu etablieren. Bis dahin wird eine Kombination aus klinischen Parametern mit einzelnen molekularen Markern die Diagnostik dominieren.

## 7 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

<b>Abbildung 1-1</b> Das PRETEXT-Staging der SIOPEL Gruppe aus dem Jahre 1990.	12
<b>Abbildung 1-2</b> Der kanonische Wnt-Signalweg.....	17
<b>Abbildung 1-3</b> Schematische Darstellung der Hedgehog-Signalkaskade.....	18
<b>Abbildung 1-4</b> Der IGF2-Signalweg .....	20
<b>Abbildung 1-5</b> Erklärungsmodell zur Entstehung des Hepatoblastoms und seinen zwei Untergruppen mit Auflistung der Charaktereigenschaften der beiden Subklassen C1 und C2.....	23
<b>Tabelle 1</b> Verwendete eukaryontische Zelllinien mit Bezeichnung, Ursprung, Bezug und Kultivierungsmedium. ....	30
<b>Tabelle 2</b> Verwendete Primer-Sequenzen. ....	32
<b>Abbildung 4-1</b> Genprofil eines „klassischen“ C1-Tumors (hier Tumor T690).....	42
<b>Abbildung 4-2</b> Genprofil eines "klassischen" C2-Tumors (hier Tumor T145) .....	43
<b>Abbildung 4-3</b> Clusteranalyse der 40 Hepatoblastome mit Unterteilung der Tumore in die C1- und C2-Untergruppen .....	44
<b>Abbildung 4-4</b> Genprofil eines Normalleberpräparates (hier N253).....	45
<b>Abbildung 4-5</b> Die Grafik zeigt die Mittelwerte mit Standardabweichung der Expression der C1-Gene in allen Tumoren und Normalleberpräparaten (n=2)..	47
<b>Abbildung 4-6</b> Die Grafik zeigt die Mittelwerte mit Standardabweichung der Expression der C2-Gene in allen Tumoren und Normalleberpräparaten (n=2)..	48
<b>Abbildung 4-7</b> Genprofil eines HCCs (hier Tumor T146) mit hauptsächlich hoch-exprimierten C1-Genen. ....	49
<b>Abbildung 4-8</b> Genprofil eines HCCs (hier Tumor T444) mit niedrig-exprimierten C1- und teilweise hoch-exprimierten C2-Genen. ....	50
<b>Abbildung 4-9</b> Beispiel einer hauptsächlich C2-Gene exprimierenden Lebertumor-Zelllinie (hier HUH7) .....	50

<b>Abbildung 4-10</b> Clusteranalyse der humanen Lebertumor-Zelllinien und Normalleberpräparaten.....	51
<b>Abbildung 4-11</b> Die 16-Gen-Signatur in Zusammenhang mit dem Überleben.....	52
<b>Tabelle 3</b> Klinische Daten von 40 Hepatoblastom-Patienten in Korrelation mit der 16-Gen-Signatur. ....	54
<b>Tabelle 4</b> Korrelation epigenetischer Marker mit der 16-Gen-Signatur.....	55
<b>Abbildung 4-12</b> Signifikante Korrelationen klinischer Parameter mit der 16-Gen-Signatur .....	56
<b>Abbildung 4-13</b> Gene aus anderen Signalwegen, deren Expressionen sich signifikant zwischen den C1/C2-Subgruppen unterscheiden. ....	57
<b>Tabelle 5</b> Klinische Daten von 40 HB-Patienten in Korrelation mit der Expression von <i>FOXM1</i> , <i>PTCH1</i> und <i>TIA1</i> .....	58
<b>Abbildung 4-14</b> Der Biomarker <i>RASSF1A</i> in Zusammenhang mit dem Überleben. ....	59
<b>Tabelle 6</b> Klinische Daten von 37 HB-Patienten in Korrelation mit ihrem <i>RASSF1A</i> -Methylierungsstatus.....	60
<b>Abbildung 4-15</b> Zusammenfassung aller signifikanten Korrelationen von <i>RASSF1A</i> mit klinischen Parametern. ....	61
<b>Tabelle 7</b> Klinische Daten von 37 HB-Patienten in Korrelation mit ihrem <i>IGFBP3</i> -Methylierungsstatus.....	62
<b>Abbildung 4-16</b> Zusammenfassung aller signifikanten Korrelationen von <i>IGFBP3</i> mit klinischen Parametern. ....	63
<b>Tabelle 8</b> Klinische Daten von 36 HB-Patienten in Korrelation mit ihrem <i>SFRP1</i> -Methylierungsstatus.....	64
<b>Abbildung 4-17</b> Zusammenfassung aller signifikanten Korrelationen von <i>SFRP1</i> mit klinischen Parametern. ....	65
<b>Abbildung 4-18</b> Einteilung der Tumoren (n=40) mit einer 6-Gen-Signatur.....	66
<b>Tabelle 9</b> Veränderung der Zuordnung durch weitere Reduktion der 6-Gen-Signatur .....	67

---

## 8 Literaturverzeichnis

1. Weinberg AG, Finegold MJ. 1983. Primary hepatic tumors of childhood. *Hum Pathol* 14:512-37
2. Ross MT, Grafham DV, Coffey AJ, Scherer S, McLay K, et al. 2005. The DNA sequence of the human X chromosome. *Nature* 434:325-37
3. <http://www.cancerindex.org/ccw>
4. Buckley JD, Sather H, Ruccione K, Rogers PC, Haas JE, et al. 1989. A case-control study of risk factors for hepatoblastoma. A report from the Childrens Cancer Study Group. *Cancer* 64:1169-76
5. Kingston JE, Herbert A, Draper GJ, Mann JR. 1983. Association between hepatoblastoma and polyposis coli. *Arch Dis Child* 58:959-62
6. Weksberg R, Shuman C, Caluseriu O, Smith AC, Fei YL, et al. 2002. Discordant KCNQ1OT1 imprinting in sets of monozygotic twins discordant for Beckwith-Wiedemann syndrome. *Hum Mol Genet* 11:1317-25
7. Tanimura M, Matsui I, Abe J, Ikeda H, Kobayashi N, et al. 1998. Increased risk of hepatoblastoma among immature children with a lower birth weight. *Cancer Res* 58:3032-5
8. Ross JA, Gurney JG. 1998. Hepatoblastoma incidence in the United States from 1973 to 1992. *Med Pediatr Oncol* 30:141-2
9. Ruck P, Xiao JC, Pietsch T, Von Schweinitz D, Kaiserling E. 1997. Hepatic stem-like cells in hepatoblastoma: expression of cytokeratin 7, albumin and oval cell associated antigens detected by OV-1 and OV-6. *Histopathology* 31:324-9
10. Zimmermann A. 2002. Hepatoblastoma with cholangioblastic features ('cholangioblastic hepatoblastoma') and other liver tumors with bimodal differentiation in young patients. *Med Pediatr Oncol* 39:487-91
11. von Schweinitz D, Schmidt D, Fuchs J, Welte K, Pietsch T. 1995. Extramedullary hematopoiesis and intratumoral production of cytokines in childhood hepatoblastoma. *Pediatr Res* 38:555-63
12. Zimmermann A. 2005. The emerging family of hepatoblastoma tumours: from ontogenesis to oncogenesis. *Eur J Cancer* 41:1503-14
13. Haas JE, Feusner JH, Finegold MJ. 2001. Small cell undifferentiated histology in hepatoblastoma may be unfavorable. *Cancer* 92:3130-4
14. Tomlinson GE. Cytogenetics of hepatoblastoma. *Front Biosci (Elite Ed)* 4:1287-92
15. Harris MB, Shuster JJ, Carroll A, Look AT, Borowitz MJ, et al. 1992. Trisomy of leukemic cell chromosomes 4 and 10 identifies children with B-progenitor cell acute lymphoblastic leukemia with a very low risk of treatment failure: a Pediatric Oncology Group study. *Blood* 79:3316-24

16. Steenman M, Westerveld A, Mannens M. 2000. Genetics of Beckwith-Wiedemann syndrome-associated tumors: common genetic pathways. *Genes Chromosomes Cancer* 28:1-13
17. Czauderna P, Mackinlay G, Perilongo G, Brown J, Shafford E, et al. 2002. Hepatocellular carcinoma in children: results of the first prospective study of the International Society of Pediatric Oncology group. *J Clin Oncol* 20:2798-804
18. Oda H, Imai Y, Nakatsuru Y, Hata J, Ishikawa T. 1996. Somatic mutations of the APC gene in sporadic hepatoblastomas. *Cancer Res* 56:3320-3
19. Aretz S, Koch A, Uhlhaas S, Friedl W, Propping P, et al. 2006. Should children at risk for familial adenomatous polyposis be screened for hepatoblastoma and children with apparently sporadic hepatoblastoma be screened for APC germline mutations? *Pediatr Blood Cancer* 47:811-8
20. Koch A, Denkhau D, Albrecht S, Leuschner I, von Schweinitz D, Pietsch T. 1999. Childhood hepatoblastomas frequently carry a mutated degradation targeting box of the beta-catenin gene. *Cancer Res* 59:269-73
21. Honda S, Miyagi H, Suzuki H, Minato M, Haruta M, et al. 2013. RASSF1A methylation indicates a poor prognosis in hepatoblastoma patients. *Pediatr Surg Int* 29:1147-52
22. Honda S, Haruta M, Sugawara W, Sasaki F, Ohira M, et al. 2008. The methylation status of RASSF1A promoter predicts responsiveness to chemotherapy and eventual cure in hepatoblastoma patients. *Int J Cancer* 123:1117-25
23. Exelby PR, Filler RM, Grosfeld JL. 1975. Liver tumors in children in the particular reference to hepatoblastoma and hepatocellular carcinoma: American Academy of Pediatrics Surgical Section Survey--1974. *J Pediatr Surg* 10:329-37
24. Perilongo G, Brown J, Shafford E, Brock P, De Camargo B, et al. 2000. Hepatoblastoma presenting with lung metastases: treatment results of the first cooperative, prospective study of the International Society of Paediatric Oncology on childhood liver tumors. *Cancer* 89:1845-53
25. Miyagi J, Kobayashi S, Kojo N, Watanabe M, Kuramoto S, Hirose F. 1984. Brain metastasis of hepatoblastoma--a case report and review of literature. *No Shinkei Geka* 12:753-8
26. Endo EG, Walton DS, Albert DM. 1996. Neonatal hepatoblastoma metastatic to the choroid and iris. *Arch Ophthalmol* 114:757-61
27. Hartley AL, Birch JM, Kelsey AM, Jones PH, Harris M, Blair V. 1990. Epidemiological and familial aspects of hepatoblastoma. *Med Pediatr Oncol* 18:103-9
28. Perilongo G, Shafford EA. 1999. Liver tumours. *Eur J Cancer* 35:953-8; discussion 8-9
29. Blohm ME, Vesterling-Horner D, Calaminus G, Gobel U. 1998. Alpha 1-fetoprotein (AFP) reference values in infants up to 2 years of age. *Pediatr Hematol Oncol* 15:135-42

30. von Schweinitz D, Hecker H, Schmidt-von-Arndt G, Harms D. 1997. Prognostic factors and staging systems in childhood hepatoblastoma. *Int J Cancer* 74:593-9
31. De Ioris M, Brugieres L, Zimmermann A, Keeling J, Brock P, et al. 2008. Hepatoblastoma with a low serum alpha-fetoprotein level at diagnosis: the SIOPEL group experience. *Eur J Cancer* 44:545-50
32. von Schweinitz D, Hecker H, Harms D, Bode U, Weinel P, et al. 1995. Complete resection before development of drug resistance is essential for survival from advanced hepatoblastoma--a report from the German Cooperative Pediatric Liver Tumor Study HB-89. *J Pediatr Surg* 30:845-52
33. Koh KN, Park M, Kim BE, Bae KW, Kim KM, et al. 2011. Prognostic implications of serum alpha-fetoprotein response during treatment of hepatoblastoma. *Pediatr Blood Cancer* 57:554-60
34. Brown J, Perilongo G, Shafford E, Keeling J, Pritchard J, et al. 2000. Pretreatment prognostic factors for children with hepatoblastoma-- results from the International Society of Paediatric Oncology (SIOP) study SIOPEL 1. *Eur J Cancer* 36:1418-25
35. Schnater JM, Kohler SE, Lamers WH, von Schweinitz D, Aronson DC. 2003. Where do we stand with hepatoblastoma? A review. *Cancer* 98:668-78
36. Douglass EC, Reynolds M, Finegold M, Cantor AB, Glicksman A. 1993. Cisplatin, vincristine, and fluorouracil therapy for hepatoblastoma: a Pediatric Oncology Group study. *J Clin Oncol* 11:96-9
37. Meyers RL, Rowland JR, Krailo M, Chen Z, Katzenstein HM, Malogolowkin MH. 2009. Predictive power of pretreatment prognostic factors in children with hepatoblastoma: a report from the Children's Oncology Group. *Pediatr Blood Cancer* 53:1016-22
38. Schnater JM, Aronson DC, Plaschkes J, Perilongo G, Brown J, et al. 2002. Surgical view of the treatment of patients with hepatoblastoma: results from the first prospective trial of the International Society of Pediatric Oncology Liver Tumor Study Group. *Cancer* 94:1111-20
39. Pritchard J, Brown J, Shafford E, Perilongo G, Brock P, et al. 2000. Cisplatin, doxorubicin, and delayed surgery for childhood hepatoblastoma: a successful approach--results of the first prospective study of the International Society of Pediatric Oncology. *J Clin Oncol* 18:3819-28
40. Evans AE, Land VJ, Newton WA, Randolph JG, Sather HN, Tefft M. 1982. Combination chemotherapy (vincristine, adriamycin, cyclophosphamide, and 5-fluorouracil) in the treatment of children with malignant hepatoma. *Cancer* 50:821-6
41. Douglass EC, Green AA, Wrenn E, Champion J, Shipp M, Pratt CB. 1985. Effective cisplatin (DDP) based chemotherapy in the treatment of hepatoblastoma. *Med Pediatr Oncol* 13:187-90
42. von Schweinitz D, Byrd DJ, Hecker H, Weinel P, Bode U, et al. 1997. Efficiency and toxicity of ifosfamide, cisplatin and doxorubicin in the treatment of childhood hepatoblastoma. Study Committee of the Cooperative Paediatric

- Liver Tumour Study HB89 of the German Society for Paediatric Oncology and Haematology. *Eur J Cancer* 33:1243-9
43. Bruix J, Sherman M. 2011. Management of hepatocellular carcinoma: an update. *Hepatology* 53:1020-2
44. Litten JB, Tomlinson GE. 2008. Liver tumors in children. *Oncologist* 13:812-20
45. Chen JC, Chang ML, Lin JN, Lai HS, Chen CC, et al. 2005. Comparison of childhood hepatic malignancies in a hepatitis B hyper-endemic area. *World J Gastroenterol* 11:5289-94
46. Giacomantonio M, Ein SH, Mancier K, Stephens CA. 1984. Thirty years of experience with pediatric primary malignant liver tumors. *J Pediatr Surg* 19:523-6
47. Moore SW, Hesseling PB, Wessels G, Schneider JW. 1997. Hepatocellular carcinoma in children. *Pediatr Surg Int* 12:266-70
48. von Schweinitz D. 2006. Management of liver tumors in childhood. *Semin Pediatr Surg* 15:17-24
49. Yoo HY, Patt CH, Geschwind JF, Thuluvath PJ. 2003. The outcome of liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma in the United States between 1988 and 2001: 5-year survival has improved significantly with time. *J Clin Oncol* 21:4329-35
50. Biomarkers Definitions Working G. 2001. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther* 69:89-95
51. Brower V. 2011. Biomarkers: Portents of malignancy. *Nature* 471:S19-21
52. Mathsson L, Mullazehi M, Wick MC, Sjoberg O, van Vollenhoven R, et al. 2008. Antibodies against citrullinated vimentin in rheumatoid arthritis: higher sensitivity and extended prognostic value concerning future radiographic progression as compared with antibodies against cyclic citrullinated peptides. *Arthritis Rheum* 58:36-45
53. Szodoray P, Szabo Z, Kapitany A, Gyetvai A, Lakos G, et al. 2010. Anti-citrullinated protein/peptide autoantibodies in association with genetic and environmental factors as indicators of disease outcome in rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev* 9:140-3
54. Lievre A, Bachet JB, Le Corre D, Boige V, Landi B, et al. 2006. KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res* 66:3992-5
55. Van Cutsem E, Kohne CH, Hitre E, Zaluski J, Chang Chien CR, et al. 2009. Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 360:1408-17
56. Monga SP. 2011. Role of Wnt/beta-catenin signaling in liver metabolism and cancer. *Int J Biochem Cell Biol* 43:1021-9
57. de La Coste A, Romagnolo B, Billuart P, Renard CA, Buendia MA, et al. 1998. Somatic mutations of the beta-catenin gene are frequent in mouse and human hepatocellular carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:8847-51

58. Taniguchi K, Roberts LR, Aderca IN, Dong X, Qian C, et al. 2002. Mutational spectrum of beta-catenin, AXIN1, and AXIN2 in hepatocellular carcinomas and hepatoblastomas. *Oncogene* 21:4863-71
59. Koch A, Weber N, Waha A, Hartmann W, Denkhaus D, et al. 2004. Mutations and elevated transcriptional activity of conductin (AXIN2) in hepatoblastomas. *J Pathol* 204:546-54
60. Peifer M, Polakis P. 2000. Wnt signaling in oncogenesis and embryogenesis--a look outside the nucleus. *Science* 287:1606-9
61. Cadigan KM, Peifer M. 2009. Wnt signaling from development to disease: insights from model systems. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1:a002881
62. Nesbit CE, Tersak JM, Prochownik EV. 1999. MYC oncogenes and human neoplastic disease. *Oncogene* 18:3004-16
63. Zhao C, Chen A, Jamieson CH, Fereshteh M, Abrahamsson A, et al. 2009. Hedgehog signalling is essential for maintenance of cancer stem cells in myeloid leukaemia. *Nature* 458:776-9
64. Mohler J. 1988. Requirements for hedgehog, a segmental polarity gene, in patterning larval and adult cuticle of *Drosophila*. *Genetics* 120:1061-72
65. Oue T, Yoneda A, Uehara S, Yamanaka H, Fukuzawa M. 2010. Increased expression of the hedgehog signaling pathway in pediatric solid malignancies. *J Pediatr Surg* 45:387-92
66. Deutsch G, Jung J, Zheng M, Lora J, Zaret KS. 2001. A bipotential precursor population for pancreas and liver within the embryonic endoderm. *Development* 128:871-81
67. Sicklick JK, Li YX, Choi SS, Qi Y, Chen W, et al. 2005. Role for hedgehog signaling in hepatic stellate cell activation and viability. *Lab Invest* 85:1368-80
68. Sicklick JK, Li YX, Melhem A, Schmelzer E, Zdanowicz M, et al. 2006. Hedgehog signaling maintains resident hepatic progenitors throughout life. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 290:G859-70
69. Omenetti A, Yang L, Li YX, McCall SJ, Jung Y, et al. 2007. Hedgehog-mediated mesenchymal-epithelial interactions modulate hepatic response to bile duct ligation. *Lab Invest* 87:499-514
70. Marigo V, Davey RA, Zuo Y, Cunningham JM, Tabin CJ. 1996. Biochemical evidence that patched is the Hedgehog receptor. *Nature* 384:176-9
71. Lum L, Beachy PA. 2004. The Hedgehog response network: sensors, switches, and routers. *Science* 304:1755-9
72. Hahn H, Wojnowski L, Specht K, Kappler R, Calzada-Wack J, et al. 2000. Patched target Igf2 is indispensable for the formation of medulloblastoma and rhabdomyosarcoma. *J Biol Chem* 275:28341-4
73. Madison BB, McKenna LB, Dolson D, Epstein DJ, Kaestner KH. 2009. FoxF1 and FoxL1 Link Hedgehog Signaling and the Control of Epithelial Proliferation in the Developing Stomach and Intestine. *J Biol Chem* 284:5936-44

74. Hahn H, Wojnowski L, Miller G, Zimmer A. 1999. The patched signaling pathway in tumorigenesis and development: lessons from animal models. *J Mol Med* 77:459-68
75. Eichenmuller M, Gruner I, Hagl B, Haberle B, Muller-Hocker J, et al. 2009. Blocking the hedgehog pathway inhibits hepatoblastoma growth. *Hepatology* 49:482-90
76. Teh MT, Wong ST, Neill GW, Ghali LR, Philpott MP, Quinn AG. 2002. FOXM1 is a downstream target of Gli1 in basal cell carcinomas. *Cancer Res* 62:4773-80
77. Kalinichenko VV, Major ML, Wang X, Petrovic V, Kuechle J, et al. 2004. Foxm1b transcription factor is essential for development of hepatocellular carcinomas and is negatively regulated by the p19ARF tumor suppressor. *Genes Dev* 18:830-50
78. Myatt SS, Lam EW. 2007. The emerging roles of forkhead box (Fox) proteins in cancer. *Nat Rev Cancer* 7:847-59
79. Kappler R, von Schweinitz D. 2012. A better way forward: targeting hedgehog signaling in liver cancer. *Front Biosci (Schol Ed)* 4:277-86
80. Kaku K, Osada H, Seki K, Sekiya S. 2007. Insulin-like growth factor 2 (IGF2) and IGF2 receptor gene variants are associated with fetal growth. *Acta Paediatr* 96:363-7
81. Hoppener JW, de Pagter-Holthuizen P, Geurts van Kessel AH, Jansen M, Kittur SD, et al. 1985. The human gene encoding insulin-like growth factor I is located on chromosome 12. *Hum Genet* 69:157-60
82. Pollak MN, Schernhammer ES, Hankinson SE. 2004. Insulin-like growth factors and neoplasia. *Nat Rev Cancer* 4:505-18
83. Scotting PJ, Walker DA, Perilongo G. 2005. Childhood solid tumours: a developmental disorder. *Nat Rev Cancer* 5:481-8
84. Hartmann W, Waha A, Koch A, Goodyer CG, Albrecht S, et al. 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* 157:1393-403
85. Li X, Adam G, Cui H, Sandstedt B, Ohlsson R, Ekstrom TJ. 1995. Expression, promoter usage and parental imprinting status of insulin-like growth factor II (IGF2) in human hepatoblastoma: uncoupling of IGF2 and H19 imprinting. *Oncogene* 11:221-9
86. Gennigens C, Menetrier-Caux C, Droz JP. 2006. Insulin-Like Growth Factor (IGF) family and prostate cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 58:124-45
87. Baxter RC. 2014. IGF binding proteins in cancer: mechanistic and clinical insights. *Nat Rev Cancer* 14:329-41
88. Regel I, Eichenmuller M, Joppien S, Liebl J, Haberle B, et al. 2012. IGFBP3 impedes aggressive growth of pediatric liver cancer and is epigenetically silenced in vascular invasive and metastatic tumors. *Mol Cancer* 11:9

- 
89. Izquierdo JM, Majos N, Bonnal S, Martinez C, Castelo R, et al. 2005. Regulation of Fas alternative splicing by antagonistic effects of TIA-1 and PTB on exon definition. *Mol Cell* 19:475-84
  90. Baylin SB, Ohm JE. 2006. Epigenetic gene silencing in cancer - a mechanism for early oncogenic pathway addiction? *Nat Rev Cancer* 6:107-16
  91. Reik W. 2007. Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. *Nature* 447:425-32
  92. Shih YL, Hsieh CB, Lai HC, Yan MD, Hsieh TY, et al. 2007. SFRP1 suppressed hepatoma cells growth through Wnt canonical signaling pathway. *Int J Cancer* 121:1028-35
  93. Pfeifer GP, Yoon JH, Liu L, Tommasi S, Wilczynski SP, Dammann R. 2002. Methylation of the RASSF1A gene in human cancers. *Biol Chem* 383:907-14
  94. Astuti D, Agathangelou A, Honorio S, Dallol A, Martinsson T, et al. 2001. RASSF1A promoter region CpG island hypermethylation in pheochromocytomas and neuroblastoma tumours. *Oncogene* 20:7573-7
  95. Harada K, Toyooka S, Maitra A, Maruyama R, Toyooka KO, et al. 2002. Aberrant promoter methylation and silencing of the RASSF1A gene in pediatric tumors and cell lines. *Oncogene* 21:4345-9
  96. Sugawara W, Haruta M, Sasaki F, Watanabe N, Tsunematsu Y, et al. 2007. Promoter hypermethylation of the RASSF1A gene predicts the poor outcome of patients with hepatoblastoma. *Pediatr Blood Cancer* 49:240-9
  97. Cairo S, Armengol C, De Reynies A, Wei Y, Thomas E, et al. 2008. Hepatic stem-like phenotype and interplay of Wnt/beta-catenin and Myc signaling in aggressive childhood liver cancer. *Cancer Cell* 14:471-84
  98. Boyault S, Rickman DS, de Reynies A, Balabaud C, Rebouissou S, et al. 2007. Transcriptome classification of HCC is related to gene alterations and to new therapeutic targets. *Hepatology* 45:42-52
  99. Stahl S, Ittrich C, Marx-Stoelting P, Kohle C, Altug-Teber O, et al. 2005. Genotype-phenotype relationships in hepatocellular tumors from mice and man. *Hepatology* 42:353-61
  100. Stofega MR, Herrington J, Billestrup N, Carter-Su C. 2000. Mutation of the SHP-2 binding site in growth hormone (GH) receptor prolongs GH-promoted tyrosyl phosphorylation of GH receptor, JAK2, and STAT5B. *Mol Endocrinol* 14:1338-50
  101. Gonzalez L, Curto LM, Miquet JG, Bartke A, Turyn D, Sotelo AI. 2007. Differential regulation of membrane associated-growth hormone binding protein (MA-GHBP) and growth hormone receptor (GHR) expression by growth hormone (GH) in mouse liver. *Growth Horm IGF Res* 17:104-12
  102. Juul A, Jorgensen JO, Christiansen JS, Muller J, Skakkeboek NE. 1995. Metabolic effects of GH: a rationale for continued GH treatment of GH-deficient adults after cessation of linear growth. *Horm Res* 44 Suppl 3:64-72
  103. Emsley J, White HE, O'Hara BP, Oliva G, Srinivasan N, et al. 1994. Structure of pentameric human serum amyloid P component. *Nature* 367:338-45

104. Yoshida A. 1992. Molecular genetics of human aldehyde dehydrogenase. *Pharmacogenetics* 2:139-47
105. Matsuo K, Oze I, Hosono S, Ito H, Watanabe M, et al. 2013. The aldehyde dehydrogenase 2 (ALDH2) Glu504Lys polymorphism interacts with alcohol drinking in the risk of stomach cancer. *Carcinogenesis* 34:1510-5
106. Thielens NM, Enrie K, Lacroix M, Jaquinod M, Hernandez JF, et al. 1999. The N-terminal CUB-epidermal growth factor module pair of human complement protease C1r binds Ca<sup>2+</sup> with high affinity and mediates Ca<sup>2+</sup>-dependent interaction with C1s. *J Biol Chem* 274:9149-59
107. Kallel-Sellami M, Laadhar L, Zerzeri Y, Makni S. 2008. Complement deficiency and systemic lupus erythematosus: consensus and dilemma. *Expert Rev Clin Immunol* 4:629-37
108. Tsukaguchi H, Weremowicz S, Morton CC, Hediger MA. 1999. Functional and molecular characterization of the human neutral solute channel aquaporin-9. *Am J Physiol* 277:F685-96
109. Kolble K. 1993. Regional mapping of short tandem repeats on human chromosome 10: cytochrome P450 gene CYP2E, D10S196, D10S220, and D10S225. *Genomics* 18:702-4
110. Hayashi S, Watanabe J, Kawajiri K. 1991. Genetic polymorphisms in the 5'-flanking region change transcriptional regulation of the human cytochrome P450IIE1 gene. *J Biochem* 110:559-65
111. Abdelmegeed MA, Banerjee A, Jang S, Yoo SH, Yun JW, et al. 2013. CYP2E1 potentiates binge alcohol-induced gut leakiness, steatohepatitis, and apoptosis. *Free Radic Biol Med* 65C:1238-45
112. Allan CM, Walker D, Segrest JP, Taylor JM. 1995. Identification and characterization of a new human gene (APOC4) in the apolipoprotein E, C-I, and C-II gene locus. *Genomics* 28:291-300
113. Serre L, Sailland A, Sy D, Boudec P, Rolland A, et al. 1999. Crystal structure of *Pseudomonas fluorescens* 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase: an enzyme involved in the tyrosine degradation pathway. *Structure* 7:977-88
114. Tomoeda K, Awata H, Matsuura T, Matsuda I, Ploechl E, et al. 2000. Mutations in the 4-hydroxyphenylpyruvic acid dioxygenase gene are responsible for tyrosinemia type III and hawkinsinuria. *Mol Genet Metab* 71:506-10
115. Mungall AJ, Palmer SA, Sims SK, Edwards CA, Ashurst JL, et al. 2003. The DNA sequence and analysis of human chromosome 6. *Nature* 425:805-11
116. Royet J, Bouwmeester T, Cohen SM. 1998. Notchless encodes a novel WD40-repeat-containing protein that modulates Notch signaling activity. *Embo J* 17:7351-60
117. Fisicaro N, Katerelos M, Williams J, Power D, D'Apice A, Pearse M. 1995. Identification of genes downregulated in the thymus by cyclosporin-A: preliminary characterization of clone CSA-19. *Mol Immunol* 32:565-72

- 
118. Vaishnav YN, Vaishnav MY, Pant V. 1998. The molecular and functional characterization of E2F-5 transcription factor. *Biochem Biophys Res Commun* 242:586-92
  119. Apostolova MD, Ivanova IA, Dagnino C, D'Souza SJ, Dagnino L. 2002. Active nuclear import and export pathways regulate E2F-5 subcellular localization. *J Biol Chem* 277:34471-9
  120. Jiang Y, Yim SH, Xu HD, Jung SH, Yang SY, et al. 2011. A potential oncogenic role of the commonly observed E2F5 overexpression in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 17:470-7
  121. Kang J, Yang M, Li B, Qi W, Zhang C, et al. 2008. Structure and substrate recruitment of the human spindle checkpoint kinase Bub1. *Mol Cell* 32:394-405
  122. Cahill DP, Lengauer C, Yu J, Riggins GJ, Willson JK, et al. 1998. Mutations of mitotic checkpoint genes in human cancers. *Nature* 392:300-3
  123. Klebig C, Korinth D, Meraldi P. 2009. Bub1 regulates chromosome segregation in a kinetochore-independent manner. *J Cell Biol* 185:841-58
  124. King RW. 2008. When 2+2=5: the origins and fates of aneuploid and tetraploid cells. *Biochim Biophys Acta* 1786:4-14
  125. Nomura N, Miyajima N, Sazuka T, Tanaka A, Kawarabayasi Y, et al. 1994. Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. I. The coding sequences of 40 new genes (KIAA0001-KIAA0040) deduced by analysis of randomly sampled cDNA clones from human immature myeloid cell line KG-1. *DNA Res* 1:27-35
  126. Gudmundsson KO, Thorsteinsson L, Sigurjonsson OE, Keller JR, Olafsson K, et al. 2007. Gene expression analysis of hematopoietic progenitor cells identifies *Dlg7* as a potential stem cell gene. *Stem Cells* 25:1498-506
  127. Tsou AP, Yang CW, Huang CY, Yu RC, Lee YC, et al. 2003. Identification of a novel cell cycle regulated gene, HURP, overexpressed in human hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 22:298-307
  128. Mazzarella R, Pengue G, Jones J, Jones C, Schlessinger D. 1998. Cloning and expression of an immunoglobulin superfamily gene (IGSF1) in Xq25. *Genomics* 48:157-62
  129. Tomasi TB, Jr. 1977. Structure and function of alpha-fetoprotein. *Annu Rev Med* 28:453-65
  130. Murray MJ, Nicholson JC. 2011. alpha-Fetoprotein. *Arch Dis Child Educ Pract Ed* 96:141-7
  131. Muda M, Boschert U, Smith A, Antonsson B, Gillieron C, et al. 1997. Molecular cloning and functional characterization of a novel mitogen-activated protein kinase phosphatase, MKP-4. *J Biol Chem* 272:5141-51
  132. Pfaffl MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29:e45
  133. <http://bonsai.hgc.jp/~mdehoon/software/cluster/cluster3.pdf>
-

134. Pritchard J, Brown J, Shafford E, Perilongo G, Brock P, et al. 2000. Cisplatin, doxorubicin, and delayed surgery for childhood hepatoblastoma: a successful approach--results of the first prospective study of the International Society of Pediatric Oncology. *J Clin Oncol* 18:3819-28
135. Fuchs J, Rydzynski J, Von Schweinitz D, Bode U, Hecker H, et al. 2002. Pretreatment prognostic factors and treatment results in children with hepatoblastoma: a report from the German Cooperative Pediatric Liver Tumor Study HB 94. *Cancer* 95:172-82
136. Zsiros J, Maibach R, Shafford E, Brugieres L, Brock P, et al. 2010. Successful treatment of childhood high-risk hepatoblastoma with dose-intensive multiagent chemotherapy and surgery: final results of the SIOPEL-3HR study. *J Clin Oncol* 28:2584-90
137. Perilongo G, Shafford E, Plaschkes J. 2000. SIOPEL trials using preoperative chemotherapy in hepatoblastoma. *Lancet Oncol* 1:94-100
138. Saettini F, Conter V, Provenzi M, Rota M, Giraldi E, et al. 2014. Is multifocality a prognostic factor in childhood hepatoblastoma? *Pediatr Blood Cancer* 61:1593-7
139. Czauderna P, Haeberle B, Hiyama E, Rangaswami A, Krailo M, et al. 2016. The Children's Hepatic tumors International Collaboration (CHIC): Novel global rare tumor database yields new prognostic factors in hepatoblastoma and becomes a research model. *Eur J Cancer* 52:92-101
140. Baker J, Liu JP, Robertson EJ, Efstratiadis A. 1993. Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. *Cell* 75:73-82
141. Laborda J. 2000. The role of the epidermal growth factor-like protein dlk in cell differentiation. *Histol Histopathol* 15:119-29
142. Kho AT, Zhao Q, Cai Z, Butte AJ, Kim JY, et al. 2004. Conserved mechanisms across development and tumorigenesis revealed by a mouse development perspective of human cancers. *Genes Dev* 18:629-40
143. Dekel B, Metsuyanin S, Schmidt-Ott KM, Fridman E, Jacob-Hirsch J, et al. 2006. Multiple imprinted and stemness genes provide a link between normal and tumor progenitor cells of the developing human kidney. *Cancer Res* 66:6040-9
144. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. 2001. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414:105-11
145. Crowe DL, Parsa B, Sinha UK. 2004. Relationships between stem cells and cancer stem cells. *Histol Histopathol* 19:505-9
146. Pardal R, Clarke MF, Morrison SJ. 2003. Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nat Rev Cancer* 3:895-902
147. Smalley M, Ashworth A. 2003. Stem cells and breast cancer: A field in transit. *Nat Rev Cancer* 3:832-44
148. Glinsky GV, Berezovska O, Glinskii AB. 2005. Microarray analysis identifies a death-from-cancer signature predicting therapy failure in patients with multiple types of cancer. *J Clin Invest* 115:1503-21

149. Kawate S, Fukusato T, Ohwada S, Watanuki A, Morishita Y. 1999. Amplification of c-myc in hepatocellular carcinoma: correlation with clinicopathologic features, proliferative activity and p53 overexpression. *Oncology* 57:157-63
150. Lee JS, Heo J, Libbrecht L, Chu IS, Kaposi-Novak P, et al. 2006. A novel prognostic subtype of human hepatocellular carcinoma derived from hepatic progenitor cells. *Nat Med* 12:410-6
151. Roskams T. 2006. Liver stem cells and their implication in hepatocellular and cholangiocarcinoma. *Oncogene* 25:3818-22
152. Lee E, Edward S, Singal AG, Lavieri MS, Volk M. 2013. Improving screening for hepatocellular carcinoma by incorporating data on levels of alpha-fetoprotein, over time. *Clin Gastroenterol Hepatol* 11:437-40
153. Chaiteerakij R, Addissie BD, Roberts LR. 2013. Update on Biomarkers of Hepatocellular Carcinoma. *Clin Gastroenterol Hepatol* 13:237-45
154. Miltiados O, Sia D, Hoshida Y, Fiel MI, Harrington AN, et al. 2015. Progenitor cell markers predict outcome of patients with hepatocellular carcinoma beyond Milan criteria undergoing liver transplantation. *J Hepatol* 63:1368-77
155. Sung YK, Hwang SY, Park MK, Farooq M, Han IS, et al. 2003. Glypican-3 is overexpressed in human hepatocellular carcinoma. *Cancer science* 94:259-62
156. Pontisso P, Quarta S, Caberlotto C, Beneduce L, Marino M, et al. 2006. Progressive increase of SCCA-IgM immune complexes in cirrhotic patients is associated with development of hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 119:735-40
157. Pietsch T, Fonatsch C, Albrecht S, Maschek H, Wolf HK, von Schweinitz D. 1996. Characterization of the continuous cell line HepT1 derived from a human hepatoblastoma. *Lab Invest* 74:809-18
158. Coecke S, Balls M, Bowe G, Davis J, Gstraunthaler G, et al. 2005. Guidance on good cell culture practice. a report of the second ECVAM task force on good cell culture practice. *Altern Lab Anim* 33:261-87
159. Wagner PD, Verma M, Srivastava S. 2004. Challenges for biomarkers in cancer detection. *Ann N Y Acad Sci* 1022:9-16
160. Gupta GP, Massague J. 2006. Cancer metastasis: building a framework. *Cell* 127:679-95
161. Sleijfer S, Gratama JW, Sieuwerts AM, Kraan J, Martens JW, Foekens JA. 2007. Circulating tumour cell detection on its way to routine diagnostic implementation? *Eur J Cancer* 43:2645-50
162. Attard G, Swennenhuis JF, Olmos D, Reid AH, Vickers E, et al. 2009. Characterization of ERG, AR and PTEN gene status in circulating tumor cells from patients with castration-resistant prostate cancer. *Cancer Res* 69:2912-8
163. Cohen SJ, Punt CJ, Iannotti N, Saidman BH, Sabbath KD, et al. 2008. Relationship of circulating tumor cells to tumor response, progression-free survival, and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 26:3213-21

164. Hayes DF, Smerage J. 2008. Is there a role for circulating tumor cells in the management of breast cancer? *Clin Cancer Res* 14:3646-50
165. Kristiansen S, Nielsen D, Soletormos G. 2016. Detection and monitoring of hypermethylated RASSF1A in serum from patients with metastatic breast cancer. *Clin Epigenetics* 8:35
166. Han JC, Xu F, Chen N, Qi GB, Wei YJ, et al. 2016. Promoter methylations of RASSF1A and p16 is associated with clinicopathological features in lung cancers. *J Cancer Res Ther* 12:340-9
167. Agathangelou A, Cooper WN, Latif F. 2005. Role of the Ras-association domain family 1 tumor suppressor gene in human cancers. *Cancer Res* 65:3497-508
168. Zhang YJ, Wu HC, Shen J, Ahsan H, Tsai WY, et al. 2007. Predicting hepatocellular carcinoma by detection of aberrant promoter methylation in serum DNA. *Clin Cancer Res* 13:2378-84
169. Zhao ZH, Fan YC, Yang Y, Wang K. 2013. Association between Ras association domain family 1A promoter methylation and hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. *World J Gastroenterol* 19:7189-96
170. Wiley A, Katsaros D, Fracchioli S, Yu H. 2006. Methylation of the insulin-like growth factor binding protein-3 gene and prognosis of epithelial ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 16:210-8
171. Tomii K, Tsukuda K, Toyooka S, Dote H, Hanafusa T, et al. 2007. Aberrant promoter methylation of insulin-like growth factor binding protein-3 gene in human cancers. *Int J Cancer* 120:566-73
172. Gigek CO, Leal MF, Lisboa LC, Silva PN, Chen ES, et al. 2010. Insulin-like growth factor binding protein-3 gene methylation and protein expression in gastric adenocarcinoma. *Growth Horm IGF Res* 20:234-8
173. Kawasaki T, Nosho K, Ohnishi M, Suemoto Y, Kirkner GJ, et al. 2007. IGFBP3 promoter methylation in colorectal cancer: relationship with microsatellite instability, CpG island methylator phenotype, and p53. *Neoplasia* 9:1091-8
174. Meng FD, Wei JC, Qu K, Wang ZX, Wu QF, et al. 2015. FoxM1 overexpression promotes epithelial-mesenchymal transition and metastasis of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 21:196-213
175. Wei JC, Meng F, Qu K, Wang ZX, Wu QF, et al. 2015. Sorafenib inhibits proliferation and invasion of human hepatocellular carcinoma cells via up-regulation of p53 and suppressing FoxM1. *Acta Pharmacol Sin* 36:241-51
176. Saletta F, Wadham C, Ziegler DS, Marshall GM, Haber M, et al. 2014. Molecular profiling of childhood cancer: Biomarkers and novel therapies. *BBA Clin* 1:59-77
177. Samkari A, White J, Packer R. 2015. SHH inhibitors for the treatment of medulloblastoma. *Expert Rev Neurother* 15:763-70
178. Rimkus TK, Carpenter RL, Qasem S, Chan M, Lo HW. 2016. Targeting the Sonic Hedgehog Signaling Pathway: Review of Smoothed and GLI Inhibitors. *Cancers (Basel)* Feb 15; 8

- 
179. Singh AR, Joshi S, Zulcic M, Alcaraz M, Garlich JR, et al. 2016. PI-3K Inhibitors Preferentially Target CD15+ Cancer Stem Cell Population in SHH Driven Medulloblastoma. *PloS One* 11:e0150836
  180. Van Tornout JM, Buckley JD, Quinn JJ, Feusner JH, Krailo MD, et al. 1997. Timing and magnitude of decline in alpha-fetoprotein levels in treated children with unresectable or metastatic hepatoblastoma are predictors of outcome: a report from the Children's Cancer Group. *J Clin Oncol* 15:1190-7
  181. Reith W, Muhl-Benninghaus R, Simgen A, Yilmaz U. 2014. [Germ cell and embryonal tumors]. *Radiologe* 54:772-82
  182. Meyers RL, Rowland JR, Krailo M, Chen Z, Katzenstein HM, Malogolowkin MH. 2009. Predictive power of pretreatment prognostic factors in children with hepatoblastoma: a report from the Children's Oncology Group. *Pediatr Blood Cancer* 53:1016-22
  183. Czauderna P, Lopez-Terrada D, Hiyama E, Haberle B, Malogolowkin MH, Meyers RL. 2014. Hepatoblastoma state of the art: pathology, genetics, risk stratification, and chemotherapy. *Curr Opin Pediatr* 26:19-28
  184. Eichenmuller M, Trippel F, Kreuder M, Beck A, Schwarzmayr T, et al. 2014. The genomic landscape of hepatoblastoma and their progenies with HCC-like features. *J Hepatol* 61:1312-20
  185. Greenman C, Stephens P, Smith R, Dalgliesh GL, Hunter C, et al. 2007. Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. *Nature* 446:153-8
  186. Parsons DW, Li M, Zhang X, Jones S, Leary RJ, et al. 2011. The genetic landscape of the childhood cancer medulloblastoma. *Science* 331:435-9
  187. Zhang J, Benavente CA, McEvoy J, Flores-Otero J, Ding L, et al. 2012. A novel retinoblastoma therapy from genomic and epigenetic analyses. *Nature* 481:329-34
  188. Lee RS, Stewart C, Carter SL, Ambrogio L, Cibulskis K, et al. 2012. A remarkably simple genome underlies highly malignant pediatric rhabdoid cancers. *J Clin Invest* 122:2983-8

## 9 Anhang

### Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich sämtliche Experimente gemäß meines besten Wissens und Gewissens durchgeführt und diese Arbeit eigenständig verfasst habe. Das Kapitel 8 „Literaturverzeichnis“ gibt Auskunft über die von mir genutzte Literatur. Alle Experimente wurden nach Anleitung von Fachpersonal in Eigenarbeit durchgeführt.

### Danksagung

Für die außerordentliche und überdurchschnittliche Betreuung meiner Arbeit möchte ich mich recht herzlich bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Roland Kappler, sowie meiner Betreuerin, Frau Dr. Melanie Eichenmüller, bedanken. Die wertvollen Erfahrungen, die ich durch die Zusammenarbeit in den letzten Jahren gesammelt habe, werden mich auf meinem weiteren beruflichen und persönlichen Werdegang begleiten. Besonders schätze ich den unkomplizierten und freundlichen Austausch mit Herrn Prof. Kappler, der stets ein offenes Ohr für meine Fragen hatte und mit Rückmeldungen nie lange auf sich warten ließ. Ich freue mich unter seiner Leitung einen Einblick in die experimentelle Forschung bekommen zu haben.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei Frau Dr. Franziska Trippel für die anregenden Diskussionen und Motivationen, ohne die diese Arbeit nicht so schnell geschrieben worden wäre. Vielen Dank für das Beiseitestehen mit Rat und Tat und die entstandene Freundschaft! Der guten Seele des Labors, Shiva, danke ich für den netten Austausch und die vielen Hilfestellungen. Bei Herrn Prof. Dr. Dietrich von Schweinitz bedanke ich mich für die Möglichkeit an der Kinderchirurgischen Klinik zu promovieren.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern und Geschwistern für ihre tatkräftige Unterstützung und ihren liebevollen Beistand während des gesamten Studiums. Ihr seid der Grund, warum ich immer weiter mache und mich voller Kraft neuen Herausforderungen stelle. Meinem Mann danke ich für seine hilfreichen Anregungen, das konstante Mut machen und die bedingungslose Unterstützung. Zu guter Letzt danke ich meiner Tochter für ihre fröhliche Art und die Erinnerung an das wirklich Wichtige im Leben.

# Eidesstattliche Versicherung

Hagemann, Michaela

---

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,  
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Validierung prognostisch relevanter Biomarker bei pädiatrischen  
Tumoren der Leber

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 15.05.2016

---

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin/Doktorand